

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Sciences – Technologie – Santé

FACULTE de MEDECINE

Année 2010

Thèse N°

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Spécialité : **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

présentée et soutenue par

Sylvie BOURTHOUMIEU

le 14 septembre 2010

**ETUDE *IN VITRO* DES EFFETS GENOTOXIQUES
DES RADIOFREQUENCES DE TYPE GSM-900**

JURY :

Rapporteur - Mme Isabelle LAGROYE – Maître de Conférences – CNRS UMR5218 Bordeaux I

Rapporteur - M. Lluís M MIR – Directeur de Recherche – CNRS UMR8203 Villejuif

Examineur- M. Philippe LEVEQUE – Chargé de Recherche – CNRS UMR6172 XLIM Limoges

Examineur - Mme Anne PERRIN – Chercheur – IRBA/CRSSA Grenoble

Examineur - M. Franck STURTZ – Professeur des Universités – EA4021 Limoges

Directeur de thèse - Mme Catherine YARDIN – Professeur des Universités – EA3842 Limoges

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le docteur Isabelle LAGROYE, Monsieur le docteur Lluis M MIR et Madame le docteur Anne PERRIN d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Vos remarques et vos critiques nous seront très précieuses.

Je remercie Monsieur le Professeur Franck STURTZ d'avoir accepté d'examiner ce travail au dernier moment et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je tiens à vous exprimer ici toute ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur le docteur Philippe LEVEQUE d'avoir accepté d'examiner ce travail. Votre collaboration et votre implication à ce travail nous ont été très précieuses. Je tiens à vous exprimer ici toute ma gratitude.

Je remercie Madame le Professeur Catherine YARDIN sans qui ce travail n'aurait pas eu lieu. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée et tout ce que vous m'avez appris.

Je remercie la Fondation Santé et Radiofréquences pour le financement de ce travail.

Je remercie tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et en particulier Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU (directrice de l'équipe d'accueil EA3842), Délia ARNAUD-CORMOS (MCU à XLIM), Benoît MARIN (MCU-PH à l'unité de Biostatistique), Alice COLLIN (Post-doctorant à XLIM), Matthieu GAYOUT (stagiaire de BTA), Romain BIBES (stagiaire de M1), David PICARD (stagiaire de BTA), l'équipe EA3842, Laure DAYMARD, Marion CROCHETET, Cornélia WHELAN-WILSON...

Je tiens à remercier chaleureusement et à exprimer toute ma gratitude à certaines personnes qui ont été très présentes pendant ces quatre années de thèse :

Monsieur Faraj TERRO pour ta disponibilité, tes conseils et ton précieux soutien pendant ces quatre années

Monsieur Daniel RONDELAUD pour vos conseils avisés et vos encouragements

Amandine MAGNAUDEIX pour ta générosité et ta disponibilité qui m'ont été précieuses pour l'apprentissage des westerns blots

Ludovic MARTIN pour ta sérénité et ta gentillesse

Marie Françoise FORESTIER pour ta gentillesse, l'organisation et la gestion du laboratoire de recherche

Toute l'équipe du laboratoire hospitalier de cytogénétique constitutionnelle pour les cultures d'amniocytes, votre gentillesse et votre compréhension.

A ma famille

A ma fille Clarisse

RESUME EN FRANÇAIS

Le développement et l'augmentation constante des systèmes de télécommunication s'accompagnent de nombreuses questions, en particulier sur le risque sanitaire et oncogène des radiofréquences. La cancérogenèse est un processus multi-étape lié à l'accumulation d'anomalies génétiques dans des régions critiques du génome. Ces lésions génomiques sont généralement détectées et réparées par les cellules. Des erreurs ou défauts de réparation peuvent conduire à des instabilités génomiques pouvant initier un processus cancérogène. Notre travail a porté sur l'étude des effets génotoxiques des radiofréquences utilisées par la téléphonie mobile (GSM-900) sur des amniocytes humains. Les cellules ont été exposées *in vitro* pendant 24 heures à des ondes GSM-900 dans une cellule fil-plaque. La génotoxicité a été évaluée selon différentes approches (1) étude des remaniements chromosomiques et des aneuploïdies à l'aide du caryotype en bandes R (DAS moyen de 0,25 W/kg) et de la FISH (DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg), (2) étude de l'expression et de l'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation des lésions de l'ADN telles que l'activation de p53 et H2AX par western blot (DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg) et (3) étude de certaines réponses cellulaires aux lésions de l'ADN comme l'apoptose par détection du clivage de la caspase 3 par western blot (DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg). Les résultats obtenus ne montrent pas d'effet génotoxique significatif des radiofréquences de type GSM-900 sur des amniocytes humains exposés pendant 24 heures quels que soient la méthode utilisée et le niveau de puissance testé. Ces résultats semblent en adéquation avec la majorité des études publiées dans la littérature.

Mots clés : radiofréquences, GSM, lésions de l'ADN, génotoxicité, *in vitro*, amniocytes, cytogénétique, caryotype, FISH, p53, caspase 3.

ABSTRACT

With the ever-increasing growth of the telecommunication industry come the accompanying questions as to the health and oncogenic risk of radiofrequencies.

Cancerogenesis is a multi-step process linked to the accumulation of genetic abnormalities in critical regions of the genome. This genomic damage is generally detected and repaired by the cells. Errors or faulty repairs can lead to genomic instability, which can initiate a cancerogenic process. Our study focused on the genotoxic effects of radiofrequencies used by cellular phones (GSM-900) on human amniocytes. Cells were exposed *in vitro* for 24 hours to GSM-900 waves in a wire-patch cell. The genotoxicity was evaluated using three different approaches. 1) The study of chromosomal aberrations and aneuploidies by R-banded karyotype (average SAR value of 0.25 W/kg) and FISH (average SAR values of 0.25 ; 1 ; 2 ; and 4 W/kg). 2) The study of the expression and activation of proteins involved in the DNA damage signaling pathway, such as the activation of p53 and H2AX, using western blot (average SAR values of 0.25 ; 1 ; 2 ; 4 W/kg). 3) The study of certain cellular responses to DNA damage, such as apoptosis, by detecting the cleaving of caspase 3 using western blot (average SAR values of 0.25 ; 1 ; 2 ; 4 W/kg). The results showed that there was no significant genotoxic effect on the human amniocytes that were exposed for 24 hours to radiofrequencies of the GSM-900. These results seem to be in agreement with the majority of the previously studies published on this topic.

Key words: radiofrequencies, GSM, DNA damage, genotoxicity, *in vitro*, amniocytes, cytogenetic, karyotype, FISH, p53, caspase 3.

TABLE DES MATIERES

RESUME EN FRANÇAIS.....	1
ABSTRACT	2
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION.....	16
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
I. Les ondes de la téléphonie mobile	19
A. Généralités sur les ondes électromagnétiques	19
1. Caractéristiques physiques des ondes électromagnétiques	19
2. Spectre électromagnétique	21
B. Radiofréquences et téléphonie mobile.....	24
1. Aspect physique des radiofréquences	24
2. Aspect technologique : la communication radioélectrique	25
a) Principe de la communication radioélectrique.....	25
b) Les systèmes utilisés.....	25
c) Les réseaux publics de téléphonie mobile.....	28
d) Les téléphones mobiles.....	30
e) Les stations de base ou antennes relais	31
3. Aspect biologique : interaction avec les systèmes biologiques.....	32
a) Interaction des radiofréquences avec les milieux biologiques	32
b) Dosimétrie et débit d'absorption spécifique	37
c) Effets biologiques des radiofréquences.....	39
II. Lésions de l'ADN et réponses cellulaires	41
A. Rappels sur le matériel génétique.....	41
1. Structure du matériel génétique.....	41
2. Modification du matériel génétique au cours du cycle cellulaire.....	42
B. Lésions de l'ADN.....	43
1. Génotoxicité	43
2. La nature des lésions de l'ADN	43
a) Modifications structurales des désoxyribonucléotides	43
b) Modifications structurales de l'ADN	44
c) Cassures de l'ADN	44
3. Conséquences cellulaires des lésions	45
C. Les voies de signalisation des PIKKs : ATM et ATR.....	46
a) ATM et la voie des cassures double brin	48
b) ATR et la voie de l'ADN simple brin.....	49
c) Les transducteurs : Chk1 et Chk2	50
D. La protéine p53.....	51
1. Généralités.....	51
2. Structure de p53	51
3. Régulation de p53 par Mdm2 dans les cellules normales	53

4. Activation de p53 suite à un stress cellulaire	54
a) Phosphorylations du domaine N-terminal.....	54
b) Modifications post-traductionnelles du domaine C-terminal	55
E. Réponses cellulaires suite aux lésions de l'ADN	57
1. Arrêt du cycle cellulaire	57
a) Rappel : régulation du cycle cellulaire.....	57
b) Arrêt au point de contrôle en G1	59
c) Arrêt au point de contrôle en S	60
d) Arrêt au point de contrôle G2/M	61
2. Réparation des lésions de l'ADN.....	62
a) Réparation par excision de base (BER)	63
b) Réparation par excision de nucléotide (NER)	65
c) Réparation des mésappariements de l'ADN (MMR)	67
d) Réparation des cassures simple brin (SSBR).....	69
e) Réparation des cassures double brin (DSBR)	70
3. Apoptose.....	73
4. Sénescence	74
5. Différenciation	75
6. Autophagie	75
III. Genotoxicité des radiofréquences.....	76
A. Problématique générale	76
B. Méthodes d'étude de la génotoxicité des radiofréquences.....	78
1. Méthodes classiques	78
a) Test des comètes	78
b) Test des échanges de chromatides sœurs (SCE).....	79
c) Test des aberrations chromosomiques (CA)	80
d) Test des micronoyaux (MN).....	81
2. Les autres méthodes	83
C. Présentation générale des études de génotoxicité réalisées dans le cadre des radiofréquences	84
D. Objectifs du travail	89
PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	91
I. Culture cellulaire	92
II. Exposition aux ondes GSM-900	92
III. Exposition aux agents génotoxiques ou cytotoxiques	94
A. Bléomycine.....	94
B. Staurosporine	94
IV. Caryotype en bandes R.....	94
V. Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	96
VI. Western blot	97
VII. Etude du Cycle cellulaire par cytométrie de flux	99
VIII. Etudes statistiques	99
RESULTATS EXPERIMENTAUX	101

I. Partie 1 - Relevés thermiques au cours des expositions <i>in vitro</i> aux radiofréquences de type GSM-900	102
II. Partie 2 - Etude des effets clastogènes et aneuploïdogènes.....	104
A. Etude des aberrations chromosomiques par le caryotype	104
1. Introduction	104
2. Résultats	105
3. Discussion	111
B. Etude des effets aneuploïdogènes par hybridation <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	115
1. Introduction	115
2. Résultats	116
3. Discussion	118
III. Partie 3 - Etude des protéines impliquées dans les voies de signalisation des lésions de l'ADN.....	123
A. Expression et activation de p53.....	123
1. Introduction	123
2. Résultats	123
3. Discussion	126
B. Expression de γ -H2AX.....	128
1. Introduction	128
2. Résultats	128
3. Discussion	130
IV. Partie 4 - Etude des réponses cellulaires.....	132
A. Etude de l'apoptose par l'activation de la caspase 3	132
1. Introduction	132
2. Résultats	133
3. Discussion	134
B. Etude préliminaire du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	135
DISCUSSION GENERALE	138
I. Modèle cellulaire : amniocytes humains.....	139
II. La fréquence d'exposition	142
A. Données générales de la littérature.....	142
B. Fréquence autour de 900 MHz	144
III. La durée d'exposition.....	148
A. Données générales de la littérature.....	148
B. Durée d'exposition de 24 heures	150
IV. La puissance moyenne d'exposition (DAS)	152
A. Données générales de la littérature.....	152
B. DAS inférieurs à 10 W/kg	154
V. La co-génotoxicité.....	157
A. Données générales de la littérature.....	157

B. Exposition aux radiofréquences seules.....	159
CONCLUSION.....	161
PERSPECTIVES.....	163
BIBLIOGRAPHIE.....	165
ANNEXE 1 – SYNTHÈSE GÉNÉTOXICITÉ DES RF - 1995/2010.....	185
ANNEXE 2 – SYNTHÈSE EXPRESSION GÉNÉTIQUE - 2005/2010.....	191
ANNEXE 4 – ARTICLE ACCEPTÉ POUR PUBLICATION DANS RADIATION RESEARCH.....	193
ANNEXE 5 – ARTICLE SOUMIS.....	194

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Spectre électromagnétique en fonction des longueurs d'onde et des fréquences	21
Tableau 2. Bandes de fréquence des micro-ondes ou hyperfréquences	23
Tableau 3. Spectre radiofréquence	23
Tableau 4. Principaux systèmes utilisés par la téléphonie mobile	26
Tableau 5. Niveaux de référence fixés par le décret du 3 mai 2002 (2002-775) transcrivant la recommandation européenne du 12 juillet 1999 (1999/519/CE).....	32
Tableau 6. Permittivité et conductivité de certains tissus biologiques	35
Tableau 7. Absorption de l'énergie de l'onde électromagnétique selon la fréquence du champ électromagnétique	37
Tableau 8. Moyennes et écart-types des températures relevées avant l'exposition (30 minutes) et pendant l'exposition aux GSM-900 (24 heures).	102
Tableau 9. Total des aberrations chromosomiques de nombre et de structure observées pour les cultures exposées et sham-exposées à 0 et 24 heures post-exposition pour chaque donneur.....	108
Tableau 10. Résultats des moyennes (et écart-types) et des médianes (et quartiles) de l'analyse des caryotypes en bandes R.	109
Tableau 11. Valeurs des p de l'analyse statistique des résultats des caryotypes en bandes R.	111
Tableau 12. Etudes publiées ayant évalué la génotoxicité des radiofréquences par les tests des aberrations chromosomiques ou des échanges de chromatides sœurs.	113
Tableau 13. Etudes publiées ayant évalué la génotoxicité des radiofréquences par le test des micronoyaux.....	122
Tableau 14. Valeurs des p de l'analyse statistique de l'expression de p53 normalisée.....	125
Tableau 15. Etudes publiées entre 2005 et 2010 portant sur l'expression génique réalisée sur puces pangénomiques.....	127
Tableau 16. Proportion des expériences réalisées in vitro à partir de fibroblastes par rapport au total des expériences.....	140
Tableau 17. Total des expériences réalisées in vitro en fonction des différentes catégories de fréquence	142
Tableau 18. Total des expériences réalisées in vitro selon les différentes catégories de durée d'exposition.....	148
Tableau 19. Total des expériences réalisées in vitro selon les différentes catégories de DAS	153
Tableau 20. Total des expériences réalisées in vitro à des DAS ≤ 10 W/kg en fonction des différentes catégories de fréquences.....	155
Tableau 21. Total des expositions in vitro aux radiofréquences seules ou en co-génotoxicité	158

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Onde électromagnétique	19
Figure 2. Spectre électromagnétique	21
Figure 3. Modulations d'amplitude et de fréquence.....	27
Figure 4. Les différents protocoles d'accès : AMRF, AMRT et AMRC	28
Figure 5. Emission du rayonnement électromagnétique par une station de base	32
Figure 6. Les différents types de lésions de l'ADN	45
Figure 7. Les réponses cellulaires aux lésions de l'ADN.....	46
Figure 8. Etapes et acteurs de la réponse aux lésions de l'ADN	47
Figure 9. Les voies de signalisation des PIKKs suite à la détection de lésions de l'ADN.....	48
Figure 10. Structure et fonction de la protéine p53	53
Figure 11. Régulation des complexes cycline/Cdk	59
Figure 12. Régulation du cycle cellulaire aux points de contrôle	62
Figure 13. Les différents systèmes de réparation selon la nature des lésions de l'ADN.....	63
Figure 14. Réparation par excision de base (BER)	65
Figure 15. La réparation par excision de nucléotides (NER)	67
Figure 16. Réparation des mésappariements (MMR).....	69
Figure 17. Réparation des cassures simple brin (SSBR)	70
Figure 18. Réparation des cassures double brin (DSBR)	72
Figure 19. Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose	74
Figure 20. Processus de cancérogenèse.....	77
Figure 21. Les méthodes classiques d'évaluation de la génotoxicité.	82
Figure 22. Les différentes méthodes utilisées pour évaluer la génotoxicité des radiofréquences et leurs finalités.....	84
Figure 23. Parts des différents types d'études et modèles biologiques (n = 82 publications).	85
Figure 24. Parts des différentes méthodes d'évaluation de la génotoxicité des radiofréquences (n = 82 études)	86
Figure 25. Répartition des études positives et négatives réalisées in vivo en fonction de la fréquence et de la puissance (n = 108 expériences publiées dans 20 études).	87
Figure 26. Répartition des études positives et négatives réalisées in vitro en fonction de la fréquence et de la puissance (n = 626 expériences publiées dans 53 études).	88
Figure 27. Ensemble du système d'exposition fourni par XLIM.	93
Figure 28. Protocoles d'arrêt des cultures cellulaires pour la réalisation du caryotype en bandes R... ..	95
Figure 29. Augmentation de la température (en °C) en fonction du DAS moyen (en W/kg)	103
Figure 30. Métaphases et caryotypes en bandes R.	106
Figure 31. Résultats de l'analyse des caryotypes en bandes R.....	110
Figure 32. Expériences réalisées avec les méthodes évaluant les effets clastogènes : tests des SCE, CA et comètes (n = 452 pour un total de 693 expériences).	114

Figure 33. Hybridation in situ (FISH) de cellules interphasiques et en cytotidérèse à l'aide des sondes centromériques des chromosomes 11 (rouge) et des chromosomes 17 (aqua ou blanc).....	117
Figure 34. Résultats de l'hybridation in situ (FISH) des marquages centromériques des chromosomes 11 et 17.....	118
Figure 35. Expériences réalisées avec les méthodes évaluant les effets clastogènes et aneuploïdogènes : tests des SCE, CA, comètes, micronoyaux et FISH (n = 636 pour un total de 693 expériences).....	120
Figure 36. Westerns blots réalisés avec les anticorps anti-p53, anti-phospho-p53 (ser15), anti-phospho-p53 (ser37) et anti-β actine.....	124
Figure 37. Résultats de l'expression de p53 normalisée par l'actine.....	125
Figure 38. Westerns blots réalisés avec les anticorps anti-γH2AX et anti-β actine.....	129
Figure 39. Westerns blots réalisés avec les anticorps anti-caspase 3 clivée et anti-β actine.....	134
Figure 40. Histogrammes obtenus par cytométrie de flux après marquage de l'ADN par l'iodure de propidium.....	136
Figure 41. Résultats de l'étude du cycle cellulaire par cytométrie de flux.....	136
Figure 42. Part d'utilisation des fibroblastes dans les expériences de génotoxicité réalisées in vitro (n = 626).....	140
Figure 43. Répartition des études positives et négatives en fonction de la fréquence et de la durée d'exposition pour des expériences réalisées avec des fibroblastes en culture primaire et provenant de lignées cellulaires (n = 125).....	141
Figure 44. Parts des différentes fréquences testées pour évaluer la génotoxicité des radiofréquences (n = 626).....	143
Figure 45. Total des expériences selon les différentes catégories de fréquences d'exposition (n = 626).....	143
Figure 46. Total des expériences selon les différentes catégories de fréquences d'exposition sans les travaux de Diem et al. (2005) et Schwarz et al. (2008) (n = 570).....	144
Figure 47. Répartition des expériences positives et négatives en fonction du DAS et de la durée d'exposition pour des ondes de type GSM-900 (n = 64).....	145
Figure 48. Répartition des études positives et négatives en fonction du DAS et de la durée d'exposition pour des ondes de fréquence 900 MHz continues ou modulées selon un protocole différent du GSM (n = 176).....	147
Figure 49. Parts des différentes durées d'exposition aux radiofréquences in vitro regroupées en 5 catégories (n = 626).....	149
Figure 50. Total des expériences selon les durées d'exposition regroupées en 5 catégories (n = 626).....	149
Figure 51. Répartition des études positives et négatives réalisées in vitro en fonction de la fréquence et de la durée d'exposition (n = 626).....	150
Figure 52. Total des expériences d'une durée d'exposition d'environ 24 heures selon les différentes catégories de fréquences (n = 189).....	151
Figure 53. Répartition des études positives et négatives en fonction de la fréquence et du DAS pour une durée d'exposition d'environ 24 heures (20 à 28 heures (n = 189).....	151
Figure 54. Parts des différents niveaux de puissance (DAS) regroupés en 5 catégories.....	153
Figure 55. Total des expériences en fonction des niveaux de puissance d'exposition regroupés en 5 catégories (n = 582).....	154

Figure 56. Répartition des études positives et négatives en fonction de la fréquence et des DAS inférieurs ou égaux à 10 W/kg (n = 556)..... 155

Figure 57. Total des expériences réalisées avec des DAS inférieurs ou égaux à 10 W/kg selon les catégories de fréquences (n = 555)..... 156

Figure 58. Répartition des études positives et négatives en fonction du DAS et de la durée d'exposition pour des ondes d'une fréquence d'environ 900 MHz (n = 231)..... 156

Figure 59. Parts des expositions réalisées avec les RF seules ou en co-génotoxicité avec des agents chimique et physique (n = 626)..... 158

Figure 60. Total des expositions aux RF seules ou en co-génotoxicité avec des agents physique et chimique (n = 626). 159

Figure 61. Répartition des études positives et négatives correspondant à des expositions seules aux radiofréquences (n = 466)..... 160

LISTE DES ABREVIATIONS

ABREVIATIONS DES TERMES PHYSIQUES

AM	Amplitude Modulation (ang = anglais) - Modulation d'amplitude
AMRC	Accès Multiple par Répartition de Codes
AMRF	Accès Multiple par Répartition de Fréquences
AMRT	Acces Multiple par Repartition de Temps
BCCH	Broadcast Control CHannel (ang) - Canal de contrôle de diffusion
CDMA	Code Division Multiple Access (ang) - Accès multiple par répartition de codes
CW	Continuous Waves (ang) – Ondes continues
DAS	Débit d'Absorption Spécifique
DCS	Digital Cellular System (ang)
EDGE	Enhanced Data Rates for Global Evolution (ang)
EHF	Extremely High Frequency (ang) –Fréquence extrêmement haute
ELF	Extremely Low Frequency (ang) – Fréquence extrêmement basse
EM	ElectroMagnétique
<i>Et al.</i>	<i>Et alii</i> (latin) – et autres
FDMA	Frequency Division Multiple Access (ang) – Accès multiple par division de fréquence
FM	Frequency Modulation (ang) – Modulation de fréquence
FSK	Frequency Shift Keying (ang) – Décalage de modulation de fréquence
GFSK	Gaussian filtered Frequency Shift Keying (ang) – Décalage gaussien de modulation de fréquence
GPRS	General Packet Radio Service (ang)
GSM	Global System for Mobile communications (ang) – Système global de communication mobile
HF	High Frequency (ang) - Haute fréquence
iDEN	Integrated Digital Enhanced Network (ang)
IR	InfraRouges
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LF	Low Frequency (ang) – Basse fréquence
MF	Medium Frequency (ang) – Fréquence moyenne
MO	Micro-ondes
MW	Microwaves (ang) – Micro-ondes
NCRP	National Council on Radiation Protection Board (ang) – Organisation de radioprotection Britannique
OEM	Onde ElectroMagnétique
PW	Pulsed Waves (ang) – Ondes pulsées
RADAR	Radio Detection And Ranging (ang)
RI	Radiations Ionisantes
RF	RadioFréquence (ang) - Radiofréquence
SAR	Specific Absorption Rate (ang) – Débit d'absorption spécifique
SHF	Super High Frequency (ang) – Super haute fréquence
SLF	Super Low Frequency (ang) – Super basse fréquence
SMS	Short Message Service
TCH	Traffic CHannel (ang) – Canal de trafic
TDMA	Time Division Multiple Access (ang) – Accès multiple par répartition temporelle
TEM	Transverse Electromagnetic Mode (ang)
TETRA	Terrestrial Enhanced Trunked Radio system (ang) – Réseau radio à ressources partagées
UHF	Ultra High Frequency (ang) – Ultra haute fréquence
ULF	Ultra Low Frequency (ang) – Ultra basse fréquence

UMTS	Universal Mobile Telecommunication System (ang) – Système de communication mobile universel
UV	UltraViolet
VHF	Very High Frequency (ang) – Très haute fréquence
VLf	Very Low Frequency (ang) – Très basse fréquence
W-AMRC	Wideband Code Division Multiple Access (ang)
WIFI	Wireless Fidelity (ang)

ABREVIATIONS DES TERMES BIOLOGIQUES

ADN	Acide désoxyribonucléique
Add	Additionnel (ang) – Matériel chromosomique additionnel
AIP	Apoptosis Inducing Factor (ang)
AMPK	5'Adénosine Monophosphate-activated Protein Kinase (ang)
AP	APurique/APyrimidique (Abasique)
Apaf	Apoptotic protease activating factor (ang)
APC	Aphidicoline
APE1	AP endonucléase 1
ARN	Acide RiboNucléique
AT	Ataxie Télangiectasie
ATM	Ataxia Telangiectiasa Mutated (ang)
ATR	ATM and Rad3-related protein kinase (ang)
ATRIP	ATR-Interacting Protein (ang)
AVTD	Anomalous Viscosity Time Dependencies (ang)
53BP1	p53 Binding Protein 1 (ang)
BASC	BRCA1-Associated genome Surveillance Complex (ang)
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2-like protein (ang)
BER	Base Excision Repair (ang) – Réparation par excision de base
BLM	Bléomycine
BRCA1	BReast CAncer 1 (ang)
BrdU	BromodésoxyUridine
BSA	Bovine Serum Albumine (ang) - Albumine sérique de bovin
BTG2	B-cell Translocation Gene 2 (ang)
CA	Chromosomal Aberrations (ang) – Aberrations chromosomiques
CAK	Cyclin-dependent kinase Activating Kinase (ang)
CBP	CREB Binding Protein (ang)
CDB	Cassure Double Brin
Cdc	Cell division cycle (ang)
Cdk	Cyclin dependent kinase (ang) – Kinase dépendante des cyclines
Chk	Checkpoint (ang) – point de contrôle
Chrb	Chromosome break (ang)
Chrg	Chromosome gap (ang)
Chtb	Chromatid break (ang)
Chtg	Chromatid gap (ang)
CIP/KIP	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor (ang)
CK	Casein Kinase (ang)
CKI	Cyclin-dependent protein Kinase Inhibitors (ang)
CPA	Cyclophosphamide monhydrate
CREB	cAMP Response Element-Binding (ang)
CS	Cockayne Syndrome (ang) – Syndrome de Cockayne
CSB	Cassure Simple Brin
CTRL	Contrôles

DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
dATP	DésoxyAdénosine TriPhosphate
dCTP	DésoxyCytidine TriPhosphate
DDB	DNA Damage Binding protein (ang)
Del	Deletion (ang) - Délétion
dGTP	DésoxyGuanosine TriPhosphate
DISC	Death-Inducing Signaling Complex (ang)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA-PK	DNA-activated Protein Kinase (ang)
dNTP	désoxyribonucléotide
DOX	Doxorubicine
DR	Death Receptor (ang)
DSBR	Double Strand Break Repair (ang) – Réparation des cassures double brin
DTT	Dithiothréitol
dTTP	DésoxyThymidine TriPhosphate (ang)
Dup	Duplication
EMS	Ethylmethane sulfonate
ER	Elément de Réponse
ERCC1	Excision Repair Cross Complementing Polypeptide-1
EX	EXposé
Exo	Exonucléase
FEN1	Flap EndoNucléase 1 (ang) – Endonucléase à battant
FISH	Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization (ang) - Hybridation fluorescente <i>in situ</i>
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage (ang)
GG-NER	Global Genome NER (ang) – Réparation globale du genome
HAT	Histone Acetyl Transferase (ang)
hdm2	Human double minute 2 (ang)
HR	Homologous Recombination (ang) – Recombinaison homologue
hHR23B	c-human homolog of RAD23B (ang)
HU	HydroxyUrée
IF	ImmunoFluorescence
INK4	Inhibitor of kinase 4 (cdk4) (ang)
Inv	Inversion
IQR	Interquartile Range (ang)
ISCN	International System for Cytogenetic Nomenclature (ang)
JNK1	c-Jun N-terminal protein Kinase 1 (ang)
Mar	Marker (ang) - Marqueur
MDC1	Mediator of DNA damage Checkpoint
Mdm2	Mouse double minute 2 (ang)
MMC	Mitomycine C
MMR	MisMatch Repair (ang) – Réparation des mésappariements
MMS	Méthylméthane sulfonate
MN	Micronuclei (ang) – Micronoyaux
Mlh	MutL homolog (ang)
MPF	M-phase Promoting Factor (ang)
Mre11	Meiotic recombinaison 11 (ang)
MRN	Complexe Mre11/Rad50/NBS1
Msh	MutS homolog (ang)
MX	3 chloro-4 (dichlorométhyl)5 hydroxy 2(5H) furanone
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin (ang)
NER	Nucleotide Excision Repair (ang) - Réparation par excision de nucléotides

NES	Nuclear Export Signal (ang) - Signal d'exportation nucléaire
NBS1	Nismejen Breakage Syndrome 1 (ang)
NHEJ	Non Homologous End Joining (ang) – Recombinaison non homologue par jonction d'extrémités
NLS	Nuclear Localization Signal (ang) - Signal de localisation nucléaire
NR	Non référencé
4-NQO	4 -nitroquinoline - 1 oxide
p38MAPK	p38 Mitogen Activating Protein Kinase (ang)
p53AIP-1	p53-related apoptosis-inducing protein 1 (ang)
PAR	Poly-(ADP-ribose)
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline (ang) - Tampon phosphate salin
PCAF	p300/CBP Associated Factor (ang)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen (ang)
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-OH Kinase (ang)
PIKK	Phosphatidyl Inositol 3-OH Kinase-related Kinase (ang)
PKC	Protein Kinase C (ang)
PKR	Protein Kinase R (RNA) (ang)
PNK	PolyNucléotide Kinase (ang)
POL	Polymérase
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog (ang)
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
r	Ring (ang) – Chromosome en anneau
RFC	Replication Factor C (ang)
ROS	Reactive Oxygen Species (ang) – Espèces oxygénées réactives
RPA	Replication Protein A (ang)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (ang) – Réaction en chaîne par polymérisation et transcription inverse
SAK	Stress-Activated Kinase (ang)
SCE	Sister Chromatid Exchange (ang) – Echange de chromatide sœur
SE	Sham-Exposé
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (ang)
SMC1	Structural Maintenance of Chromosome 1 (ang)
SSBR	Single Strand Break Repair (ang) – Réparation des cassures simple brin
SSC	Saline Sodium Citrate (ang)
t	Translocation
TA	Température ambiante
TBS	Tris Buffered Saline (ang) - Tampon tris salin
TC-NER	Transcription-Coupled – NER (ang) – Réparation couplée à la transcription
TCR	Transcription-Coupled repair (ang)
TFIIH	Transcription Factor IIH (ang)
TopBP1	Topoisomerase-Binding Protein 1 (ang)
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (ang)
TUNEL	Tdt dependent dUTP-biotin Nick End Labelling (ang)
XP	Xeroderma Pigmentosum (ang)
XRCC	X-ray Repair Cross Complementing (ang)

NB. Les termes non traduits sont généralement utilisés en anglais.

GRANDEURS PHYSIQUES ET UNITES

Grandeurs physiques		Unités	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Concentration molaire	C	Mole par litre	Mol/L ou M
Concentration massique	ρ	Gramme par litre	g/L
Longueur	L	Mètre	m
Masse	M	Kilogramme	kg
Masse moléculaire protéique		Dalton	Da
Masse volumique	ρ	Kilogramme par mètre cube	kg/m³
Volume	V	Litre	L
Temps / durée	T	Seconde	s
Température	T°	Minutes	min
		Degré Celsius	°C
		Kelvin	K
Energie	E	Joules	J
		Electron-Volts	eV
Longueur d'onde	λ	Mètre	m
Fréquence	f ou ν	Hertz	Hz
Puissance	P	Watt	W
Densité de puissance	S	Watt par mètre carré	W/m²
Intensité électrique	I	Ampère	A
Champ électrique	E	Volt par mètre	V/m
Conductance électrique	G	Siemens	S
Conductivité	σ	Siemens par mètre	S/m
Permittivité électrique	E ou ϵ	Farad par mètre	F/m
Résistance électrique	R	Ohm	Ω
Résistivité	ρ	Ohm par mètre	Ω/m
Champ magnétique	B	Ampère par mètre	A/m
Champ d'induction magnétique	H	Tesla	T
Perméabilité magnétique	μ	Henry par mètre	H/m

CONSTANTES

c	Vitesse de la lumière
h	Constante de Planck

PREFIXES

f	femto- (10^{-15})	k	kilo- (10^3)
p	pico- (10^{-12})	M	méga- (10^6)
n	nano- (10^{-9})	G	giga- (10^9)
μ	micro- (10^{-6})	T	téra- (10^{12})
m	milli- (10^{-3})		
c	centi- (10^{-2})		
d	déci- (10^{-1})		

INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, nous pouvons communiquer grâce aux téléphones mobiles. Ces téléphones sont également dits «cellulaires» car leur utilisation se fait dans des cellules géographiques au milieu desquelles se trouvent les émetteurs / récepteurs que sont les stations de base. Il y a actuellement plus d'un milliard de téléphones mobiles en usage dans le monde.

Parallèlement, le développement des télécommunications a été suivi par celui de la recherche sur les effets des champs électromagnétiques radiofréquences (RF) sur les systèmes biologiques. Les premiers travaux avaient débuté après la deuxième guerre mondiale, en particulier à cause des RADARS. La recherche a été relancée aux Etats-Unis, puis dans le monde entier, à partir d'une procédure judiciaire engagée en 1992 par un citoyen américain accusant le téléphone mobile d'être responsable d'une tumeur cérébrale dont sa femme était décédée. C'est la proximité de l'antenne avec la tête lors de la communication qui est responsable de ces questions quant à l'innocuité du téléphone mobile. Par ailleurs, l'explosion de la téléphonie mobile se répercute sur le nombre toujours grandissant des stations de base, notamment en agglomération, ce qui suscite également des craintes du public. L'impact sur la santé de la téléphonie mobile anime aujourd'hui réflexions et inquiétudes. Certains citoyens ont même formé des associations de protection à l'égard des radiofréquences comme « l'association Robin des toits ».

Une partie des axes de recherche est consacrée aux mécanismes biologiques qui pourraient relier le développement de processus de cancérogenèse à l'exposition des cellules humaines aux champs électromagnétiques.

Ce travail a pour but d'étudier l'interaction des ondes électromagnétiques (OEM) utilisées par la téléphonie mobile avec les cellules humaines en s'intéressant plus particulièrement aux potentiels effets génotoxiques de ces ondes. Les lésions génomiques peuvent constituer des facteurs initiateurs ou promoteurs d'un processus cancérogène. Lorsque la molécule d'ADN est endommagée, s'ensuit une activation des voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN. Si les lésions sont trop importantes, la cellule est dirigée vers une mort cellulaire programmée ou apoptose. La persistance de lésions génomiques non ou mal réparées peut conduire à une instabilité génomique qui pourra évoluer vers un processus tumoral.

Nos investigations ont porté sur l'étude d'une éventuelle génotoxicité des ondes présentant les caractéristiques de la téléphonie mobile (radiofréquences de type GSM-900) sur des amniocytes humains exposés *in vitro* pendant 24 heures à différents niveaux de puissance.

L'effet génotoxique a été évalué selon trois approches par (1) l'étude des lésions directes de l'ADN générées par des mécanismes clastogènes et aneuploïdogènes, en utilisant le caryotype et l'hybridation fluorescente *in situ*, (2) l'étude de l'expression et l'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation des lésions de l'ADN telles que les protéines p53 et H2AX par western blot et (3) l'étude certaines réponses cellulaires aux lésions de l'ADN et en particulier l'apoptose par la détection du clivage de la caspase 3 par western blot.

Avant de détailler nos travaux, nous exposerons brièvement des rappels physiques sur les ondes électromagnétiques et notamment celles utilisées par la téléphonie mobile et des rappels biologiques sur les lésions de l'ADN et les voies de signalisation conduisant aux réponses cellulaires et enfin sera abordée l'éventuelle génotoxicité des radiofréquences et les méthodes utilisées pour l'évaluer.

**INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. LES ONDES DE LA TELEPHONIE MOBILE

A. Généralités sur les ondes électromagnétiques

1. Caractéristiques physiques des ondes électromagnétiques

L'**onde électromagnétique** est le modèle utilisé pour représenter les rayonnements électromagnétiques. Elle correspond à l'oscillation couplée d'un champ électrique et d'un champ magnétique, l'un étant perpendiculaire à l'autre, qui se propagent en ligne droite à partir d'une source constituée par un mouvement alternatif de charges électriques (Figure 1). L'analyse spectrale permet de décomposer cette onde en ondes monochromatiques de longueurs d'onde et de fréquence différentes.

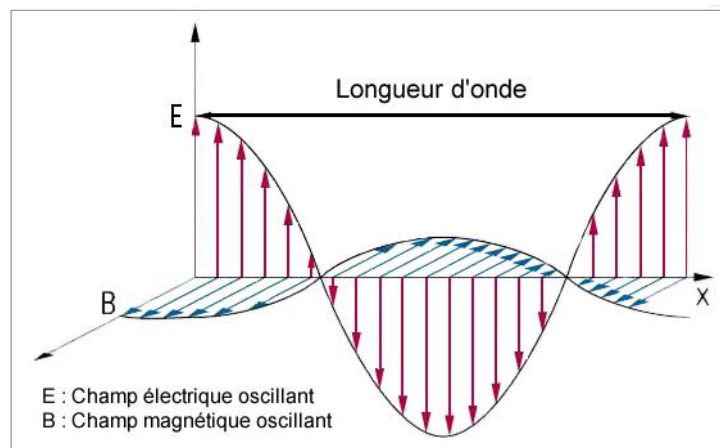


Figure 1. Onde électromagnétique

L'onde électromagnétique monochromatique est également associée à **un corpuscule de masse nulle, le photon** « portant » une quantité d'énergie déterminée. Le photon est le quantum associé à la force électromagnétique.

Les ondes électromagnétiques sont caractérisées par plusieurs grandeurs physiques dont les principales sont les suivantes :

La longueur d'onde d'une onde électromagnétique périodique est la distance séparant deux crêtes successives de cette onde périodique. Elle est notée *lambda* (λ) et s'exprime en mètre (m). La longueur d'onde est inversement proportionnelle à la fréquence.

La fréquence est le nombre d'oscillations de l'onde électromagnétique par seconde. Elle est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Elle est notée ν et s'exprime en hertz (Hz).

La fréquence et la longueur d'onde sont reliées ainsi :

$$\lambda = c/\nu$$

λ est la longueur d'onde en mètre (m)

ν est la fréquence de l'onde exprimée en Hertz (Hz)

c est la vitesse de la lumière dans le vide avec $c = 299792458 \text{ m.s}^{-1}$

L'intensité du champ électrique E en un point donné s'exprime en Volts par mètre (V/m). Il est créé par la présence de charges électriques.

L'intensité du champ magnétique H s'exprime en Ampère par mètre (A/m) et le champ d'induction magnétique B est exprimé en Tesla (T). Ils découlent du déplacement des charges électriques. Dans l'air, l'induction et le champ magnétique sont reliés ainsi $1 \text{ A/m} = 1,27 \mu\text{T}$.

A tout phénomène électromagnétique est associée une énergie potentielle, appelée **énergie électromagnétique**, notée E . Elle s'exprime en joules (J) dans le système international. Elle peut être également exprimée en électronvolt (eV) avec $1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$.

D'après les équations de Maxwell, la densité d'énergie électromagnétique ou w dans le vide est :

$$w = \frac{1}{2} \epsilon_0 \vec{E}^2 + \frac{1}{2\mu_0} \vec{B}^2$$

ϵ_0 est la permittivité électrique du vide avec $\epsilon_0 = 8,854187817 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$

μ_0 est la perméabilité magnétique du vide avec $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} = 12,566370614 \cdot 10^{-7} \text{ N.A}^{-2}$

\vec{E} est le vecteur champ électrique

\vec{B} est le vecteur champ magnétique

Dans le cas d'une onde électromagnétique, cette énergie se déplace. A partir des équations de Maxwell, on déduit que le flux d'énergie est donné par le vecteur de Poynting :

$$\vec{\pi} = \frac{1}{\mu_0} \vec{E} \wedge \vec{B}$$

Cette énergie est transportée par les photons. Le quantum d'énergie chargée (ou énergie du photon) dépend de la longueur d'onde ou de la fréquence selon la formule de Planck :

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

ν est la fréquence de l'onde exprimée en Hertz (Hz)

h est la constante de Planck avec $h = 6,62606876 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$

λ est la longueur d'onde en mètre (m)

c est la vitesse de la lumière avec $c = 299792458 \text{ m.s}^{-1}$

La puissance est la quantité d'énergie fournie par un système à un autre par unité de temps. Elle correspond à un débit d'énergie. Elle s'exprime en watt (W) dans le système international avec $1 \text{ W} = 1 \text{ J/s}$.

2. Spectre électromagnétique

Un spectre électromagnétique est la décomposition d'un rayonnement électromagnétique en fonction de ses différentes composantes en termes de longueur d'onde, ou de manière équivalente, de fréquence ou d'énergie de ses photons. Les trois grandeurs fréquence (ν), énergie (E) et longueur d'onde (λ) sont liées par la constante de Planck h et la vitesse de la lumière c (cf. formules ci-dessus).

Les différentes ondes électromagnétiques sont désignées par différents termes pour des raisons historiques, à savoir par ordre de longueur d'onde croissante ou d'énergie quantique décroissante : les rayons cosmiques, les rayons gamma, les rayons X, la lumière visible, les ondes infrarouges, les micro-ondes, les ondes radios et les ondes basses fréquences (Tableau 1 et Figure 2).

Tableau 1. Spectre électromagnétique en fonction des longueurs d'onde et des fréquences

Domaine	Longueurs d'ondes	Fréquences
Rayons cosmiques	< 10 pm	
Rayons γ	100 à 10 pm	
Rayons X	10 nm à 100 pm	
Ultraviolets	380 à 10 nm	
Lumière visible	750 à 380 nm	
Infrarouge	1 mm à 750 nm	
Micro-ondes	1 mm à 30 cm	1 GHz à 300 GHz
Ondes radio	30 cm à 1 km	300 kHz à 1 GHz
Basses fréquences	> 1 km	< 300 kHz

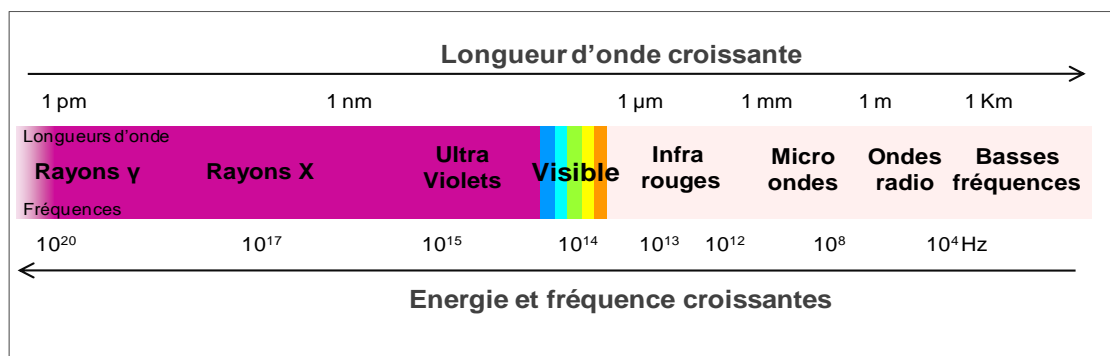


Figure 2. Spectre électromagnétique

Les rayons γ sont produits par désintégration γ ou par des transitions nucléaires telles que l'annihilation d'une paire électron-positron. Ils sont émis par les matériaux radioactifs et les réacteurs nucléaires.

Les rayons X sont produits par des transitions électroniques. Ils peuvent être générés par la radioactivité (photons de fluorescence), le freinage d'électrons (tube à rayons X) ou par le rayonnement synchrotron (déviations de faisceaux d'électrons par un champ magnétique). On distingue les rayons X durs correspondant à des photons de haute énergie et les rayons X mous à des photons de plus faible énergie.

Les rayons ultra-violet (UV) sont souvent divisés en UV-A (380-315 nm), UV-B (315-280 nm) et UV-C (280-10 nm).

La lumière visible ou spectre visible est la partie du spectre électromagnétique visible pour l'œil humain (380-750 nm).

Le rayonnement infrarouge (IR) est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière visible. Elle est comprise entre 750 nm et 1 mm. Les infrarouges sont divisés en IR proches (0,75-5 μm), IR moyens (5-30 μm) et IR lointains (30-1000 μm). Les rayonnements IR sont utilisés dans les équipements de vision de nuit, les fibres optiques, les RADARs.

Les rayonnements UV, la lumière visible et les infrarouges sont produits lors des transitions électroniques des électrons périphériques des atomes, ainsi que par les rayonnements thermiques.

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques de longueurs d'onde intermédiaire entre l'infrarouge et les ondes radio. Les longueurs d'ondes s'étendent d'environ 10 cm (soit 3 GHz) à 1 mm (300 GHz). Elles sont utilisées par les fours à micro-ondes, les RADARs, la télévision par câble, la téléphonie mobile. Le spectre des micro-ondes peut être divisé en bandes de fréquence (Tableau 2).

Tableau 2. Bandes de fréquence des micro-ondes ou hyperfréquences

Désignation	Fréquences	Longueurs d'ondes
Bande L	1-2 GHz	15-30 cm
Bande S	2-4 GHz	7,5-15 cm
Bande C	4-8 GHz	3,75-7,5 cm
Bande X	8-12 GHz	2,5-3,75 cm
Bande Ku	12-18 GHz	1,6-2,5 cm
Bande K	18-26 GHz	1,15-1,66 cm
Bande Ka	26-40 GHz	0,75-1,15 cm
Bande Q	30-50 GHz	0,6-1 cm
Bande U	40-60 GHz	0,5-0,75 cm
Bande V	46-56 GHz	0,53-0,65 cm
Bande W	56-100 GHz	0,3-0,53 cm

Les ondes radio ou ondes radioélectriques sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 9 kHz et 3000 GHz (correspondant à une longueur d'onde comprise entre 33 km et 0,1 mm). Une onde radio est caractérisée par sa fréquence et l'ensemble des fréquences constitue le spectre radiofréquence (Tableau 3). Les ondes radio sont produites par des courants électriques de haute fréquence.

Tableau 3. Spectre radiofréquence

Désignation	Fréquences	Longueurs d'ondes
ELF (extremely low frequency)	3-30 Hz	100000-10000 km
SLF (super low frequency)	30-300 Hz	10000-1000 km
ULF (ultra low frequency)	300-3000 Hz	1000-100 km
VLF (very low frequency)	3-30 kHz	100-10 km
LF (low frequency)	30-300 kHz	10-1 km
MF (medium frequency)	300-3000 kHz	1 km- 100 m
HF (high frequency)	3-30 MHz	100-10 m Ondes courtes
VHF (very high frequency)	30-300 MHz	10-1 m Ondes métriques
UHF (ultra high frequency)	300-3000 MHz	100-10 cm Ondes décimétriques
SHF (super high frequency)	3-30 GHz	10-1 cm Ondes centimétriques
EHF (extremely high frequency)	30-300 GHz	1 cm-1 mm Ondes millimétriques

Les ondes radio et les ondes de basse fréquence sont caractérisées habituellement par la fréquence, la lumière par la longueur d'onde. A partir des rayons X, les particules sont très énergétiques et correspondent aux photons X ou γ . Cette énergie est exprimée en électronvolt (eV), soit l'énergie d'un électron accéléré par un potentiel de 1 volt.

Les rayonnements ionisants (ou radiations ionisantes), comme les rayons X et les rayons gamma sont des radiations qui présentent suffisamment d'énergie ($> 12,9$ eV) pour libérer un ou plusieurs électrons d'un atome ou même scinder totalement un atome ou une molécule, produisant ainsi des particules électriquement positives ou négatives (ions).

Les autres rayonnements sont non ionisants. Ils sont responsables des transitions vibrationnelles, rotationnelles et électroniques dans les atomes.

B. Radiofréquences et téléphonie mobile

Depuis les années 2000, la téléphonie mobile s'est développée de manière considérable. Elle utilise des ondes électromagnétiques dans une gamme de fréquence définie, les radiofréquences (RF). Ces radiofréquences sont utilisées pour d'autres applications telles que les fours micro-ondes, l'imagerie par résonance magnétique (IRM)...

Afin d'évaluer les effets sur la santé des radiofréquences, il est nécessaire de rappeler les bases physiques des radiofréquences, le principe de la téléphonie mobile et les mécanismes d'interaction des radiofréquences avec les organismes vivants.

1. Aspect physique des radiofréquences

Les radiofréquences utilisées par la radiocommunication sont caractérisées par une bande de fréquence qui s'étend de 9 kHz à 3000 GHz. La téléphonie mobile utilise une bande de fréquences plus étroites s'étendant généralement de 300 MHz à 3 GHz. Les radiofréquences sont donc des rayonnements électromagnétiques non ionisants et de très faible énergie.

Pour les radiofréquences, les caractéristiques des champs électrique et magnétique constituent des propriétés physiques importantes caractérisées par les paramètres physiques suivants :

- L'intensité du champ électrique E (en V/m)
- L'intensité du champ magnétique H (en A/m) et le champ d'induction magnétique B (en T).
- La densité de puissance S représente la puissance par unité de surface en un lieu donné par rapport à l'émetteur. Elle est inversement proportionnelle au carré de la distance par rapport à la source. Elle décroît donc d'autant plus rapidement que l'on s'éloigne

de la source. Elle est proportionnelle au produit du champ électrique et du champ magnétique. Elle s'exprime en Watt par mètre carré (W/m²). Dans le vide, la densité de puissance se définit ainsi :

$$S = E.H = \frac{E^2}{377} = 377.H^2$$

2. Aspect technologique : la communication radioélectrique

a) Principe de la communication radioélectrique

Les télécommunications et les communications radioélectriques sans fil utilisent l'onde électromagnétique comme support pour transmettre l'information d'un émetteur jusqu'à un récepteur. Ces informations peuvent être la voix, des images et des vidéos. Le principe d'une transmission radioélectrique repose sur la transformation du signal à transmettre en une onde électromagnétique. Ainsi, le système électronique d'émission transforme le signal à transmettre en signal électrique, que l'antenne d'émission envoie dans l'espace sous forme d'onde électromagnétique. L'antenne de réception transforme alors les ondes reçues en un signal électrique et en données numériques ou analogiques correspondant au signal émis.

Le téléphone mobile transforme la voix en ondes électromagnétiques (radiofréquences) qui se propagent par l'intermédiaire de l'antenne du téléphone jusqu'à l'antenne relais (ou station de base). Chaque station de base couvre une portion du territoire constituant une « cellule », d'où le nom de téléphonie cellulaire. La dimension des cellules varie de quelques centaines de mètres en milieu urbain à quelques kilomètres en milieu rural. La station de base assure la communication avec les téléphones mobiles situés dans la cellule au moyen d'une antenne en réalisant une liaison bilatérale, en émission et en réception. Les antennes du téléphone et de la station de base constituent à la fois des émetteurs et des récepteurs.

b) Les systèmes utilisés

Les systèmes utilisés par la téléphonie mobile sont standardisés en fonction des pays et des régions. Ils diffèrent principalement par leur bande de fréquence, leur protocole d'accès et les techniques de modulation et de démodulation. Ces protocoles et ces modulations dépendent de la nature des données à transmettre, des performances souhaitées (débit) et des contraintes techniques (bande de fréquence utilisée, puissance maximale d'émission, distance entre l'émetteur et le récepteur...).

- Le tableau suivant résume les principaux systèmes utilisés et leurs principales caractéristiques en fonction de leur protocole d'accès et de leur bande de fréquence (Tableau 4) :

Tableau 4. Principaux systèmes utilisés par la téléphonie mobile

Système	Fréquence (MHz)	Protocole d'accès	Modulation d'enveloppe	Puissance maximale du mobile	Puissance de la station de base
Tetrapol	400	AMRF (FDMA)	NON		
TETRA	400	AMRT (TDMA)	OUI	1-3 W	10-40 W
GSM 900 (2G) GPRS (2,5G) EDGE	900	AMRF/AMRT (TDMA)	OUI	2 W crête (250 mW moyen)	10 – 20 W
GSM 1800 GPRS (2,5G) EDGE	1800	AMRT (TDMA)	OUI	1 W crête (125 mW moyen)	10 – 20 W
UMTS (3G)	2000	AMRC (WCDMA)	NON	< 200 mW	10 – 20 W

TETRA : Terrestrial Enhanced Trunk Radio System

GSM : Global System for Mobile Communication

GPRS : General Packet Radio Service

EDGE : Enhanced Data Rate for GSM Evolution

UMTS : Universal Mobile Telecommunications System

En Europe, les systèmes de 2^{ème} génération (2G) utilisent le système Tétrapol et TETRA pour les réseaux radioélectriques indépendants et le GSM 900 et le GSM 1800 pour les réseaux de téléphonie publique. Le système GPRS (intégrés au système GSM) et le système EDGE sont une évolution du système GSM et constituent la génération dite 2,5 (2,5G). Le système UMTS de 3^{ème} génération (3G) permet les applications multimédia.

Au Japon et en Amérique du Nord sont développés les systèmes UMTS centrés autour de 2 GHz.

A côté de la téléphonie mobile, se sont développés des systèmes de communication sans fil complémentaires tels que le Bluetooth (2,45 GHz) et les réseaux locaux sans fil (WIFI à 2,45 GHz). Ces systèmes sont destinés aux liaisons à courte distance et à débit élevé.

- **L'émission du signal** peut être **continue** (CW ou « continuous waves »), ou bien elle peut être **discontinue** (modulée ou pulsée). Lorsque l'émission est pulsée (PW ou « pulsed waves »), le rayonnement est émis par des impulsions de durée très courte. Ces impulsions sont généralement émises de manière répétée avec une fréquence de répétitions f_r (Hz).

- **La modulation du signal.** Un signal correspond à une onde de forme sinusoïdale caractérisée par son amplitude, sa phase et sa fréquence. L'émission d'une onde purement sinusoïdale ne permet la transmission d'aucune information. La transmission d'un signal nécessite de faire varier des paramètres caractérisant cette sinusoïde, c'est le processus de modulation. On distingue deux grandes catégories de modulation : la modulation analogique où le signal est transmis en faisant varier les paramètres physiques de l'onde

électromagnétique et la modulation numérique où les données sont transmises sous forme de valeurs binaires. Pour la modulation analogique, on fait varier le signal à moduler, appelé porteuse $s(t)$ par un signal modulant $e(t)$. Selon le paramètre du signal modulé, on distingue :

- Modulation d'amplitude (AM) : l'amplitude de la porteuse de fréquence fixe varie et est modulée par un signal de basse fréquence (Figure 3). Elle est utilisée dans les transmissions codées en Morse ou dans le cas d'ondes émises par les RADARS à impulsions.
- Modulation de fréquence (FM) : la fréquence de la porteuse d'amplitude constante varie (Figure 3). Elle est utilisée par la téléphonie mobile.

De même, la modulation d'un signal numérique peut porter sur l'amplitude (ASK) et la fréquence (FSK).

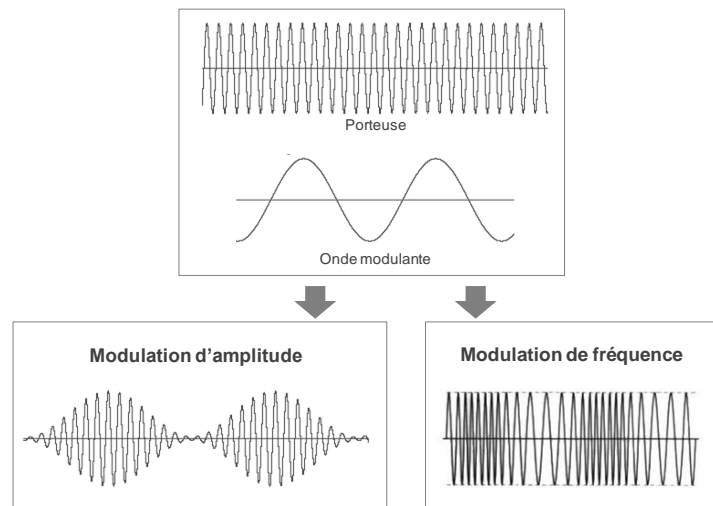


Figure 3. Modulations d'amplitude et de fréquence

Lorsque l'émission est pulsée ou modulée, il est nécessaire de différencier la puissance maximale, appelée puissance crête, et la puissance moyenne résultant de la modulation.

• **Les modalités du protocole d'accès.** L'information est transmise entre l'émetteur et le récepteur selon des protocoles d'accès. Les protocoles d'accès permettent d'optimiser la façon dont les ressources radio disponibles sont allouées entre plusieurs utilisateurs. Trois protocoles d'accès sont utilisés à savoir, l'AMRF, l'AMRT et l'AMRC (Figure 4).

- **Accès multiple par répartition de fréquence (AMRF) ou FDMA en anglais.** C'est la méthode d'accès multiple la plus utilisée. Elle permet de différencier les utilisateurs par une simple différenciation fréquentielle. Ce protocole d'accès implique l'usage de deux fréquences, qualifié de « duplex fréquentiel » : une transmission en voie unidirectionnelle « ascendante » du mobile vers la station de base et une transmission en voie « descendante » de la station de base vers le téléphone mobile.

- **Accès multiple par répartition de temps (AMRT) ou TDMA en anglais.** C'est une méthode d'accès qui se base sur la répartition des ressources dans le temps. Chaque utilisateur émet ou transmet dans un intervalle de temps concret dont la périodicité est définie par la durée de la trame. Dans ce cas, pour écouter l'utilisateur N, le récepteur n'a qu'à considérer l'intervalle de temps N associé à cet utilisateur. La répartition temporelle est utilisée pour les systèmes GSM 900 et GSM 1800.
- **Accès multiple à répartition de code (AMRC) ou CDMA en anglais.** C'est la méthode d'accès la plus récente. Chaque utilisateur est différencié des autres utilisateurs par un code N qui lui a été alloué au début de sa communication. Pour écouter l'utilisateur N, le récepteur multiplie le signal reçu par le code N associé à l'utilisateur. Ce protocole d'accès ne présente pas le caractère pulsé des émissions du protocole AMRT.

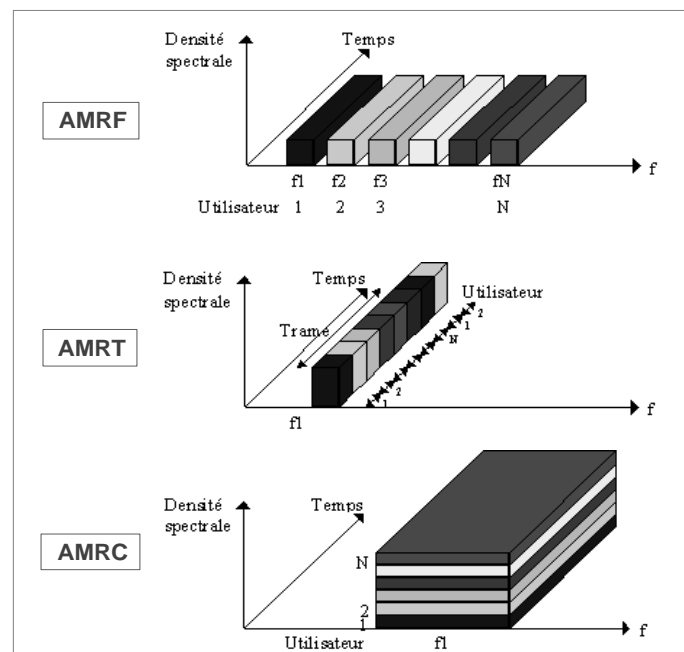


Figure 4. Les différents protocoles d'accès : AMRF, AMRT et AMRC

c) Les réseaux publics de téléphonie mobile

Les réseaux de téléphonie mobile sont des réseaux cellulaires construits à partir d'un ensemble de stations de base formées d'antennes d'émission et de réception. Chaque station de base émet dans une zone définie (cellule) et assure la communication avec les téléphones mobiles situés à l'intérieur de cette cellule. Les stations de base et les téléphones mobiles sont à la fois émetteurs et récepteurs. Deux protocoles d'accès existent en téléphonie mobile : le système GSM et le système UMTS.

- **Réseaux GSM.** En France, deux systèmes sont actuellement en place : le système GSM 900, développé par les opérateurs France télécom et SFR, et le système GSM 1800, plus

récent développé par l'opérateur Bouygues Telecom. Les réseaux GSM permettent de transmettre la voix et des messages courts de type SMS.

Le GSM combine l'AMRF à duplex fréquentiel et l'AMRT.

Dans le protocole d'accès AMRF, une fréquence est utilisée pour la voie ascendante et l'autre fréquence pour la voie descendante. Deux bandes de fréquence sont utilisées par le système GSM : pour le GSM 900, écart duplex de 45 MHz autour de 900 MHz et pour le GSM 1800, écart duplex de 95 MHz autour de 1800 MHz.

A l'intérieur de ces bandes de fréquence, une station de base dispose généralement de plusieurs canaux d'une largeur de 200 kHz lui permettant de « traiter » plusieurs utilisateurs.

- Un premier canal correspond à **la balise (BCCH)** qui est utilisée à des fins d'identification et de contrôle des mobiles situés dans la cellule. Ce premier canal ne fonctionne pas en mode « pulsé ». L'enveloppe de la porteuse du canal de balise est donc constante. Elle émet à puissance constante.
- D'autres canaux, de même largeur que celui de la balise, sont affectés au trafic, ce sont les **canaux de trafic (TCH)**. Le nombre de ces canaux, ainsi que le remplissage de ces canaux dépend du nombre d'utilisateurs. A l'intérieur de chaque canal, il existe un découplage temporel qui permet de partager le canal de 200 kHz entre plusieurs utilisateurs. Le protocole d'accès multiple AMRT permet à huit utilisateurs d'utiliser une même bande de fréquence, en la partageant dans le temps. Une communication entre un téléphone mobile et une antenne de station de base est transmise sous forme d'impulsions à raison d'une impulsion de durée 576 μ s toutes les 4,6 ms. La fréquence des impulsions (répétitions) est de 217 Hz (217 impulsions par seconde) et le rapport cyclique est de 1/8. Ainsi, un téléphone n'émet qu'un huitième du temps. Ceci permet à chaque canal d'être utilisé par huit utilisateurs simultanément. Lorsqu'un canal est incomplet (moins de 8 utilisateurs), il apparaît une modulation d'enveloppe de la porteuse modulée. Au contraire, un canal complet se présentera comme le canal de balise. La puissance des canaux de trafic varie en fonction du trafic.

Afin d'augmenter les débits et de développer les applications multimédia et internet, les systèmes GSM ont été complétés par des évolutions techniques telles que le système GPRS et le système EDGE.

• **Réseaux UMTS.** L'UMTS est la norme de téléphonie mobile cellulaire dite de troisième génération. Elle présente des débits de transmission important permettant de nouveaux usages tels que la connexion à internet, les services multimédia, le partage vidéo... Elle utilise deux évolutions techniques : W-AMRC combinant l'AMRC et l'AMRF et le TD-AMRC combinant l'AMRF, l'AMRT et l'AMRC. Les bandes (ou canaux) de fréquence d'émission

sont situées autour de 2100 MHz. Les canaux de fréquence présentent une largeur de 5 MHz. A l'intérieur de chaque canal, il existe un découplage par étalement de spectre en larges bandes (protocole d'accès AMRC ou multiplexage par code). Chaque canal peut traiter jusqu'à 64 communications. Les bandes (ou canaux) de réception sont situées autour de 1900 MHz.

d) Les téléphones mobiles

Les téléphones commercialisés fonctionnent en GSM 900, GSM 1800 et UMTS. Ce sont des téléphones bi-bandes ou tri-bandes. Les modèles se différencient par leur autonomie, leur encombrement et leur poids. L'autonomie maximale et le faible poids de la batterie seront permis par l'utilisation de la plus faible quantité d'énergie possible pour les communications, donc par une puissance minimale d'émission.

La puissance d'émission instantanée des téléphones est limitée à 2 W au maximum pour le GSM 900 et à 1 W pour le GSM 1800. L'émission par impulsions permet de diviser par 8 la puissance moyenne émise, soit 0,25 W pour le GSM 900 et 0,125 W pour le GSM 1800. Cette puissance d'émission est en outre régulée en fonction de la distance par rapport à la station de base (250 mW à plusieurs kilomètres et 10 mW à proximité). Il faut savoir que ces valeurs sont maximales car le mobile règle automatiquement sa puissance en fonction de la distance et la qualité de liaison avec la station de base. La plage de variation instantanée d'un téléphone de puissance maximale 2 W s'étend de 20 mW à 2 W, ce mécanisme est appelé « contrôle automatique de la puissance » ou « power control ».

La puissance émise par le téléphone dépend également du régime de fonctionnement. Il convient de distinguer plusieurs régimes pour les mobiles de type GSM :

- Régime de repos éteint : le mobile est éteint. Il n'émet aucun signal
- Régime de repos allumé (veille) : la station de base procède périodiquement à une localisation du mobile, à intervalles de temps réguliers. En réponse, le mobile émet quelques impulsions à un niveau de puissance maximum.
- Régimes transitoires (par exemple en phase d'appel ou de numérotation) : la puissance émise par le mobile est initialement maximale puis réduite progressivement au niveau minimum permettant d'obtenir une bonne qualité de liaison.
- Régime permanent fixe (conversation normale) : le mobile GSM émet une série de train d'impulsions d'une durée de 0,576 millisecondes chacune, avec une fréquence de répétition de 217 Hz.
- Régime permanent mobile (communication établie et déplacement du mobile) : l'amplitude du train d'impulsions varie sous l'effet du contrôle par la station de base.

Les variations de la puissance émise par le téléphone mobile se font dans un rapport de 1 à 100. Le passage d'une cellule à l'autre, c'est-à-dire le changement de cellule, s'accompagne également d'un ajustement de la puissance du mobile.

C'est lors de l'utilisation d'un mobile en situation de déplacement, ou encore lors d'une conversation dans un lieu à réception médiocre que l'exposition est la plus importante avec des niveaux de puissances élevés.

e) Les stations de base ou antennes relais

En France, environ 70000 stations de base couvrent l'ensemble du territoire pour les trois opérateurs de téléphonie mobile et pour les trois réseaux existants. Chaque station de base est constituée de plusieurs antennes relais en fonction des réseaux (GSM 900, GSM 1800, UMTS) et de la zone à couvrir. Les antennes sont placées en hauteur sur des pylônes, toits, terrasses, châteaux d'eau... La taille d'une cellule et donc le rayonnement d'émission d'une station de base dépend du territoire couvert et de la densité de communications transmises. On distingue plusieurs types de stations de base :

- Les stations macro cellulaires. Les plus courantes émettent à une puissance maximale de 20 à 30 W par bande de fréquence. En milieu rural, la puissance sera élevée pour couvrir des zones étendues (10-30 km) sur un nombre limité de bandes de fréquence utilisateurs, tandis qu'en milieu urbain, la puissance sera répartie sur de nombreuses bandes utilisateurs dans un périmètre restreint (500 m).
- Les stations micro cellulaires ont une puissance moindre et sont utilisées pour couvrir des zones peu étendues de forte densité utilisateurs, comme les gares et les zones commerciales.
- Les stations pico cellulaires sont installées à l'intérieur des bâtiments comme des bureaux.

Le faisceau d'énergie émis par l'antenne est directionnel, légèrement incliné avec une inclinaison d'environ 6° par rapport à l'horizon, et le faisceau n'atteint le sol qu'à une distance de 50 à 200 m selon la hauteur de l'installation (Figure 5). Dans la direction du maximum de rayonnement, le champ électrique s'atténue de manière inversement proportionnelle à la distance.

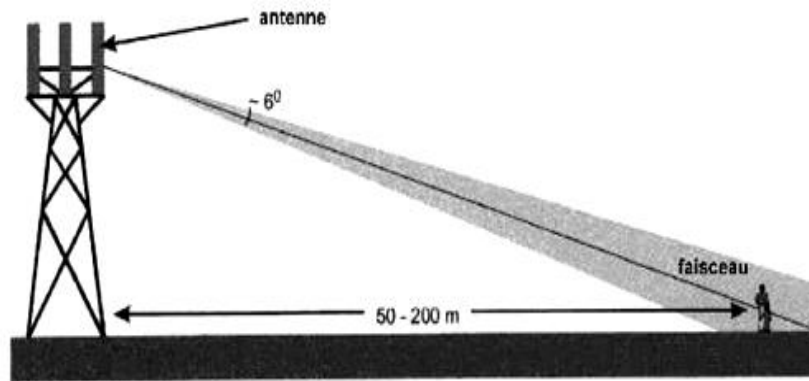


Figure 5. Emission du rayonnement électromagnétique par une station de base

Les niveaux de référence fixés par la recommandation européenne (1999/519/CE du 12 juillet 1999) et le décret français du 3 mai 2002 (2002-775) pour les champs électriques sont récapitulés dans le tableau 5.

Tableau 5. Niveaux de référence fixés par le décret du 3 mai 2002 (2002-775) transcrivant la recommandation européenne du 12 juillet 1999 (1999/519/CE)

	Gamme GSM 900 MHz	Gamme GSM 1800 MHz	Gamme UMTS 2100 MHz
Intensité du champ électrique en V/m	41	58	61
Intensité du champ magnétique en A/m	0,1	0,15	0,16
Densité de puissance en W/m ²	4,5	9	10

3. Aspect biologique : interaction avec les systèmes biologiques

a) Interaction des radiofréquences avec les milieux biologiques

Lorsque une onde incidente interagit avec un milieu, une partie est réfléchi (retour vers le milieu d'origine) et une partie est transmise dans le milieu. L'onde pénétrant dans le milieu va lui transférer une partie de son énergie. Cette perte d'énergie est liée aux phénomènes de dissipation de l'onde pouvant être à l'origine d'effets biologiques.

L'organisme humain est composé d'une grande diversité de tissus milieux biologiques ayant des propriétés différentes. Ces milieux biologiques peuvent être des liquides (sang, liquide céphalorachidien, urines) et des tissus de compositions cellulaires et hydro-électrolytiques variables. Ils sont riches en molécules électriquement chargées ou polaires (ions Ca²⁺, Na⁺, H₂O, protéines ...). L'interaction du système biologique avec les composantes magnétiques et électriques de l'onde dépend beaucoup des propriétés magnétiques et électriques des tissus.

L'organisme humain est considéré comme amagnétique. Les systèmes biologiques ne sont donc pas définis par la perméabilité magnétique (μ) qui est une mesure du degré de magnétisation en réponse à l'application d'un champ magnétique. Elle s'exprime ainsi :

$$\mu = \mu_r \times \mu_0$$

μ_0 est la perméabilité magnétique du vide avec $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} = 12,566370614 \cdot 10^{-7} \text{ N}\cdot\text{A}^{-2}$

μ_r est la perméabilité relative variant en fonction de la fréquence du champ

En revanche, compte tenu de la composition chimique des tissus biologiques, les champs électriques interagissent avec des éléments chargés ou présentant une simple polarité. Le champ électrique peut (i) déplacer les charges libres comme les ions (courant électrique), (ii) polariser les charges liées (formation de dipôles électriques), ou (iii) réorienter les molécules polarisées comme les acides aminés et les molécules d'eau. Cette interaction du champ électrique avec les systèmes biologiques conduit à la formation de dipôles électriques induits polarisés. L'importance relative de ces différents effets dépend des propriétés électriques de l'organisme humain. Afin de caractériser les propriétés électriques des tissus, on utilise généralement les paramètres de permittivité et conductivité électriques.

La conductivité du milieu est liée au contenu en charges libres qui peuvent être déplacées sous l'effet d'un champ électrique externe par le phénomène de conduction électrique. Elle inclut la conductivité statique ainsi que l'effet des pertes diélectriques. La conductivité σ s'exprime ainsi :

$$\sigma = \frac{1}{\rho}$$

σ est la conductivité du milieu (S/m)

ρ est la résistivité du milieu ($\Omega\cdot\text{m}$)

La permittivité électrique du milieu caractérise la propriété du milieu à être polarisé sous un champ électrique.

$$\varepsilon = \varepsilon_r \times \varepsilon_0$$

ε_0 est la permittivité électrique absolue ($\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$)

ε_r est la permittivité électrique relative.

Sous l'effet d'un champ électromagnétique de type radiofréquence, les dipôles permanents ou induits s'orientent selon la direction de la composante électrique. Lorsque le champ électrique varie sinusoidalement, les dipôles électriques présentent un mouvement oscillatoire. Ce mouvement local est appelé courant de déplacement.

Cependant, cette rotation des dipôles s'oppose à des forces de frottement et à l'agitation des atomes et molécules dues à la température ambiante. L'existence de ces forces s'opposant à

l'orientation des dipôles a une double conséquence, en particulier lorsque le champ électromagnétique est de haute fréquence (100 kHz à 300 GHz) :

- Afin de contrecarrer les forces de friction, une partie de l'énergie du champ électrique est transférée dans le milieu. L'énergie ainsi gagnée par les dipôles est cédée par collisions avec les molécules avoisinantes provoquant ainsi l'échauffement du tissu. C'est ainsi qu'une partie de l'énergie absorbée par le système biologique est convertie en énergie thermique et contribue à l'augmentation de la température du corps. Un diélectrique absorbant de l'énergie par ce mécanisme est qualifié de diélectrique à pertes. L'effet thermique est donc associé à des « pertes diélectriques » de l'énergie électromagnétique. Il est généralement accepté que le mécanisme de conversion de l'énergie électromagnétique en chaleur soit prépondérant aux fréquences inférieures à 1 GHz.
- L'orientation des dipôles s'effectue avec un certain retard. Ce retard est négligeable lorsque le champ électrique varie lentement. Cependant, lorsque la fréquence augmente, ils n'ont plus la capacité de suivre le changement d'orientation de la composante électrique, le retard se traduit par un déphasage conduisant à des pertes électriques. Il s'ensuit une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur.

La fréquence à partir de laquelle les pertes diélectriques deviennent prépondérantes varie en fonction du système biologique et dépend en particulier de la viscosité du milieu et des forces de liaison intramoléculaires et intermoléculaires. En raison de la structure parfois complexe des tissus biologiques, l'effet thermique des ondes électromagnétiques est finalement une combinaison en proportions différentes d'effets par conduction et d'effets par polarisation en fonction de la fréquence de l'onde. La perméabilité magnétique, la permittivité et la conductivité électrique des milieux biologiques sont dépendantes de la fréquence du champ électromagnétique. Elles varient considérablement d'un tissu à l'autre. Le tableau 6 récapitule les propriétés électriques de différents tissus à différentes fréquences.

Outre la fréquence, de nombreux paramètres physiques peuvent modifier les propriétés électriques des milieux biologiques : le taux d'hydratation, la température, l'âge du sujet ...

Tableau 6. Permittivité et conductivité de certains tissus biologiques
(d'après la thèse Laurent Bernard, 2007)

Tissu	10Hz		1kHz		100kHz		10MHz		1GHz	
	σ	ϵ_r	σ	ϵ_r	σ	ϵ_r	σ	ϵ_r	σ	ϵ_r
Aorte	0.25	10^7	0.31	1.5×10^5	0.31	1.5×10^5	0.34	1.1×10^2	0.73	4.5×10^1
Vessie	0.20	5.1×10^6	0.21	5.1×10^4	0.21	5.1×10^4	0.27	5.1×10^1	0.40	1.9×10^1
Sang	0.70	5.3×10^3	0.70	5.3×10^3	0.70	5.3×10^3	1.10	2.8×10^2	1.58	6.1×10^1
Vaisseau sanguin	0.25	10^7	0.31	1.5×10^5	0.31	1.5×10^5	0.34	1.1×10^2	0.73	4.5×10^1
Fluide corporel	1.50	9.9×10^1	1.50	9.9×10^1	1.50	9.9×10^1	1.50	7.0×10^1	1.67	6.9×10^1
Os spongieux	7.6×10^{-2}	10^7	8.2×10^{-2}	1.2×10^4	8.2×10^{-2}	1.2×10^4	0.12	7.1×10^1	0.36	2.1×10^1
Os compact	2.0×10^{-2}	5.5×10^4	2.0×10^{-2}	2.7×10^3	2.0×10^{-2}	2.7×10^3	4.3×10^{-2}	3.7×10^1	0.16	1.2×10^1
Moelle osseuse	9.8×10^{-4}	10^6	2.3×10^{-3}	5.6×10^3	2.3×10^{-3}	5.6×10^3	1.1×10^{-2}	1.9×10^1	4.3×10^{-2}	5.49
Matière grise cérébrale	2.8×10^{-2}	4.1×10^7	9.9×10^{-2}	1.6×10^5	9.9×10^{-2}	1.6×10^5	0.29	3.2×10^2	0.99	5.2×10^1
Matière blanche cérébrale	2.8×10^{-2}	2.8×10^7	6.3×10^{-2}	7.0×10^4	6.3×10^{-2}	7.0×10^4	0.16	1.8×10^2	0.62	3.9×10^1
Graisse mammaire	1.5×10^{-2}	1.2×10^7	2.4×10^{-2}	1.1×10^4	2.4×10^{-2}	1.1×10^4	2.8×10^{-2}	7.89	5.3×10^{-2}	5.41
Cartilage	0.16	2.0×10^7	0.17	3.2×10^4	0.17	3.2×10^4	0.37	1.8×10^2	0.83	4.2×10^1
Cervelet	4.8×10^{-2}	4.1×10^7	0.12	1.6×10^5	0.12	1.6×10^5	0.38	4.6×10^2	1.31	4.9×10^1
Liquide cérébro-spinal	2.00	1.1×10^2	2.00	1.1×10^2	2.00	1.1×10^2	2.00	1.1×10^2	2.46	6.8×10^1
Cervix	0.30	4.0×10^7	0.52	4.9×10^5	0.52	4.9×10^5	0.63	1.8×10^2	0.99	5.0×10^1
Colon	1.2×10^{-2}	4.0×10^7	0.23	4.5×10^5	0.23	4.5×10^5	0.49	2.7×10^2	1.13	5.7×10^1
Cornée	0.41	2.0×10^7	0.42	1.0×10^5	0.42	1.0×10^5	0.87	2.6×10^2	1.44	5.5×10^1
Duodenum	0.51	2.0×10^7	0.52	5.6×10^4	0.52	5.6×10^4	0.78	2.5×10^2	1.23	6.5×10^1
Dura	0.50	5.1×10^5	0.50	5.3×10^3	0.50	5.3×10^3	0.54	1.9×10^2	0.99	4.4×10^1
Sclera	0.50	2.6×10^6	0.50	5.5×10^4	0.50	5.5×10^4	0.80	2.1×10^2	1.21	5.5×10^1
Graisse	1.2×10^{-2}	8.0×10^6	2.2×10^{-2}	2.4×10^4	2.2×10^{-2}	2.4×10^4	2.9×10^{-2}	1.4×10^1	5.4×10^{-2}	5.45
Vésicule biliaire	0.90	6.1×10^3	0.90	6.0×10^2	0.90	6.0×10^2	0.90	9.9×10^1	1.29	5.9×10^1
Bile	1.40	1.2×10^2	1.40	1.2×10^2	1.40	1.2×10^2	1.40	1.2×10^2	1.88	7.0×10^1
Coeur	5.4×10^{-2}	2.4×10^7	0.11	3.5×10^5	0.11	3.5×10^5	0.50	2.9×10^2	1.28	5.9×10^1
Rein	5.4×10^{-2}	2.8×10^7	0.11	2.1×10^5	0.11	2.1×10^5	0.51	3.7×10^2	1.45	5.8×10^1

Tissu	10Hz		1kHz		100kHz		10MHz		1GHz	
	σ	ε_r	σ	ε_r	σ	ε_r	σ	ε_r	σ	ε_r
Cristallin	0.31	2.0×10^7	0.33	1.1×10^5	0.33	1.1×10^5	0.52	1.8×10^2	0.82	4.6×10^1
Foie	2.8×10^{-2}	1.5×10^7	4.1×10^{-2}	8.6×10^4	4.1×10^{-2}	8.6×10^4	0.32	2.2×10^2	0.90	4.6×10^1
Poumon gonflé	0.20	5.5×10^6	0.22	2.5×10^5	0.22	2.5×10^5	0.44	1.8×10^2	0.90	5.1×10^1
Poumon dégonflé	3.9×10^{-2}	3.2×10^7	8.0×10^{-2}	1.4×10^5	8.0×10^{-2}	1.4×10^5	0.23	1.2×10^2	0.47	2.2×10^1
Lymphé	0.51	2.0×10^7	0.52	5.7×10^4	0.52	5.7×10^4	0.72	1.6×10^2	1.08	5.9×10^1
Muqueuse	4.0×10^{-4}	5.8×10^4	6.6×10^{-4}	3.2×10^4	6.6×10^{-4}	3.2×10^4	0.37	2.2×10^2	0.88	4.6×10^1
Muscle	0.20	2.6×10^7	0.32	4.3×10^5	0.32	4.3×10^5	0.62	1.7×10^2	0.98	5.5×10^1
Ongle	2.0×10^{-2}	5.5×10^4	2.0×10^{-2}	2.7×10^3	2.0×10^{-2}	2.7×10^3	4.3×10^{-2}	3.7×10^1	0.16	1.2×10^1
Nerf	1.7×10^{-2}	2.0×10^7	2.9×10^{-2}	7.0×10^4	2.9×10^{-2}	7.0×10^4	0.22	1.6×10^2	0.60	3.2×10^1
Oesophage	0.51	2.0×10^7	0.52	5.6×10^4	0.52	5.6×10^4	0.78	2.5×10^2	1.23	6.5×10^1
Ovaire	0.31	2.0×10^7	0.32	5.4×10^4	0.32	5.4×10^4	0.46	2.9×10^2	1.34	5.0×10^1
Pancréas	0.51	2.0×10^7	0.52	5.7×10^4	0.52	5.7×10^4	0.72	1.6×10^2	1.08	5.9×10^1
Prostate	0.41	2.0×10^7	0.42	5.9×10^4	0.42	5.9×10^4	0.78	2.5×10^2	1.25	6.0×10^1
Rétine	0.50	2.6×10^6	0.50	5.5×10^4	0.50	5.5×10^4	0.80	2.1×10^2	1.21	5.5×10^1
Peau déshydratée	2.0×10^{-4}	1.1×10^3	2.0×10^{-4}	1.1×10^3	2.0×10^{-4}	1.1×10^3	0.20	3.6×10^2	0.90	4.1×10^1
Peau hydratée	4.0×10^{-4}	5.8×10^4	6.6×10^{-4}	3.2×10^4	6.6×10^{-4}	3.2×10^4	0.37	2.2×10^2	0.88	4.6×10^1
Intestin grêle	0.51	2.0×10^7	0.53	2.6×10^5	0.53	2.6×10^5	1.34	4.9×10^2	2.22	5.9×10^1
Nerf spinal	1.7×10^{-2}	2.0×10^7	2.9×10^{-2}	7.0×10^4	2.9×10^{-2}	7.0×10^4	0.22	1.6×10^2	0.60	3.2×10^1
Rate	4.0×10^{-2}	4.3×10^7	0.10	1.1×10^5	0.10	1.1×10^5	0.51	4.4×10^2	1.32	5.7×10^1
Estomac	0.51	2.0×10^7	0.52	5.6×10^4	0.52	5.6×10^4	0.78	2.5×10^2	1.23	6.5×10^1
Tendon	0.25	2.0×10^7	0.38	3.0×10^5	0.38	3.0×10^5	0.41	1.0×10^2	0.76	4.6×10^1
Testicule	0.41	2.0×10^7	0.42	5.9×10^4	0.42	5.9×10^4	0.78	2.5×10^2	1.25	6.0×10^1
Thymus	0.51	2.0×10^7	0.52	5.7×10^4	0.52	5.7×10^4	0.72	1.6×10^2	1.08	5.9×10^1
Thyroïde	0.51	2.0×10^7	0.52	5.7×10^4	0.52	5.7×10^4	0.72	1.6×10^2	1.08	5.9×10^1
Langue	0.26	2.0×10^7	0.27	5.8×10^4	0.27	5.8×10^4	0.57	2.1×10^2	0.98	5.5×10^1
Dent	2.0×10^{-2}	5.5×10^4	2.0×10^{-2}	2.7×10^3	2.0×10^{-2}	2.7×10^3	4.3×10^{-2}	3.7×10^1	0.16	1.2×10^1
Trachée	0.30	5.5×10^5	0.30	4.7×10^4	0.30	4.7×10^4	0.46	1.5×10^2	0.80	4.2×10^1
Utérus	0.20	3.5×10^7	0.49	9.2×10^5	0.49	9.2×10^5	0.75	3.2×10^2	1.31	6.1×10^1
Humeur vitrée	1.5	99	1.5	98.991	1.5	98.991	1.502	70.01	1.6673	68.875

Par ailleurs, l'absorption de l'énergie dépend des dimensions de la structure biologique, l'absorption de l'énergie étant maximale lorsque les dimensions de la structure sont de l'ordre de la moitié de la longueur d'onde. Pour le corps humain adulte, l'absorption sera maximale pour la bande de fréquence de 70 MHz à 100 MHz, correspondant à des longueurs d'onde de 3 à 4 m. Le tableau 7 fournit les différents types d'absorption selon la fréquence du champ électromagnétique.

Tableau 7. Absorption de l'énergie de l'onde électromagnétique selon la fréquence du champ électromagnétique

Bande de fréquences	Type d'absorption
< 100 kHz	Pas d'absorption
100 kHz – 20 MHz	Absorption dans le tronc, le cou et les jambes
20 MHz – 300 MHz	Haute absorption dans le corps entier Fréquence de résonance entre 70 et 100 MHz pour l'homme selon sa taille
300 MHz – qq GHz	Absorption non uniforme
10 GHz	Absorption en surface

En conclusion, l'interaction des champs électromagnétiques avec les tissus biologiques dépend des paramètres physiques du champ électromagnétique et des propriétés physiques du système biologique. Les principaux paramètres influençant cette interaction sont :

(1) Pour le champ électromagnétique :

- Fréquence
- Densité de puissance incidente
- Modulation du signal
- Distance et l'orientation par rapport à l'antenne ou l'émetteur

(2) Pour le système biologique :

- Propriétés électriques des tissus (permittivité et conductivité)
- Dimension, forme et orientation du système biologique

b) Dosimétrie et débit d'absorption spécifique

Lorsqu'un champ électromagnétique interagit avec un système biologique, une partie de l'énergie est réfléchiée et l'autre partie est absorbée. Il est néanmoins difficile d'établir une relation entre la mesure des champs électromagnétiques et les effets biologiques induits par l'interaction champ-tissu. Afin de quantifier le niveau d'exposition aux radiofréquences des utilisateurs de téléphonie mobile, le débit d'absorption spécifique (DAS ou SAR en anglais

pour « Specific Absorption Rate ») a été désigné comme paramètre dosimétrique de référence en 1981, par le « National Council on Radiation Protection and Measurements » (NCRP).

Le DAS est défini comme la dérivée temporelle de l'incrément d'énergie absorbée ou dissipée dans l'unité de masse d'un tissu exposé. Il s'exprime en watt par kilogramme (W/kg).

$$SAR = \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{\partial W}{\partial m} \right)$$

∂W correspond à l'incrément d'énergie déposé dans l'incrément de masse ∂m

∂t correspond à l'incrément de temps

Dans le cadre des radiofréquences, le DAS représente la quantité d'énergie absorbée convertie en chaleur par unité de masse de matière biologique exposée. Les formules suivantes lient le DAS au champ électrique ou à la variation de température du tissu exposé.

$$SAR = \frac{\sigma E^2}{\rho} = C_p \frac{\partial T}{\partial t}$$

E correspond à l'intensité du champ électrique en V/m

σ correspond à la conductivité du milieu en S/m

ρ correspond à la densité du tissu (masse volumique) en kg/m³

C_p correspond à la capacité calorifique du système biologique en J/kg K

$\partial T / \partial t$ correspond à la variation de température (en K) au cours du temps (en s)

Le DAS peut être déterminé lorsque l'organisme se trouve exposé en entier (corps entier) à une distance suffisante de la source, condition dite en champ lointain, ou lorsque le système biologique se trouve près de la source, condition dite en champ proche. La détermination de DAS pour l'exposition de l'organisme humain est difficile en champ proche et est réalisée au moyen de modèles simulés. Deux méthodes sont utilisées : (i) les méthodes théoriques avec une approche analytique et numérique et (ii) les méthodes expérimentales avec des prises de mesure. Deux méthodes de base permettent de mesurer le DAS : la première consiste à mesurer les changements de température induits par l'absorption d'énergie à condition que l'élévation de température soit linéaire par rapport au temps, la seconde méthode consiste à mesurer le champ électrique à l'aide de sondes implantables. La détermination du DAS en champ lointain est réalisée au moyen de méthodes théoriques analytiques.

Le DAS est utile pour déterminer les niveaux d'exposition et donc pour comparer les effets biologiques dans des conditions d'exposition différentes.

Le DAS permet également de définir les normes d'exposition dans le domaine de la santé publique. Les normes d'exposition sont basées sur le seuil thermique. Une valeur de DAS

égale à 4 W/kg provoque une augmentation de 1°C de la température corporelle chez l'homme. Par mesure de sécurité, la limite d'exposition a été fixée à 0,4 W/kg (DAS corps entier) en milieu professionnel. Un facteur d'abattement supplémentaire de 5 a été introduit pour calculer la limite d'exposition de la population générale, la limite du DAS corps entier est donc fixée à 0,08 W/kg. Il a été proposé des valeurs limites pour les expositions localisées. Le DAS local ne doit pas dépasser 2 W/kg pour la tête et le tronc et 4 W/kg pour les tissus périphériques tels que les membres. Cette valeur de DAS local est définie pour 10 g de tissus.

c) Effets biologiques des radiofréquences

Depuis de nombreuses années, les effets des ondes électromagnétiques sur la santé font l'objet d'un débat scientifique important. Le sujet de controverse principal réside dans l'éventualité d'effets mutagènes, tératogènes et cancérigènes après exposition à long terme aux RF.

Un organisme qui reçoit un rayonnement électromagnétique peut en réfléchir une partie et absorber le reste. Le rayonnement absorbé peut être à l'origine d'effet biologique.

Les effets biologiques correspondent à des changements d'ordre biochimique, physiologique ou comportemental qui sont induits dans une cellule, un tissu ou un organisme en réponse à une stimulation extérieure. Tout effet biologique ne représente pas une menace pour la santé de l'individu, il peut être une réponse adaptative normale du système biologique à cette stimulation.

Un effet sanitaire est un effet biologique perturbant le fonctionnement normal de l'organisme en sortant du cadre d'une réponse physiologique adaptative. Cet effet représente une menace pour la santé de l'individu.

Par ailleurs, l'énergie électromagnétique absorbée par les tissus biologiques est convertie en chaleur générant une élévation de température. Cette augmentation de température dépend de la densité de puissance incidente, des propriétés électriques du milieu biologique mais également des mécanismes de thermorégulation de l'organisme.

L'effet thermique provoque une élévation de température des tissus, résultat de la forte teneur en eau du corps humain.

Un effet athermique a lieu lorsque les processus de thermorégulation du système biologique permettent de maintenir la température corporelle proche ou égale à la température normale. Une cellule isolée ne possède pas de système de thermorégulation. Dans le cadre d'une étude *in vitro*, le transfert d'énergie conduira à une augmentation de température.

Les effets dits non thermiques ou spécifiques sont secondaires à l'interaction du champ électromagnétique avec le système biologique sans induire d'élévation de température.

Des études expérimentales ont permis de définir le seuil thermique : un DAS de 4 W/kg provoque une augmentation de 1°C de la température corporelle chez l'homme. Au dessous de cette valeur, le système de thermorégulation de l'organisme est capable de maintenir la température corporelle.

Afin d'étudier les effets biologiques spécifiques ou non thermiques des champs électromagnétiques, de nombreuses études ont été réalisées *in vivo* sur des animaux ou des humains et *in vitro* sur des cellules humaines, animales, végétales ou des bactéries en culture.

Les données disponibles concernant les effets des radiofréquences sont nombreuses. Elles concernent différents domaines de la biologie comme l'intégrité du génome, l'expression génique, la synthèse protéique, le stress oxydatif et la production de radicaux libres, l'apoptose, la prolifération cellulaire, la transformation cellulaire, l'immunologie, le système nerveux, le développement, la reproduction, la barrière hémato-encéphalique... Ces effets biologiques ont été largement synthétisés dans des rapports publiés par l'Afsset en 2003 et en 2009.

A ce jour, il reste difficile d'interpréter les effets publiés et de comparer les résultats en raison des divers moyens d'exposition utilisés (système d'exposition, fréquence d'exposition, modulation du signal...) et des différentes conditions d'exposition (modèle biologique, DAS, durée d'exposition, co-exposition...).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets génotoxiques des radiofréquences utilisées par la téléphonie mobile. Les paragraphes suivants sont destinés à présenter d'abord les voies de signalisation et les réponses cellulaires induites suite à des lésions de l'ADN, puis les méthodes d'étude de la génotoxicité complétées d'une revue de la littérature des quinze dernières années.

II. LESIONS DE L'ADN ET REPONSES CELLULAIRES

Les lésions de l'ADN, ainsi que les réponses cellulaires à ces lésions ont particulièrement été étudiées dans le cadre des effets biologiques des ondes électromagnétiques de type rayonnements ultra-violet et rayonnements ionisants (rayons X et rayons gamma). Ces rayonnements présentent une énergie suffisante pour endommager directement l'ADN par rupture des liaisons intramoléculaires. Des altérations de l'ADN peuvent également survenir de manière indirecte suite à la production d'espèces oxygénées réactives ou ROS (Frenkel, 1992 ; Camhi *et al.*, 1995).

Ce paragraphe présente les voies de signalisation moléculaire, ainsi que les réponses cellulaires induites suite à des lésions de l'ADN.

A. Rappels sur le matériel génétique

1. Structure du matériel génétique

L'ADN (acide désoxyribonucléique) constitue le matériel génétique, support de l'hérédité. La molécule d'ADN contient les informations nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme et à la reproduction de l'espèce. Le maintien de l'intégrité structurale du génome est important pour une bonne activité cellulaire et surtout la transmission de l'information génétique d'un individu à ses descendants ou d'une cellule à ses cellules filles.

L'ADN, formé de désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), est de structure bicaténaire (double brin) en forme d'hélice. Les désoxyribonucléotides sont formés d'un désoxyribose (ose), d'une base et d'un acide phosphorique. Les bases puriques sont l'adénine (A) et la guanine (G), les bases pyrimidiques sont la cytosine (C) et la thymine (T). Le désoxyribose et la base sont associés par une liaison N glycosidique. Les désoxyribonucléotides sont reliés entre eux par des liaisons 3'-5'-phosphodiester entre les désoxyriboses, pour former un brin d'ADN. Les deux brins d'ADN sont reliés par des liaisons hydrogène contractées entre les bases. L'appariement des bases s'établit entre l'adénine et la thymine par deux liaisons hydrogène (A = T) et par trois liaisons hydrogène entre la guanine et la cytosine (G ≡ C).

La chromatine est constituée d'ADN associé à des protéines, les protéines histones et les protéines non histones. Les histones permettent la condensation et la compaction de la chromatine, en particulier au cours de la mitose pour former les chromosomes.

2. Modification du matériel génétique au cours du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des phases par lesquelles passe une cellule entre deux divisions successives. Il comprend l'interphase pendant laquelle la cellule assure ses fonctions propres et se prépare à la division cellulaire, ou mitose, à l'origine de deux cellules filles qui recommencent à leur tour le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes comprend 4 phases de durée inégale :

- 1) la phase G1 (Gap 1 ou intervalle 1) suit la division de la cellule. La quantité d'ADN est de $2N$. Au cours de la phase G1, débutent les processus de transcription d'ARN et de synthèse protéique.
- 2) la phase S (Synthesis ou synthèse) correspond à la phase de synthèse de l'ADN. Au cours de la phase S a lieu la réplication de l'ADN aboutissant à la formation d'un brin d'ADN complémentaire identique. La quantité d'ADN double progressivement.
- 3) la phase G2 (Gap 2 ou intervalle 2) correspond à la phase de préparation de la cellule à la division cellulaire. Au cours de la phase G2 a lieu la synthèse de protéines nécessaires à la mitose et à la viabilité des deux futures cellules filles. La quantité d'ADN est de $4N$. La synthèse des ARN et des protéines débutée en phase G1 se continue en phase S et G2.
- 4) la phase M (Mitosis ou mitose) entraîne la répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles. Elle est divisée en 5 phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La mitose suivie de la cytodierèse aboutit à la division cellulaire. Au cours de la prophase et de la prométaphase, la chromatine se condense, s'enroule progressivement et se replie sur elle même pour former une structure plus compacte. Cette condensation se fait grâce à des phénomènes de phosphorylation (en particulier de l'histone H1). Les deux molécules d'ADN identiques issues de la réplication, se replient séparément pour donner deux chromatides identiques, les chromatides sœurs. Les deux chromatides, reliées entre elles au niveau du centromère, forment le chromosome. Au stade de métaphase de la mitose, les chromosomes, au maximum de leur condensation, sont facilement observables. Ils sont alignés sur la plaque équatoriale. Au cours de l'anaphase, les chromatides sœurs séparent et migrent aux pôles opposés de la cellule. Après la télophase et la cytodierèse, elles sont réparties dans deux cellules filles qui sont génétiquement identiques.

Une phase se trouve hors du cycle, c'est une phase de quiescence nommée G0.

Au cours d'un cycle cellulaire normal, le passage d'une phase à l'autre est strictement contrôlé au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire. Ils sont situés en G1, à la transition G1/S, en phase S et à la transition G2/M.

B. Lésions de l'ADN

1. Génotoxicité

Les stress susceptibles d'induire des lésions de l'ADN sont qualifiés de génotoxiques. Les stress génotoxiques peuvent être d'origine endogène et/ou exogène.

Les stress génotoxiques endogènes sont dus au métabolisme cellulaire normal qui représente une source de production d'espèces oxygénées réactives ou ROS (reactive oxygen species) délétères pour l'ADN. Les ROS sont les radicaux hydroxyles OH° et H° , le peroxyde d'hydrogène oxydant et les anions superoxydes. Ces espèces oxygénées réactives sont produites en particulier au cours des processus de respiration oxydative et de peroxydation des lipides (lipoperoxydation).

Les stress génotoxiques exogènes sont dus à des agents de l'environnement. Ils peuvent être de nature physique comme les radiations ionisantes (RI) et les rayonnements ultra-violets (UV), de nature chimique comme les agents chimiothérapeutiques (exemple : la bléomycine) ou de nature biologique comme les virus. Les effets génotoxiques des RI et UV ont largement été étudiés dans la littérature.

Parmi les agents génotoxiques, on distingue (i) les agents clastogènes provoquant des cassures simple brin ou double brin de l'ADN et des remaniements chromosomiques, (ii) les agents mutagènes à l'origine d'une augmentation de l'apparition de mutations génomiques et (iii) les agents aneuploïdogènes à l'origine de perte ou gain chromosomique par perturbation de l'appareil mitotique (fuseau mitotique) ou par cassures chromosomiques.

2. La nature des lésions de l'ADN

Les lésions de l'ADN sont de différente nature. Elles impliquent les modifications structurales des désoxyriboses (modification de la base et/ou de l'ose), de la structure de l'ADN (adduits et/ou pontages intra- ou interbrins et cassures simple ou double brins de l'ADN).

a) Modifications structurales des désoxyribonucléotides

Les bases azotées peuvent être détruites ou modifiées. Leurs modifications consistent en des désaminations, des méthylations, des échanges de bases mais elles subissent surtout des

hydroxylations suite à la formation d'hydropéroxydes et de radicaux OH° . Les bases pyrimidiques sont plus sensibles que les bases puriques. Les réactions les plus fréquentes sont l'hydropéroxydation de la thymidine et l'oxydation de la guanine. La formation de bases modifiées entraîne des distorsions de la molécule d'ADN. Les altérations de base sont généralement occasionnées par les espèces oxygénées réactives (ROS), les radiations ionisantes, mais également par des agents chimiques tels que les molécules chimiothérapeutiques (mitomycine C, adriamycine et psoralène), les agents alkylants (nitrosamines) et les analogues nucléotidiques utilisés dans les thérapies antivirales.

Les altérations du désoxyribose sont plus rares. Les sucres sont oxydés puis hydrolysés avec libération de la base. L'élimination de la base génère un site abasique.

b) Modifications structurales de l'ADN

Les modifications structurales de l'ADN sont secondaires à des pontages par liaisons covalentes (ou « cross linking » en anglais), à des adduits et à des mésappariements :

- Les pontages intrabrins par pontage intramoléculaire dans un brin d'ADN. Ce sont par exemple la formation de dimères de thymidine après une exposition à des rayonnements UV. Ils peuvent être également causés par certains médicaments antitumoraux (mitomycine C, cisplatine et psoralène) et les espèces oxygénées réactives.
- Les pontages interbrins par pontage entre brins d'ADN (pontage ADN-ADN). Ils sont engendrés par les radiations ionisantes, les espèces oxygénées réactives, les agents alkylants et certains médicaments antitumoraux.
- Les pontages entre un brin d'ADN et une protéine (pontage ADN-protéine). Ils sont essentiellement provoqués par les cancérigènes chimiques tels que l'aflatoxine B1, les hydrocarbures polycycliques et les amines aromatiques.
- Les adduits chimiques sont secondaires à l'insertion de produits d'addition. Ils sont essentiellement causés par les cancérigènes chimiques et les psoralènes, mais également par les ROS et les rayonnements UV.
- Les mésappariements et les insertions/délétions sont secondaires à des erreurs de l'ADN polymérase au cours de la réplication.

c) Cassures de l'ADN

Les cassures simple brin (CSB) interviennent au niveau de la liaison phosphodiester (entre le phosphate et le désoxyribose), ou fréquemment au niveau de la liaison N glycosidique (entre la base et le désoxyribose). Les extrémités cassées s'écartent de l'autre brin par rupture des liaisons hydrogènes entre les bases.

Les cassures double brin (CDB) correspondent à une rupture simultanée des deux brins d'ADN. Les deux brins de l'hélice d'ADN sont rompus et le risque de réarrangement par translocation et délétion est important.

Les cassures de l'ADN sont fréquemment induites par les rayonnements ionisants. Elles peuvent être également occasionnées par les ROS et les molécules chimiques antitumorales telles que la mitomycine C, le cisplatine et les psoralènes.

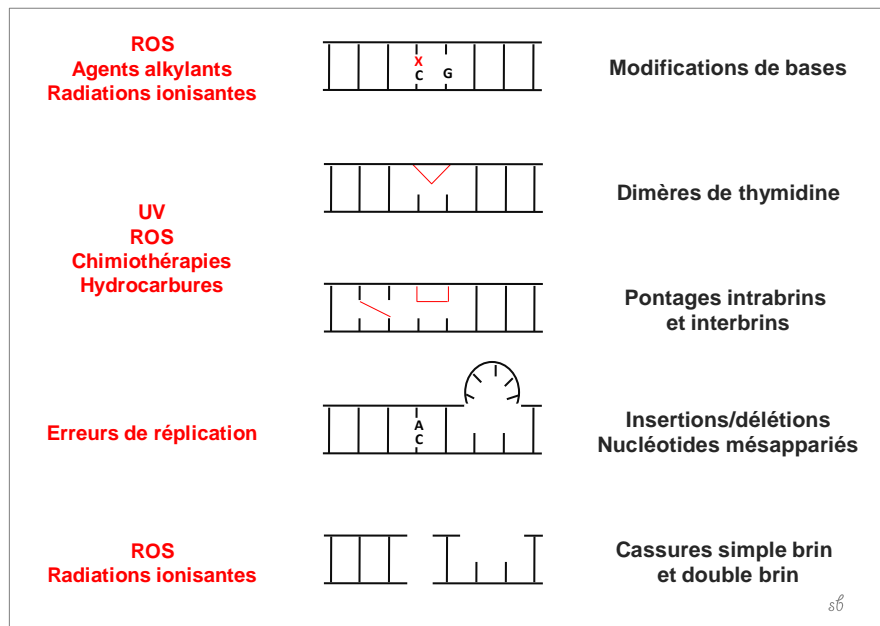


Figure 6. Les différents types de lésions de l'ADN

3. Conséquences cellulaires des lésions

Un organisme est continuellement soumis à des stress endogènes et exogènes qui peuvent provoquer des lésions des molécules d'ADN. Afin de maintenir l'intégrité du génome, les cellules mettent en place des mécanismes permettant de détecter et de réparer les lésions.

Suite à des lésions de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire des cellules en prolifération sont activés conduisant à un arrêt du cycle cellulaire afin de réparer l'ADN endommagé. Pour les cellules différenciées ne se divisant plus, la réparation de l'ADN est initiée directement. Lorsque l'ADN est complètement réparé, le cycle cellulaire reprend. En revanche, si les lésions ne sont pas réparables ou si elles sont trop importantes, le cycle cellulaire reste bloqué en permanence conduisant la cellule soit à l'apoptose, soit dans un état de sénescence ou de différenciation. Certaines lésions non détectées ne seront pas réparées générant des mutations et des instabilités du génome. L'accumulation de mutations non ou mal réparées peut conduire à plus ou moins long terme au développement d'une tumeur.

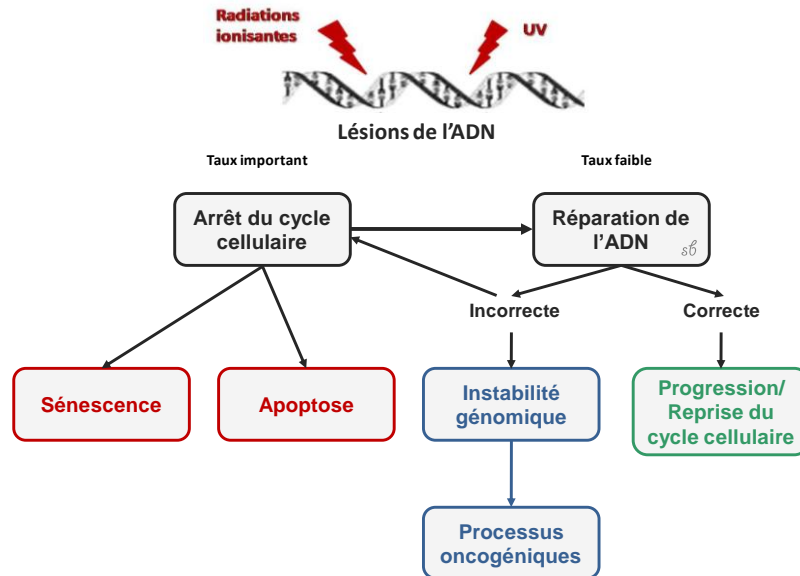


Figure 7. Les réponses cellulaires aux lésions de l'ADN

La protéine p53 joue un rôle central dans ces processus. Suite à un stress génotoxique, la protéine p53 est activée et agit en tant que facteur de transcription, en se liant à l'ADN et en stimulant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués, entre autres, dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, et/ou la réparation de l'ADN. La protéine p53 protège ainsi l'organisme de processus tumoraux, faisant de p53 le prototype des gènes suppresseurs de tumeur.

La protéine p53 est activée selon diverses voies généralement liées à la nature des lésions de l'ADN. Ces voies en amont de p53 ont abondamment été étudiées suite aux lésions provoquées par les radiations ionisantes et les rayonnements UV. Elles font intervenir des protéines de la famille des kinases possédant un domaine phosphatidylinositol 3-OH kinase ou PIKKs, dont les principales protéines sont ATM et ATR.

C. Les voies de signalisation des PIKKs : ATM et ATR

Les PIKKs (phosphatidylinositol 3-OH kinase-related kinases) sont des serine/thréonine protéine kinases. Elles présentent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine catalytique phosphatidyl inositol 3-OH kinases. Ces protéines vont phosphoryler des protéines cibles sur des résidus sérines et thréonines induisant une cascade de transduction du signal. Elles jouent un rôle clé dans la prolifération cellulaire et le contrôle de l'intégrité du génome. ATM (Ataxia Telangectiasa Mutated) et ATR (ATM and Rad3-Related protein kinase) sont des PIKKs impliquées dans la réponse précoce aux lésions de l'ADN. ATM joue donc un rôle important dans la réponse aux cassures double brin produites en particulier par les radiations

ionisantes. ATR est très important dans la réponse aux lésions de l'ADN non répliqué, aux cassures simple brin et aux stress réplcatifs.

DNA-PK (DNA-activated proteine kinase) appartient également à la famille des phosphatidylinositol 3-OH kinase-related kinases. Elle est formée de 3 sous-unités : la sous-unité catalytique DNA-PKcs et le dimère Ku70/Ku80 qui se lie à l'ADN et recrute la sous-unité catalytique au niveau de la lésion (Lee et Kim, 2002). DNA-PK est activée par les cassures double brin. Elle joue un rôle majeur dans la réparation des lésions de l'ADN par recombinaison non-homologue.

L'apparition de lésions de l'ADN et leur détection va conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation et/ou l'apoptose par l'activation d'une voie de signalisation dont ATM et ATR sont les principaux acteurs initiateurs. Les voies de signalisation des PIKKs impliquent des **senseurs ou détecteurs des lésions** qui reconnaissent les lésions de l'ADN, **des médiateurs** qui sont des protéines qui favorisent la capacité des PIKKs à phosphoryler leurs différents substrats et **des transducteurs** telles que les kinases Chk1 et Chk2 (ou Checkpoint kinase 1 et 2) qui transmettent le signal à des protéines effectrices situées en aval telles que Cdc25.

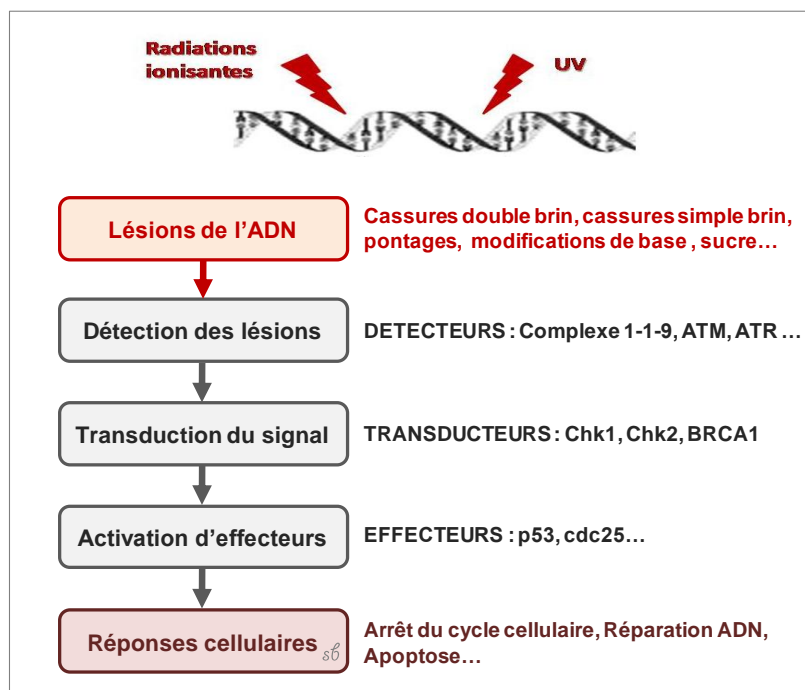


Figure 8. Etapes et acteurs de la réponse aux lésions de l'ADN

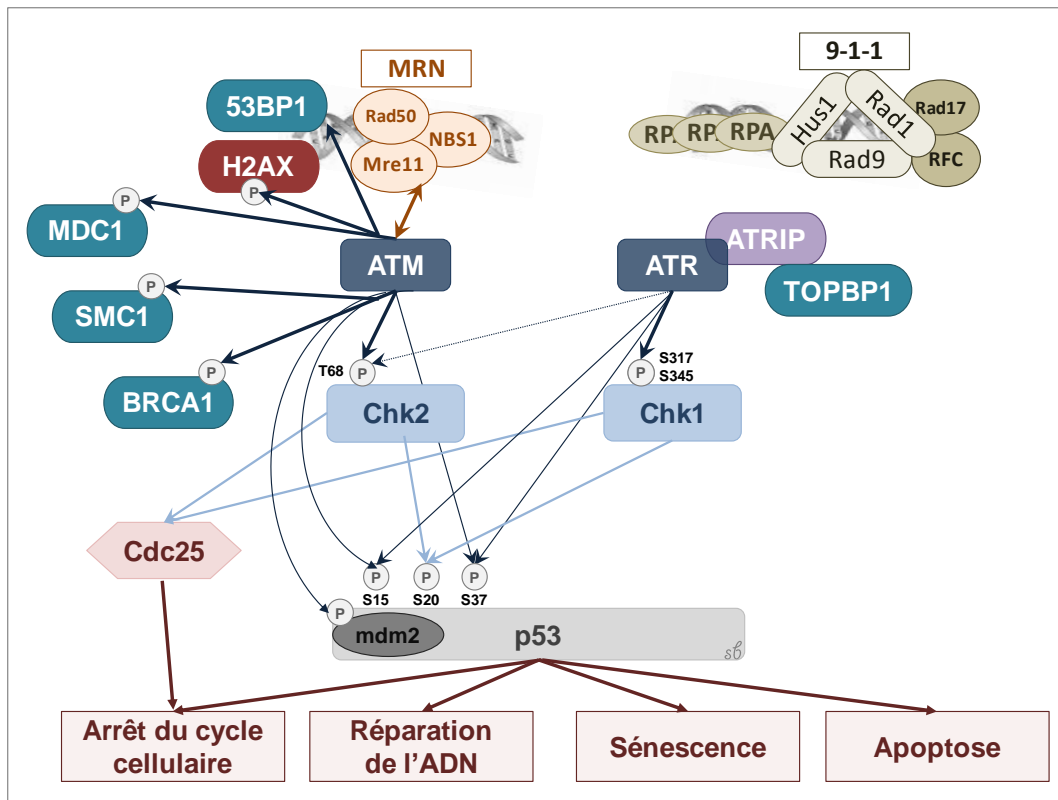


Figure 9. Les voies de signalisation des PIKKs suite à la détection de lésions de l'ADN

a) ATM et la voie des cassures double brin

La protéine ATM, de 370 Kda, est le produit d'un gène muté chez les patients atteints d'ataxie télangiectasie (AT), une maladie neurodégénérative progressive. Ces patients présentent une prédisposition tumorale et une radiosensibilité accrue, en particulier aux RI, secondaire à une déficience du système de réparation des cassures double brin et des points de contrôle du cycle cellulaire. ATM joue donc un rôle important dans la réponse aux cassures double brin (Figure 9).

Les cassures double brin, induites en particulier par les radiations ionisantes, sont détectées par le complexe MRN formé des protéines Mre11, Rad50 et NBS1 (Nismejen Breakage Syndrome 1) ou complexe Mre11/Rad50/NBS1. Ce complexe forme des foyers au niveau des lésions de l'ADN (Maser *et al.*, 1997) et recrute ATM au niveau des sites de cassures double brin de l'ADN. Le domaine C-terminal de NBS1 se lie à ATM (Falck *et al.*, 2005). Par ailleurs, ATM est présent sous forme de dimères inactifs dans les cellules non endommagées. En réponse à des RI, il s'active par autophosphorylation sur la sérine 1981, le dissociant en monomères actifs (Bakkenist and Kastan, 2003). Le mécanisme exact de l'autophosphorylation n'est pas bien connu. Le complexe MRN favorise la rétention d'ATM au niveau de la région endommagée, et stimule ainsi son activité en facilitant sa capacité à phosphoryler ses substrats cibles pour induire les réponses cellulaires (Houtgraaf *et al.*, 2006).

Les protéines phosphorylées sont des médiateurs, transducteurs et effecteurs intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou dans la réparation de l'ADN : p53 (Banin *et al.*, 1998), NBS1 (Lim *et al.*, 2000), BRCA1 (Xu *et al.*, 2002), SMC1 (Kim *et al.* 2002), 53BP1 (DiTullio *et al.*, 2002), Chk2 (McGowan, 2002), MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint) (Goldberg *et al.*, 2003) et H2AX (Stiff *et al.*, 2004).

Suite aux cassures double brin, une des premières cibles d'ATM est l'histone H2AX, un variant de l'histone H2A. ATM phosphoryle H2AX sur la sérine 139 pour générer la forme γ -H2AX qui forme des foyers ou agrégats nucléaires pouvant être visualisés par immunofluorescence au niveau des cassures double brin (Rogakou *et al.*, 1999). Le taux de disparition de ces foyers est corrélé au taux de réparation des cassures double brin (Riballo *et al.*, 2004). La phosphorylation d'H2AX permet le recrutement de médiateurs tels que MDC1 (Stewart *et al.*, 2003), 53BP1 (p53 binding protein 1) (Ward *et al.*, 2003) et BRCA1 (Breast cancer 1) (Paull *et al.*, 2000). MDC1 interagit avec NBS1, protéine du complexe MRN qui recrute et active ATM, lui-même générant encore plus de γ -H2AX, permettant de propager le signal des cassures double brin (Golberg *et al.*, 2003).

ATM phosphoryle également p53 sur les sérines 15 et 37. La phosphorylation de la sérine 15 participe à la stabilisation de p53. Par ailleurs, ATM est impliquée de manière indirecte dans la déphosphorylation de la sérine 376 de p53. Cette déphosphorylation crée un site de fixation pour une (ou des protéines) de la famille 14-3-3 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Wahl et Carr, 2002).

Mdm2 (Mouse double minute 2) est également un substrat d'ATM, la phosphorylation de Mdm2 sur la sérine 395 entraîne la dissociation du complexe p53 et Mdm2, protégeant ainsi p53 de sa dégradation cytosolique (Maya *et al.*, 2001 ; Wahl et Carr, 2002 ; Houtgraaf *et al.*, 2006).

Par ailleurs, ATM active Chk2 par phosphorylation sur sa thréonine 68.

b) ATR et la voie de l'ADN simple brin

La protéine ATR est très importante dans la réponse aux lésions de l'ADN non répliqué, aux lésions induites par les UV comme les dimères de thymidine et dans la réponse aux stress répliatifs tels que l'exposition à des inhibiteurs de la réplication comme l'hydroxyurée (HU). Son rôle est secondaire dans la réponse aux cassures double brin induites par les RI. ATR est activée durant la phase S pour réguler les origines de réplication et la réparation des anomalies aux fourches de réplication, ainsi que pour éviter l'entrée prématurée en mitose (Shechter, *et al.*, 2004).

ATR est activée en réponse à de très nombreuses lésions de l'ADN. L'ensemble de ces lésions est capable de générer une structure intermédiaire d'ADN simple brin. Cet ADN simple brin est recouvert par la protéine RPA (replication protein A) qui recrute ATR au niveau des régions endommagées de l'ADN. Cependant, l'activation d'ATR liée au complexe RPA-ADN simple brin, nécessite l'interaction d'ATRIP (ATR-interacting protein) (Cortez *et al.*, 2001) et du complexe 9-1-1. Le recrutement d'ATR-ATRIP et du complexe 9-1-1 sont indépendants l'un de l'autre.

Les cassures simple brin et les gaps activent le complexe 9-1-1 formé des protéines Rad9, Hus1 et Rad1 appartenant au groupe PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Ces protéines forment une structure annulaire qui entoure l'ADN. Cette structure est fixée sur l'ADN endommagé grâce au complexe Rad17/RFC₂₋₅ formé des protéines Rad17 et RFC₂₋₅ (replication factor C). En outre le complexe 9-1-1 permet le recrutement de la Topoisomérase-Binding Protein 1 (TopBP1), une protéine cruciale pour l'activation d'ATR en interagissant avec le complexe ATR-ATRIP (Figure 9) (Kumagai *et al.*, 2006 ; Delacroix *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007).

Une fois que le complexe ATR actif est mis en place au niveau de l'ADN endommagé ou de la fourche de réplication, ATR phosphoryle ses transducteurs et ses effecteurs. Un de ses principaux substrats est la protéine Chk1 qu'il active par phosphorylation sur les sérines 317 et 345. Il active également la protéine p53 en la phosphorylant sur les sérines 15 et 37 (Wahl et Carr, 2002). ATR peut également phosphoryler l'histone H2AX suite à des lésions de l'ADN provoquées par les UV ou l'hydroxyurée (Hanasoge et Ljungman, 2007).

c) Les transducteurs : Chk1 et Chk2

Les PIKKs activent les protéines Chk1 et Chk2 par phosphorylation. Chk1 est activée par ATR (lésions provoquées par les UV) ou ATM (lésions provoquées par les RI) qui la phosphorylent sur les sérines 317 et 345 (Zhao et Piwnicka-Worms, 2001). Chk2 est essentiellement activée par ATM (lésions générées par les RI) qui la phosphoryle sur la thréonine 68 (Figure 9).

Les protéines Chk1 et Chk2 sont des sérine/thréonine protéine kinases qui agissent en phosphorylant leurs substrats dont la plupart sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Chk1 et Chk2 partagent un certain nombre de substrats, en particulier la protéine p53 et les protéines phosphatases Cdc25A-C impliquées dans le cycle cellulaire.

Chk1 et Chk2 phosphorylent p53 sur la sérine 20 (Shieh *et al.*, 2000). Cette sérine est située au niveau du domaine de fixation de Mdm2, sa phosphorylation empêche l'interaction entre

p53 et Mdm2 et favorise donc sa stabilisation. L'activation de la protéine p53 conduit entre autres à l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire.

Chk1 et chk2 vont également induire l'arrêt du cycle cellulaire en inactivant les protéines Cdc25A-C par phosphorylation. Les phosphatases phosphorylées sont dégradées et donc incapables d'activer les Cdk_s (Cyclin dependent kinases ou kinases dépendentes des cyclines) par déphosphorylation. Les complexes Cyclines/Cdk_s déphosphorylés favorisent normalement les transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire.

D. La protéine p53

1. Généralités

La protéine p53 est un suppresseur de tumeur qui intervient dans la régulation de la croissance cellulaire et la protection des cellules contre les processus tumoraux en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose en réponse à un grand nombre de stress cellulaires et génomiques (exposition aux agents génotoxiques, hypoxie, déficit en nucléotides, activation oncogénique inappropriée...). Ces réponses empêchent la multiplication de cellules comportant un ADN endommagé et présentant un potentiel oncogénique.

La protéine p53 joue le rôle de « gardien du génome » et c'est pour cette raison qu'elle est la cible de mutations inactivatrices dans plus de 50% des tumeurs humaines. La perte de cette protéine représente une étape importante dans les processus oncogéniques (May et May, 1999). La perte de la protéine p53 conduit à des aberrations chromosomiques de nombre et de structure (Boyle *et al.*, 1998).

Par ailleurs, une mutation du gène p53 au niveau des cellules germinales est à l'origine du syndrome de Li-Fraumeni, caractérisé par la formation spontanée de tumeurs.

La fonction majeure de la protéine p53 est de se lier à des séquences particulières d'ADN et d'activer la transcription de gènes. L'expression de ces gènes permet la régulation de processus tels que le cycle cellulaire (inhibition de la division cellulaire), l'apoptose (mort cellulaire) et la réparation de l'ADN.

2. Structure de p53

La protéine p53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés. Elle présente une organisation en domaines fonctionnels caractéristique de celle d'un facteur de transcription (revue de Leblanc et May, 2002). Ainsi, elle comporte (Figure 10) :

- Un domaine N-terminal de transactivation (acides aminés 1 à 42) qui permet de fixer des co-activateurs transcriptionnels. Ce domaine inclut une séquence (acides aminés 13 à 23) très conservée qui se lie à Mdm2, protéine impliquée dans la régulation de p53. La séquence d'acides aminés 11 à 27 correspond à un signal d'exportation nucléaire (NES).
- Un domaine riche en proline ou domaine PxxP (acides aminés 63 à 97) qui intervient dans l'apoptose. La délétion du domaine PxxP de la protéine p53 a montré que ce domaine est nécessaire à l'apoptose, mais non à l'arrêt du cycle cellulaire (Sakamuro *et al.*, 1997)
- Un domaine central (acides aminés 102 à 292) qui se lie de manière spécifique à des séquences d'ADN contenant deux motifs de 10 paires de bases. Cette séquence génomique est appelée ER pour « élément de réponse à p53 ». Elle est retrouvée dans tous les gènes cibles de p53 et dans les gènes dont l'expression est régulée par p53.
- Un domaine de tétramérisation ou domaine TET (acides aminés 335 à 356) qui facilite la fixation spécifique de p53 à l'ADN. Les domaines comprenant les acides aminés 300 à 323 et les acides aminés 323 à 363 correspondent respectivement à une séquence de localisation nucléaire (NLS) et à une séquence d'exportation nucléaire (NES). Ils permettent la régulation de la localisation subcellulaire de p53 (Gottifredi et Prives, 2001).
- Un domaine C-terminal basique (acides aminés 363 à 393) qui participe à la régulation négative de la protéine p53 en inhibant sa liaison à l'ADN lorsque cette protéine doit être maintenue sous forme inactive (Hupp *et al.*, 1995 ; Anderson *et al.*, 1997). Les modifications du domaine C-terminal par délétions, la liaison de protéines (Hupp *et al.*, 1992), la phosphorylation des sérines 315, 378 et 392 et l'acétylation par la protéine p300/CBP (CREB-binding protein) (Gu et Roeder, 1997) accroît la liaison de p53 à l'ADN.

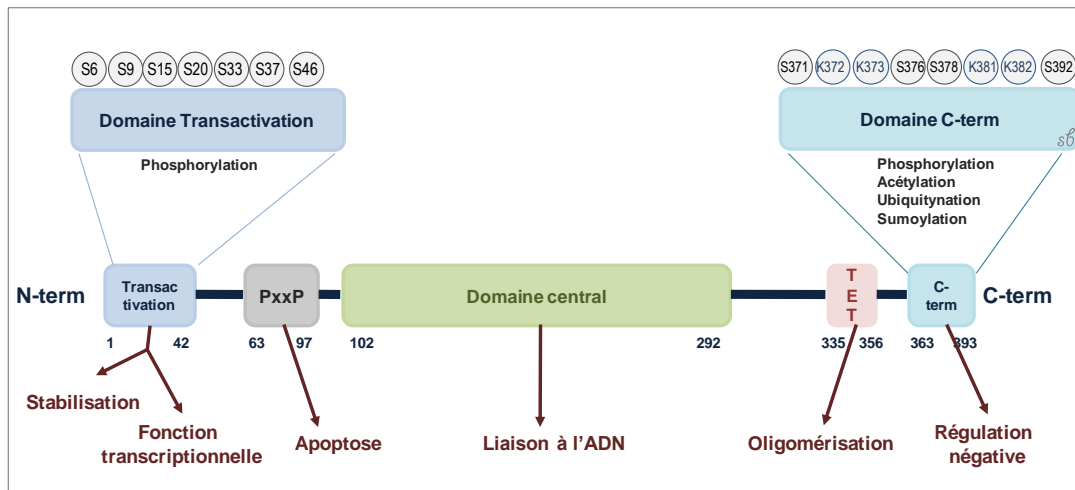


Figure 10. Structure et fonction de la protéine p53

- La protéine p53 présente cinq régions hautement conservées au cours de l'évolution des espèces. Quatre de ces cinq régions (II à V) sont situées dans le domaine central de la protéine. Les mutations du gène p53 retrouvées dans les tumeurs humaines, sont en majorité, localisées dans ces régions conservées. Ces mutations provoquent une réduction de l'affinité de p53 pour son ER et donc une diminution son activité transactivatrice. La région conservée I est localisée dans la région N-terminale (acides aminés 13 à 26). Elle correspond au site de fixation de la protéine Mdm2. L'interaction de p53 avec Mdm2 conditionne le taux intracellulaire de p53.

3. Régulation de p53 par Mdm2 dans les cellules normales

- Dans les cellules normales, p53 est maintenue sous forme latente, inactive et à un faible taux grâce à différents mécanismes : (i) le maintien de p53 dans le noyau sous forme inactive et (ii) le transfert du noyau vers le cytoplasme pour une dégradation par le protéasome. L'activité de p53 est régulée par la protéine Mdm2 ayant pour homologue humain hdm2. Cette protéine se lie au domaine N-terminal de p53 au niveau des acides aminés 13 à 26. Cette région d'interaction de Mdm2 avec p53 comprend les sites de fixation d'importants cofacteurs de transcription, les histones acétyltransférases, p300/CBP et PCAF (p300/CBP Associated Factor). Lorsque Mdm2 masque les sites de fixation de ces cofacteurs, elle régule négativement la transcription des gènes cibles de p53.

- La dégradation de p53 est également favorisée par l'interaction de p53 avec Mdm2. Mdm2 est un proto-oncogène à activité ubiquitine-ligase E3, spécifique de p53. Lorsque Mdm2 se lie au domaine N-terminal de p53, elle induit l'ubiquitinylation du domaine C-terminal. L'ubiquitinylation de p53 permet son exportation (translocation) hors du noyau et sa dégradation cytosolique par le protéasome.

Par ailleurs, le gène Mdm2 est une cible directe de p53. De ce fait, p53 stimule l'expression de son propre régulateur négatif générant une boucle d'autorégulation négative (Drané *et al.*, 2002).

Les modifications post-traductionnelles de p53 telles que les phosphorylations, acétylations et sumoylations modifient l'interaction entre p53 et Mdm2, et modulent ainsi son activité.

4. Activation de p53 suite à un stress cellulaire

Suite à un stress cellulaire par lésions de l'ADN, hypoxie, déficit en nucléotides ou par action d'agents chimiothérapeutiques ou d'oncogènes, p53 subit des modifications post-traductionnelles covalentes consistant en des phosphorylations et des acétylations sur de multiples sites de la protéine et à des modifications non covalentes par association à des cofacteurs au niveau des extrémités N- et C-terminales (Espinosa, 2008 ; Murray-Zmijewski, *et al.*, 2008). Ces modifications post-traductionnelles ont pour conséquence une accumulation nucléaire de la protéine p53 activement stable sur le plan de la fonction transcriptionnelle. L'activation de la fonction transactivatrice de p53 permet la transcription de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et/ou l'induction de l'apoptose afin d'éliminer les cellules génétiquement altérées et d'assurer l'intégrité du génome, limitant de ce fait le développement tumoral. La protéine p53 exerce sa fonction de facteur de transcription sous la forme tétramérique en se fixant à un élément de réponse ER présent au niveau des gènes cibles de p53.

Les modifications post-traductionnelles de la protéine p53, occasionnées à la suite de lésions de l'ADN, ont été particulièrement étudiées après une exposition à des radiations ionisantes et aux UV (revue de Leblanc et May, 2002).

a) Phosphorylations du domaine N-terminal

Les sites de phosphorylation du domaine N-terminal de p53 sont les sérines 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46 et les thréonines 18, 55 et 81. Les protéines kinases connues pour répondre au stress cellulaire et phosphorylant p53 *in vitro* sont les protéines de la famille des PIKKs telles que DNA-PK, ATM et ATR et les protéines de la famille SAK (Stress-Activated Kinases) telles que JNK1 et p38MAPK. ATM peut phosphoryler p53 sur la sérine 15 *in vitro*. ATR peut phosphoryler les sérines 15 et 37 *in vitro*. En outre, la sérine 20 est phosphorylée *in vitro* par Chk1 et Chk2, activées respectivement par ATR et ATM suite à des lésions de l'ADN (Caspari, 2000). P38MAPK1 peut phosphoryler p53 sur le résidu 46 (Oda *et al.*, 2000). JNK1 phosphoryle la thréonine 81 et après irradiation *in vivo* aux UV, les sérines 33 et 37 (Buschmann *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été montré que la sérine 33 est le substrat *in vitro*

de CAK (cycline dependent kinase activating kinase) et que les résidus sérines 6 et 9 de p53 peuvent être phosphorylés *in vitro* par la kinase CK1 (Caséine Kinase I).

La phosphorylation du domaine N-terminal favorise l'activation de p53 par :

- Accumulation de p53 sous forme stable en inhibant la liaison de p53 avec Mdm2 par la phosphorylation des résidus situés dans la région de liaison de Mdm2 à p53, soit les sérines 15 et 20 et la thréonine 18. Par ailleurs, il a été également montré *in vitro* que la phosphorylation des sérines 15 et 37 de p53 par la DNA-PK empêche l'interaction de p53 avec Mdm2 (Lees-Miller *et al.*, 1992 ; Shieh *et al.*, 1997 ; Bean et Slark, 2002).
- Inhibition de l'exportation vers le cytoplasme. Il a été montré que p53 phosphorylée sur les sérines 15 et 20 n'était pas exportée vers le cytoplasme (Zhang et Xiong, 2001).
- Augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 par l'interaction de p53 avec des co-activateurs transcriptionnels, p300/CBP et PCAF qui possèdent une fonction intrinsèque histone acétyltransférase. La phosphorylation de la sérine 15 (Dumaz et Meek, 1999) favorise la liaison des cofacteurs p300/CBP et PCAF au domaine N-terminal de transactivation de p53. Une fois liés, ces cofacteurs induisent l'acétylation du domaine C-terminal au niveau des lysines 320 et 372, 373, 381 et 382. L'acétylation de ces sites favorise la liaison de p53 à l'ADN (Drané *et al.*, 2002) et stimule ainsi son activité transactivatrice (Avantaggiati *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a également été montré que la phosphorylation de la sérine 20 après exposition *in vivo* aux UV et aux RI a pour effet d'augmenter la transactivation des gènes p21 et Mdm2 (Jabbur *et al.*, 2000) et la phosphorylation du résidu 46 par p38MAPK1 favorise la transactivation du gène pro-apoptotique p53AIP-1 (Oda *et al.*, 2000). La phosphorylation de la sérine 15 régule en outre la transcription de gènes dont certains sont impliqués dans la réponse aux lésions de l'ADN (Mdm2, GADD45a, famille p21/Cip).

L'ensemble des études montre que le domaine N-terminal est la cible de kinases, que la protéine p53 est stabilisée par la perte d'interaction avec Mdm2 et que p53 est devenue compétente pour la transcription par interaction avec les cofacteurs p300/CBP et PCAF.

b) Modifications post-traductionnelles du domaine C-terminal

Les modifications post-traductionnelles du domaine C-terminal consistent en des phosphorylations, déphosphorylations et acétylations. Le domaine C-terminal est modifié par plusieurs kinases comme la cdk2, la PKC (Protéine Kinase C), la CKII (Caséine Kinase II) ou encore la PKR (Protéine Kinase R), mais également par des phosphatases et des histones acétyltransférases (HAT) telles que p300/CBP ou PCAF.

• Les sites de phosphorylation en C-terminal sont les sérines 315, 371, 376, 378 et 392. La phosphorylation de ces sites favoriserait la fixation spécifique de p53 à l'ADN et stimulerait sa fonction transcriptionnelle.

- La sérine 315 est phosphorylée *in vivo* par p34^{cdc2} et Cdk2 (Price *et al.*, 1995).
- La sérine 392 est phosphorylée *in vitro* par la CKII et *in vivo* après irradiation UV (Kapoor et Lozano, 1998). La phosphorylation de la sérine 392 favoriserait en outre la tétramérisation de p53. C'est sous la forme de tétramère que p53 exerce sa fonction de facteur de transcription (Sakaguchi *et al.*, 1997A et 1997B). La phosphorylation de la sérine 392 est coordonnée à la déphosphorylation de la sérine 20 après exposition à des radiations non ionisantes (Craig *et al.*, 1999).
- Par ailleurs, les sérines 376 et 378 sont constitutivement phosphorylées dans les cellules non irradiées (MCF7). Ces sérines sont phosphorylées *in vitro* par la PKC. La déphosphorylation de la sérine 376 favorise la fixation de la protéine 14-3-3 (impliquée dans le point de contrôle G2 dépendant de p53) et contribue à l'activation de p53 en réponse aux radiations ionisantes (Stavridi *et al.*, 2001).

• Les sites d'acétylation en C-terminal sont les lysines 320, 372, 373, 381 et 382. L'acétylation de ce domaine par les histones acétyltransférases p300/CBP et PCAF augmenterait la capacité de liaison spécifique de p53 à l'ADN et la stabilisation de p53. La lysine 320 est acétylée par PCAF et les lysines 320, 373 et 382 par p300/CBP. Le recrutement des histones acétyltransférases dans le domaine N-terminal serait augmenté par la phosphorylation des sérines 15, 33 et 37 (Lambert *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'acétylation des lysines du domaine C-terminal suite à des lésions de l'ADN inhiberait l'ubiquitinylation et conduirait à une stabilisation de p53. En effet, Mdm2 lié au domaine N-terminal de p53 requiert le domaine C-terminal (362-392) pour la dégradation de p53 par la voie de l'ubiquitinylation. Il a été montré par mutations dirigées que les lysines 370, 372, 373, 381, 382 et 386 du domaine C-terminal sont les cibles de l'ubiquitinylation médiée par Mdm2 (Rodriguez *et al.*, 2000).

L'ensemble des études montre que le domaine C-terminal est la cible de kinases, des histones acétyltransférases, que la protéine p53 est stabilisée et protégée de l'ubiquitinylation par l'acétylation des lysines et que la protéine p53 exerce sa fonction de facteur de transcription sous la forme tétramérique par augmentation de sa capacité de liaison à l'ADN.

E. Réponses cellulaires suite aux lésions de l'ADN

Suite à la détection de lésions de l'ADN, des protéines effectrices sont activées et provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Si les lésions sont trop importantes, le cycle cellulaire reste bloqué en permanence induisant l'apoptose ou conduisant potentiellement la cellule dans un état de sénescence ou de différenciation.

1. Arrêt du cycle cellulaire

Suite à des lésions de l'ADN, les protéines ATM et ATR induisent des voies de signalisation conduisant entre autres à l'arrêt du cycle cellulaire (revue de Lukas *et al.*, 2004A) par l'activation de protéines effectrices et l'activation de p53 permettant la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle. L'arrêt de la progression du cycle cellulaire est un processus important pour permettre aux cellules de réparer l'ADN et éviter de transmettre les anomalies génétiques aux cellules filles. Une défaillance de ce processus peut conduire à la transformation de cellules normales en cellules tumorales.

a) Rappel : régulation du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire est dépendante de facteurs de régulation impliqués dans les points de contrôle (ou « checkpoints ») du cycle cellulaire. Il existe 5 points de contrôle présentant des finalités différentes :

- 1) le point de restriction R : la cellule vérifie l'environnement, sa taille et ses réserves
- 2) le point de contrôle à la transition G1/S : la cellule vérifie l'intégrité de son génome avant la réplication
- 3) le point de contrôle en phase S : la cellule vérifie le degré d'avancement de la réplication
- 4) le point de contrôle à la transition G2/M : la cellule vérifie que l'ADN a été totalement répliqué et corrige d'éventuelles erreurs
- 5) le point de contrôle à la transition métaphase/anaphase de la mitose : la cellule vérifie que tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau de division par leurs kinétochores.

La progression du cycle cellulaire passe par ces étapes de contrôle pendant lesquelles la cellule peut procéder à des ajustements ou à des réparations. Si ces dernières sont impossibles à réaliser, un processus apoptotique est alors initié.

Les molécules responsables du cycle cellulaire appartiennent à deux familles de protéines : les cyclines et les Cdk_s.

Les Cdk_s sont des sérine/thréonine kinases. Elles sont actives lorsqu'elles sont liées à une cycline sous forme de complexes cycline/Cdk qui favorisent la progression du cycle cellulaire en phosphorylant des substrats spécifiques impliqués dans le déroulement du cycle cellulaire.

Les cyclines s'associent aux Cdk_s pour former les complexes cycline/Cdk qui jouent un rôle dans la progression du cycle cellulaire. Les cyclines ne possèdent pas d'activité enzymatique. Elles sont les sous-unités régulatrices des Cdk_s. La concentration des cyclines varie au cours des phases du cycle cellulaire, d'où le nom de cycline. Les cyclines subissent une dégradation cytosolique par la voie du protéasome après ubiquitinylation. On distingue plusieurs types de cycline : A, B, D et E, spécifiques de chaque phase du cycle cellulaire.

A chaque phase du cycle cellulaire, sont associés des complexes cycline/Cdk spécifiques :

- phase G1 : cycline D/Cdk4 et cycline D/Cdk6
- transition G1/S : cycline E/Cdk2
- phase S : cycline A/Cdk2
- transition G2/M : cycline B/Cdk1, également appelé cycline B/Cdc2 formant le complexe MPF (M-phase Promoting Factor).

Les complexes cycline/Cdk sont activés par la protéine CAK (Cyclin-dépendent Activating Kinase) et Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C) (Figure 11). CAK active les Cdk_s par la phosphorylation de la thréonine 161, modifiant ainsi sa conformation pour la rendre accessible aux protéines régulatrices. La protéine Cdc25 est une phosphatase responsable des déphosphorylations activatrices des Cdk_s sur la thréonine 14 et la tyrosine 15. Les phosphatases Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C sous forme déphosphorylée favorisent les transitions G1/S et G2/M en déphosphorylant les Cdk_s.

Les complexes cycline/Cdk sont inhibés par la famille des protéines CKI (Cyclin-dependent protein Kinase Inhibitors ou inhibiteurs des protéines kinases dépendantes des cyclines) et par la kinase Wee (Figure 11). Les CKI appartiennent à deux groupes : la famille p21 et la famille p16. Les membres de la famille p21 (p21, p27 et p57) modifient la conformation des Cdk_s et se lient à leur site actif pour les inhiber alors que les membres de la famille p16 (p15, p16, p18 et p19) entrent en compétition avec les cyclines pour leur liaison aux Cdk_s. La protéine p21 est sous le contrôle de la protéine p53. Les kinases Wee et Myt1 sont responsables des phosphorylations inactivatrices sur la thréonine 14 et la tyrosine 15 des Cdk_s.

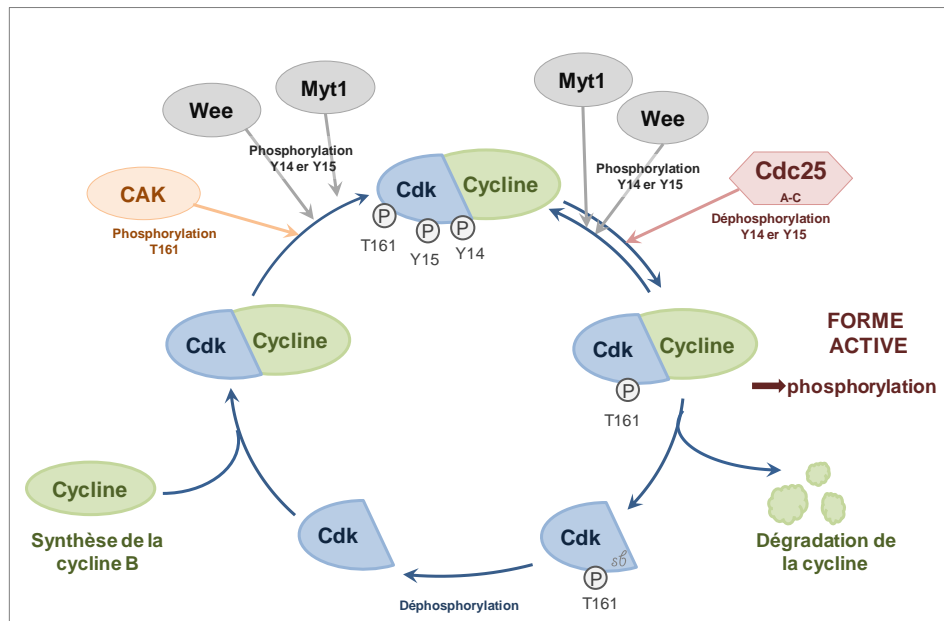


Figure 11. Régulation des complexes cycline/Cdk

Le complexe MPF a été l'un des mieux étudiés. L'association cycline B/Cdk1 forme un complexe inactif phosphorylé sur plusieurs résidus par un ensemble de kinases, les unes activatrices et les autres inhibitrices. C'est la déphosphorylation sélective de thréonine 14 et de la tyrosine 15 du MPF par une phosphatase activatrice Cdc25 qui va rendre le complexe actif, c'est à dire capable de phosphoryler ses substrats pour permettre l'entrée en mitose de la cellule. La cycline B sera rapidement dégradée par un système protéolytique dépendant de l'ubiquitine. Ce schéma de phosphorylation/déphosphorylation sélective semble général pour tous les complexes cycline/Cdk.

b) Arrêt au point de contrôle en G1

Le point de contrôle en G1 contrôle l'intégrité de l'ADN avant sa réplication. Dans les conditions normales, la forme non phosphorylée de Cdc25A favorise la transition G1/S par déphosphorylation des Cdk2 associées à la cycline E. Le complexe cycline E/Cdk2 déphosphorylé favorise la progression du cycle cellulaire au point de contrôle G1 en phosphorylant entre autres cdc45 impliquée dans l'initiation de la réplication.

- Les voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en G1 dépendent de la nature des lésions :
 - Les cassures double brin de l'ADN conduisent à une phosphorylation d'ATM qui ensuite active Chk2.
 - Les cassures simple brin et les gaps activent Rad17/RFC, 9-1-1 et ATR qui phosphoryle Chk1.

Chk1 ou Chk2 phosphoryle Cdc25A qui est inactivée et ensuite dégradée par la voie ubiquitine-protéasome, conduisant ainsi à l'arrêt du cycle du cycle cellulaire en G1.

• Par ailleurs, ATM et ATR phosphorylent p53 sur la sérine 15, ce qui conduit à l'accumulation de cette protéine sous forme stable favorisant sa fonction transcriptionnelle. La transactivation de p53 conduit à l'expression du gène p21^{CIP/WAF1} codant pour la protéine p21 qui est un inhibiteur des complexes cyclines D/Cdk4, D/Cdk6, E/Cdk2 et A/Cdk2. L'inhibition de Cdk2 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G1.

La protéine p53 active également la transcription d'autres gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire tels que BTG2, GADD45 et MCG10.

c) Arrêt au point de contrôle en S

Les lésions de l'ADN provoquant un blocage des fourches de réplication activent la voie du complexe ATR/ATRIP (Abraham, 2001) qui se lie à l'ADN endommagé soit directement, soit par l'intermédiaire de la protéine RPA. L'activation d'ATR conduit à la phosphorylation de Chk1 qui phosphoryle à son tour Cdc25A. L'inactivation et la dégradation de Cdc25A maintient les complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 sous forme inactive et donc empêche la fixation de cdc45 sur l'ADN (Heffernan *et al.*, 2002).

Suite à des radiations ionisantes, ATM induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase S selon deux voies de signalisation (Falck *et al.*, 2001 ; Falck *et al.*, 2002) :

- La première voie conduit à l'activation de Chk2 par phosphorylation. Chk2 inactive la protéine phosphatase Cdc25A en la phosphorylant sur la sérine 123 provoquant son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. L'inactivation de Cdc25A maintient les complexes cycline E/cdk2 et cycline A/Cdk2 dans un état inactif et donc bloque le cycle cellulaire en phase S. Cette voie retarde la réplication de l'ADN, et donc allonge la durée de la réplication afin que les anomalies soient réparées.
- La deuxième voie est indépendante de Cdc25A, mais requiert ATM et NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1). Chez les patients atteints du syndrome de Nijmegen, la réplication de l'ADN n'est pas ralentie pour permettre la correction des lésions. L'activation d'ATM conduit à la phosphorylation d'un grand nombre de substrats tels que NBS1 (phosphorylée sur la sérine 393), BRCA1 et SMC1. Les protéines ATM, NBS1 et BRCA1 font partie du complexe BASC (BRCA1-associated genome Surveillance Complex) qui inclut également des facteurs de réplication et de réparation. L'activation de NBS1 induit une voie de signalisation impliquant Mre11 et Rad50-like qui jouent un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire mais également dans l'activation des systèmes de réparation. Par ailleurs, la phosphorylation des protéines

médiatrices BRCA1, MDC1 et 53BP1 favorise la phosphorylation des protéines Chk1 et Chk2.

La forme phosphorylée de p53 ne semble pas être impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase S. Cependant, un isoforme de p53 ($\Delta p53$) pourrait intervenir dans l'arrêt en phase S (Rohaly *et al.*, 2005).

d) Arrêt au point de contrôle G2/M

L'apparition de lésions de l'ADN en G2 provoque l'arrêt du cycle cellulaire avant l'entrée en mitose. Le point de contrôle en G2 est important avant la ségrégation des chromosomes, il évite le transfert d'anomalies génétiques aux cellules filles. L'entrée en mitose est contrôlée par l'activité de Cdk1. Le complexe cycline B/Cdk1 permet la progression du cycle cellulaire en favorisant la transition G2/M. Le maintien des phosphorylations inhibitrices (thréonine 14 et tyrosine 15) sur la kinase Cdk1 est essentiel pour l'activation du point de contrôle en G2.

- Les voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en G2 dépendent de la nature des lésions :

- Les cassures double brin de l'ADN activent la voie ATM/Chk2.
- Les lésions induites par les UV et les cassures simple brin activent la voie ATR/Chk1.

Chk1 et Chk2 inactivent Cdc25C et activent Wee1 par phosphorylation. La phosphorylation de Cdc25C sur la sérine 216 crée un site de fixation pour les protéines 14-3-3. Le complexe Cdc25C/14-3-3 est séquestré dans le cytoplasme, empêchant Cdc25C d'activer Cdk1 par déphosphorylation de la thréonine 14 et de la tyrosine 15. Le maintien sous forme inactive du complexe cycline B/Cdk1 bloque ainsi le cycle cellulaire en G2 (revue de Hermeking et Benzinger, 2006).

- Par ailleurs, p53 joue un rôle dans le point de contrôle en G2/M en activant la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, entre autres les protéines 14-3-3, p21 et GADD45. La protéine p21 se lie au complexe cycline B/Cdk1 et empêche la phosphorylation activatrice de Cdk1 sur la thréonine 161 par CAK. GADD45 entraîne la dissociation du complexe cycline B/Cdk1 (Zhan *et al.*, 1999). La protéine 14-3-3 séquestre le complexe cycline B/Cdk1 dans le cytosol en se liant à celui-ci (Hermeking et Benzinger, 2006).

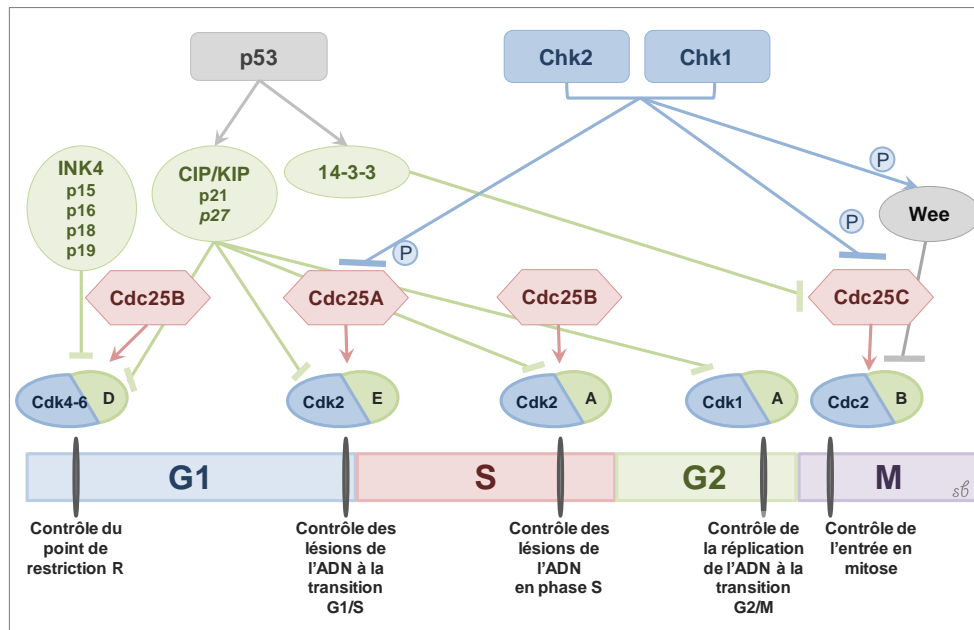


Figure 12. Régulation du cycle cellulaire aux points de contrôle

L'ensemble des études (Figure 12) montre que les cassures double brin de l'ADN activent la voie d'ATM, les cassures simple brin et les stress réplcatifs activent la voie d'ATR/ATRIP. Ces PIKKs activent Chk1 et Chk2 par phosphorylation, qui à leur tour inactivent les phosphatases Cdc25 par phosphorylation. L'inactivation des Cdc25 maintient les complexes cycline/cdk dans un état inactif et donc bloque le cycle cellulaire à la transition G1/S, en phase S et à la transition G2/M. Par ailleurs, les phosphorylations activatrices de la protéine p53 favorisent sa fonction transcriptionnelle conduisant à la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire (p21 et GADD45). En outre, il existe des voies plus spécifiques de chaque point de contrôle du cycle cellulaire comme le complexe BASC en phase S et la protéine 14-3-3 à la transition G2-M.

2. Réparation des lésions de l'ADN

La transmission d'anomalies génétiques aux cellules filles peut être prévenue par la réparation des lésions de l'ADN. Un défaut de réparation peut conduire à la transformation oncogénique.

Il existe autant de voies de réparation que de types de lésions. Les principaux systèmes de réparation sont la réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair), la réparation par excision de nucléotide (NER pour Nucleotide Excision Repair), la réparation des mésappariements de l'ADN (MMR pour Mismatch Repair), la réparation des cassures simple brin (SSBR pour Single Strand Break Repair) et la réparation des cassures double brin (DSBR pour Double Strand Break Repair) (Figure 13). Cependant, ces mécanismes de réparation ne sont mis en place qu'en cas d'échec de la réparation immédiate de l'ADN faisant

intervenir des photolyases, des alkyltransférases (méthyltransférases) et l'activité exonucléase des polyméras.

La protéine p53 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome en favorisant la réparation des lésions et en régulant les différentes voies impliquées dans la réparation.

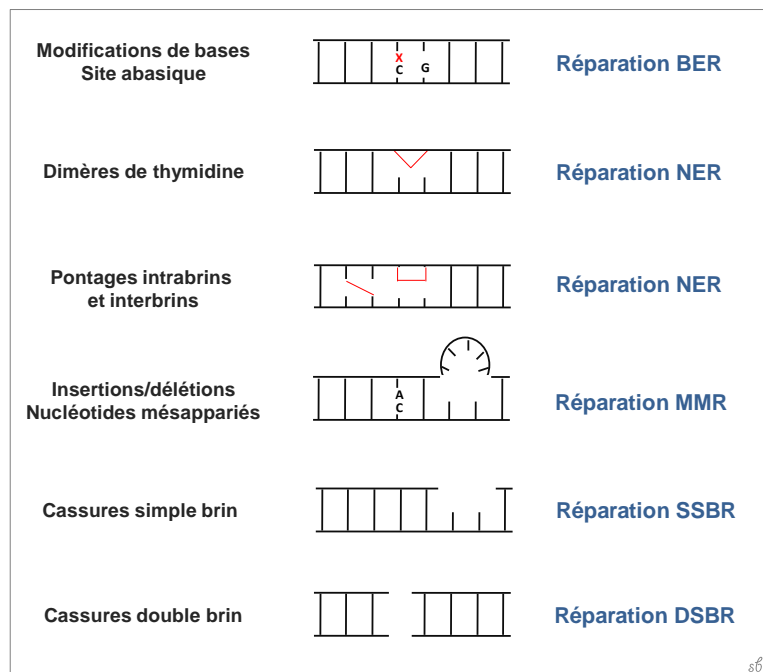


Figure 13. Les différents systèmes de réparation selon la nature des lésions de l'ADN

a) Réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base (BER) est un processus multi-étape qui corrige les lésions de base résultant de phénomènes d'oxydation, de méthylation, de désamination ou d'une perte spontanée de la base elle-même (revue de Frosina *et al.*, 1996). Ces lésions sont généralement occasionnées par les ROS, les radiations ionisantes, et indirectement par les UV (via la production de ROS), mais également par des agents chimiques tels que les molécules chimiothérapeutiques (mitomycine C, adriamycine et psoralène).

Le mécanisme de réparation BER débute par l'excision de la base endommagée par une des différentes glycosylases de l'ADN qui clive la liaison N-glycosidique entre la base endommagée et le phosphate du désoxyribose du nucléotide. La spécificité des ADN glycosylases varie en fonction de la nature de la lésion. Ce clivage crée un site abasique (site AP Apyrimidinique ou Apurinique). Les sites abasiques peuvent également apparaître spontanément après hydrolyse de la liaison N-glycosidique. Ensuite, le site abasique est reconnu par une endonucléase qui incise le squelette sucre-phosphate générant ainsi une cassure simple brin dans l'ADN. Une des principales endonucléases humaines est l'AP endonucléase 1 (APE1) qui clive la liaison phosphodiester en 5' du site abasique générant une

interruption du brin d'ADN présentant à l'extrémité 3' un groupe hydroxyle et à l'extrémité 5' un désoxyribose phosphate abasique (dRP). Cependant, la configuration des extrémités 3' et 5' générées au niveau de l'interruption d'ADN présente une grande diversité du fait de la multitude des glycosylases et des endonucléases impliquées dans la réparation BER. Une étape de traitement des extrémités pour reformer l'extrémité 3'-OH et l'extrémité 5'-phosphate est ainsi nécessaire pour le remplissage de la brèche et la ligation.

Deux voies permettent la réparation BER : la réparation par excision courte (ou « short-patch »), largement répandue ou la réparation par excision longue (ou « long-patch »).

La réparation par excision courte (« short-patch ») représente 80 à 90% de ce système de réparation. L'ADN polymérase β ajoute un nucléotide à l'extrémité 3'. Le désoxyribose phosphate abasique est clivé et supprimé par l'exonucléase ou une ADN désoxyribophosphodiesterase (dRPase). Les brins clivés sont unis par le complexe ADN ligase 3/XRCC1 qui reconstitue la liaison phosphodiester entre les deux nucléotides adjacents.

La réparation par excision longue (« long-patch ») est utilisée lorsque la base modifiée résiste à l'action de l'exonucléase de l'ADN polymérase β . La réparation par excision longue consiste à remplacer environ 2 à 10 nucléotides incluant la base modifiée. Cette voie implique l'ADN polymérase δ/ϵ , PCNA et d'autres facteurs (Frosina *et al.*, 1996). L'ADN polymérase δ/ϵ synthétise plusieurs nucléotides au niveau de la région à réparer en déplaçant le désoxyribose phosphate abasique dans un oligonucléotide libre en surplomb. Cet oligonucléotide est coupé par FEN1 (Flap endonucléase 1 ou endonucléase à battant). Enfin, la DNA ligase 1 scelle les extrémités de l'ADN en reconstituant la liaison phosphodiester.

Le système BER permet la correction d'une anomalie survenue sur une base nucléique de la molécule d'ADN. Ce système reconnaît spécifiquement l'anomalie, clive la base modifiée et reconstitue l'intégrité de la molécule d'ADN. Ce système de réparation nécessite la présence du brin complémentaire intact qui sert de matrice au processus de réparation.

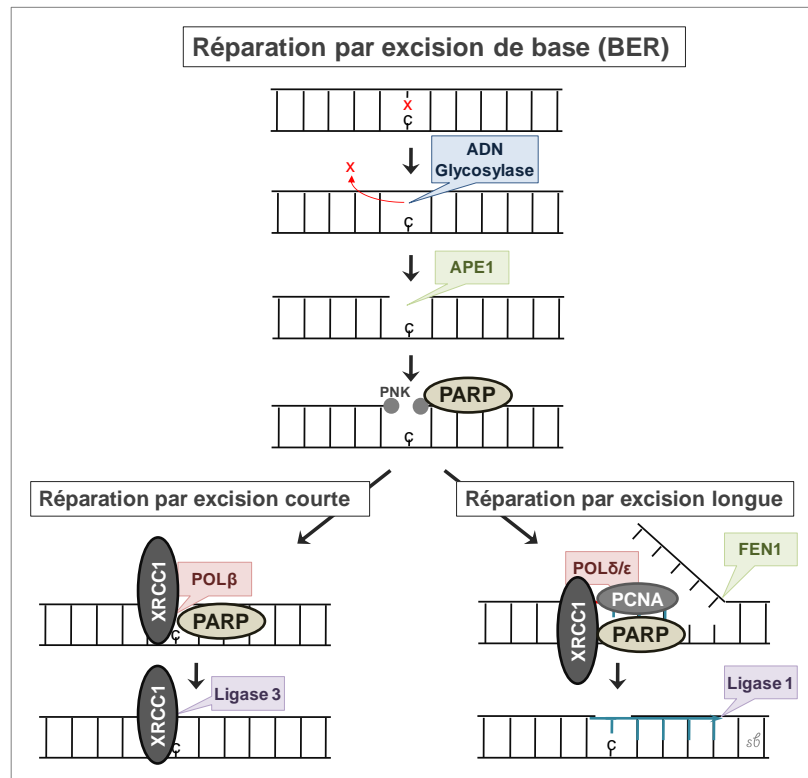


Figure 14. Réparation par excision de base (BER)

La protéine p53 est impliquée dans le système de réparation BER, non par sa fonction transcriptionnelle, mais en favorisant l'activité d'une des glycosylases de l'ADN (8-oxoguanine glycosylase ou OGG1) et l'AP endonucléase 1 (APE1) (Achanta et Huang, 2004). La protéine p53 stabilise également l'ADN polymérase β , enzyme possédant à la fois l'activité ADN polymérase et l'activité exonucléase (Zhou *et al.*, 2001).

b) Réparation par excision de nucléotide (NER)

La réparation par excision de nucléotides est le plus important système de réparation pour corriger les lésions importantes d'ADN comme les dimères de thymidine causés par les rayonnements UV, mais également les adduits chimiques, les pontages intrabrins, les pontages interbrins et toutes les formes de lésions oxydatives causées par les ROS.

Cette voie a été étudiée à travers deux maladies rares autosomiques récessives, le xeroderma pigmentosum (XP) et le syndrome de Cockayne (CS). Les patients atteints de ces pathologies présentent une hypersensibilité sévère aux rayonnements UV. Le xeroderma pigmentosum est associé à des anomalies génétiques concernant un des sept gènes, XPA à XPG. Les produits de ces gènes sont connus pour reconnaître les lésions de l'ADN et cliver celui-ci (Lindahl et Wood, 1999). Une mutation conduit à une déficience du système de réparation. Le syndrome de Cockayne est du à une anomalie d'un des deux gènes CSA ou CSB. Les produits de ses gènes sont requis pour la réparation de gènes en cours de transcription (Friedberg, 1996).

La réparation par excision de nucléotides nécessite une trentaine de protéines intervenant dans les différentes étapes de la réparation : la détection des lésions de l'ADN, l'ouverture de l'hélice d'ADN au niveau de l'anomalie, la réparation par synthèse et la ligation des deux brins.

Il existe deux voies de réparation par excision de nucléotides : la voie de réparation globale du génome (GG-NER) qui corrige les lésions de l'ADN indépendamment de leur localisation dans le génome et la voie de la réparation couplée à la transcription (TC-NER) qui corrige les gènes en cours de transcription. Ces deux voies sont fondamentalement identiques excepté dans le mécanisme de détection des lésions de l'ADN (revue de Costa *et al.*, 2003).

Pour la voie de réparation globale du génome (GG-NER), les lésions sont détectées par les protéines XPC associées à hHR23B et la centrine 2 formant un hétérotrimère et le complexe DDB1/DDB2 (DNA Damage Binding protein). Puis ces détecteurs recrutent les effecteurs au niveau de l'ADN endommagé (Emmert *et al.*, 2000).

En revanche, **la voie de réparation des gènes en cours de transcription (TC-NER)** est activée par le blocage de l'ARN polymérase II suite à la survenue des lésions pendant la transcription. Cette polymérase est ensuite déplacée pour permettre l'accès des systèmes de réparation impliquant des protéines du système TC-NER telles que CSA et CSB qui recrutent les effecteurs.

Après cette phase de détection des lésions, les voies de réparation sont les mêmes. Le complexe de facteurs de transcription TFIIH est recruté au niveau de la lésion. L'hélice d'ADN double brin est ouverte par ce complexe contenant en autres deux hélicases XPB (polarité 3'-5') et XPD (polarité 5'-3'). L'ouverture de l'hélice rend accessible la lésion à d'autres facteurs tels que XPA et la protéine de réplication RPA. XPA reconnaît et confirme la présence de lésions et les protéines RPA se lient à l'ADN simple brin non endommagé pour le protéger. Enfin, les endonucléases XPG et le complexe XPF/ERCC1 clivent respectivement les brins en 3' et en 5' des nucléotides endommagés, générant un oligonucléotide de 24 à 32 bases contenant l'anomalie (Emmert *et al.*, 2001). Cet oligonucléotide est éliminé laissant une région monocaténaire dont le brin complémentaire est synthétisé grâce à l'ADN polymérase δ/ϵ avec l'aide de la protéine PCNA et d'autres facteurs comme RFC, en se servant du brin non endommagé comme matrice. Enfin, la portion d'ADN synthétisée est liée en 3' par l'ADN ligase 1 qui rétablit la continuité de la molécule d'ADN.

La réparation de l'ADN par le système NER corrige une anomalie de la molécule d'ADN en déformant la double hélice, élimine le fragment d'ADN porteur de l'anomalie et reconstruit la

molécule d'ADN en se servant du brin intact comme matrice. L'intégrité du brin complémentaire permet une reconstruction de la double hélice sans introduire de mutation.

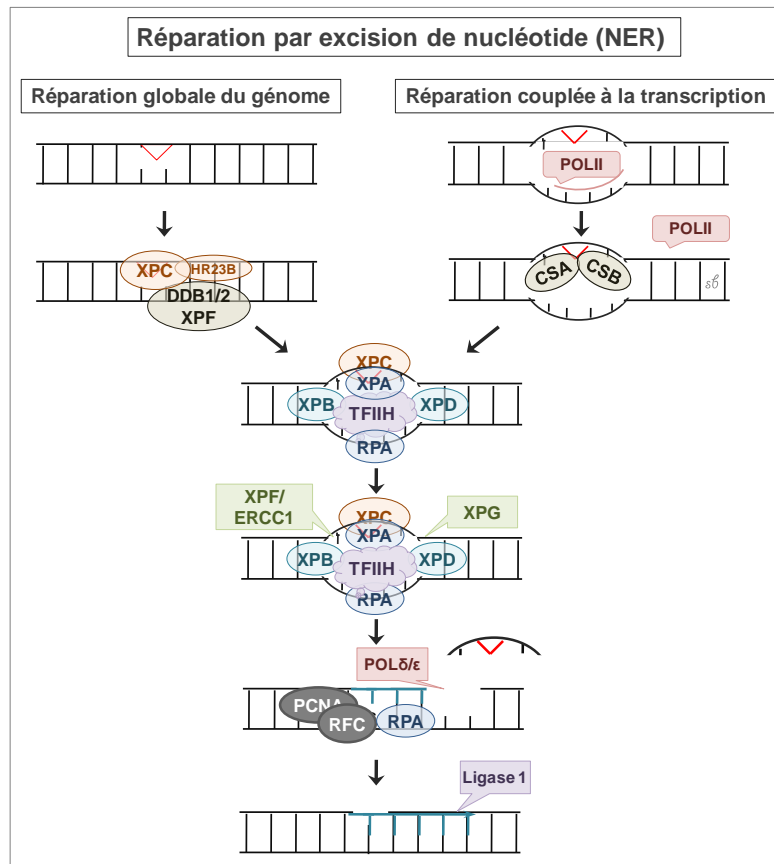


Figure 15. La réparation par excision de nucléotides (NER)

La protéine p53 contribue à la réparation globale du génome par transactivation des gènes codant à la fois pour les protéines DDB2 et XPC (Adimoolam et Ford, 2003). Par ailleurs, p53 régule la réparation par excision de nucléotides (NER) en interagissant avec le complexe TFIIH et en régulant les activités des hélicases XPB et XPD (Léveillard *et al.*, 1996).

c) Réparation des mésappariements de l'ADN (MMR)

La réparation des mésappariements de l'ADN joue un rôle fondamental dans la correction des erreurs de réplication telles que les mésappariements de base (A-G ou C-T) et les boucles d'insertion/délétion générées par l'ADN polymérase. Par ailleurs, les désaminations spontanées de la 5-méthylcytosine et les hétéroduplex sont également corrigés par ce type de réparation. Une partie des erreurs de réplication est corrigée par l'activité de relecture 3'-5' des ADN polymérases et le reste est corrigé par le système MMR qui accroît la fidélité de la réplication (revue de Kunkel et Erie, 2005). Une défaillance de cette voie est caractérisée par une fréquence élevée des mutations spontanées et une instabilité accrue des séquences microsatellites. Une mutation des gènes impliqués dans le système MMR peut être à l'origine

d'une prédisposition au carcinome colorectal héréditaire sans polype, mais également à des tumeurs sporadiques.

Les différentes étapes de la réparation incluent la détection des lésions, l'excision de l'anomalie, la synthèse du brin complémentaire et la ligation finale.

La voie de réparation des mésappariements implique plusieurs complexes d'hétérodimères incluant les protéines humaines Msh et Mlh/Pms, homologues MutS (Msh) et MutL (Mlh/Pms) chez la bactérie.

La réparation MMR débute par la reconnaissance des lésions de l'ADN : l'hétérodimère Msh2/Msh6 (homologue de MutS α) reconnaît les délétions/insertions et les mésappariements d'une base alors que l'hétérodimère Msh2/Msh3 (homologue de MutS β) ne reconnaît que les délétions/insertions. Suite à la détection des erreurs de réplication, les complexes Msh recrutent d'autres complexes protéiques comme Mlh1/Pms2 (homologue de MutL α), Mlh1/Pms1 (homologue de MutL β), les monomères Mlh1 et Mlh3, Exonucléase 1 (Exo1) et des facteurs de réplication, qui se lient aux paires de bases mésappariées. Puis, le fragment d'ADN porteur de l'erreur d'appariement est clivé et dégradé par Exo1. L'ADN simple brin ainsi généré est recouvert par les protéines RPA, afin de protéger la molécule d'ADN des endonucléases. Puis, les complexes Msh et Mlh/Pms et Exo1 se dissocient de l'ADN pour permettre à l'ADN polymérase δ associé au PCNA de resynthétiser la double hélice d'ADN. Pour finir, l'ADN ligase 1 établit le dernier lien phosphodiester permettant à la molécule d'ADN de retrouver son intégrité (revue de Jun *et al.*, 2006).

La protéine p53 joue un rôle important dans le processus de réparation des mésappariements en régulant la transcription de gènes comme Msh2, PCNA, Mlh1 et Pms2. Par ailleurs, Pms2 joue le rôle de détecteur de lésions de l'ADN mais peut également orienter la réparation vers un processus apoptotique (Shimodaira *et al.*, 2003).

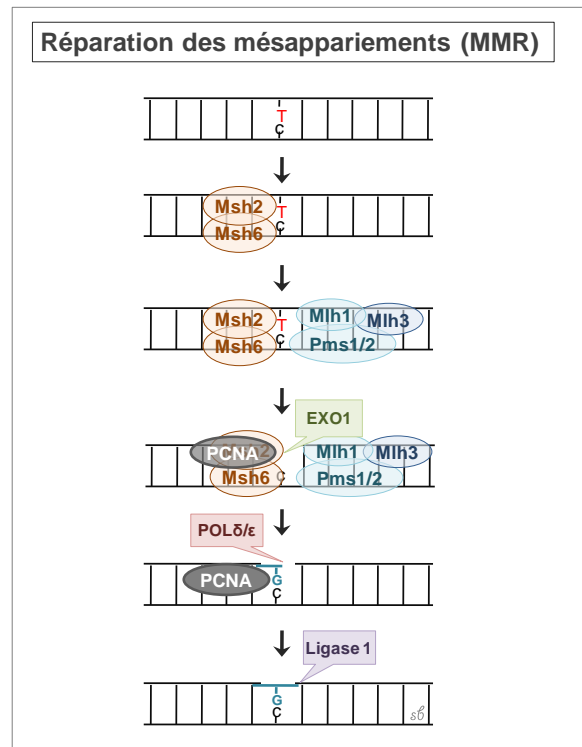


Figure 16. Réparation des mésappariements (MMR)

d) Réparation des cassures simple brin (SSBR)

Les cassures simple brin sont générées indirectement par la réparation BER ou directement par les espèces oxygénées réactives et les rayonnements ionisants. Elles sont reconnues par PARP1 (poly (ADP-ribose) polymérase 1) qui s'associe à PARP2 (Amé *et al.*, 1999). PARP1 synthétise un polymère branché d'ADP ribose, le poly (ADP-ribose) (PAR) qui permet de recruter des effecteurs au niveau du site de la lésion tels que XRCC1 qui recrute et stimule à son tour des protéines impliquées dans le traitement des extrémités de la cassure simple brin : la polynucléotide kinase (PNK), l'endonucléase AP1 (APE1), l'ADN polymérase β (Lan *et al.*, 2004). Ces protéines permettent de phosphoryler l'extrémité 5' (extrémité 5'-phosphate) et de déphosphoryler l'extrémité 3' (extrémité 3'-OH) au niveau de l'interruption, ce qui est indispensable à la synthèse d'un nouveau brin d'ADN.

Le choix de la polymérase dépend de la source de la lésion et de la longueur du fragment à synthétiser. L'ADN polymérase β est particulièrement impliquée dans la réparation des brèches courtes alors que la réparation des brèches longues requiert l'ADN polymérase δ/ϵ (Fortini *et al.*, 1998 ; Stucki *et al.*, 1998). Cette étape de synthèse nécessite des protéines annexes telles que PARP-1 et FEN-1 qui stimulent l'ADN polymérase β alors que l'ADN polymérase δ/ϵ requiert PCNA. Enfin, la ligation terminale est réalisée soit par la ligase 3 pour la réparation des cassures simple brin médiée par l'ADN polymérase β , soit par la ligase 1 pour la réparation des brèches longues médiée par l'ADN polymérase δ/ϵ .

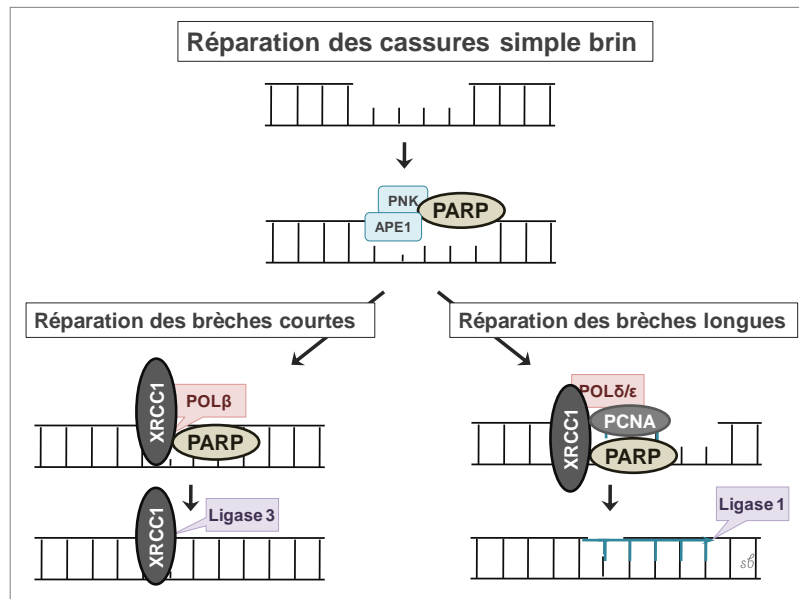


Figure 17. Réparation des cassures simple brin (SSBR)

e) Réparation des cassures double brin (DSBR)

Les cassures double brin de l'ADN sont des lésions extrêmement sévères du fait qu'elles posent des problèmes en termes de transcription, réplication et ségrégation des chromosomes. Les deux brins de l'hélice d'ADN sont rompus et le risque de réarrangement par translocation et délétion est important. Les cassures double brin sont causées par les radiations ionisantes, les ROS, les agents chimiques tels que les chimiothérapies.

Les cassures double brin diffèrent des autres types de lésions car elles affectent les deux brins d'ADN et le brin complémentaire fait défaut pour la réparation. Une défaillance dans la réparation de ces anomalies peut conduire à une instabilité chromosomique et à des processus oncogéniques. A cause de la nature très délétère de ces lésions, p53 joue un rôle fondamental dans le processus de réparation des cassures double brin.

La première réponse aux cassures double brin est la phosphorylation de l'histone H2AX (appartenant à la famille des histones H2A) par ATM et les autres PIKKs.

Il existe deux voies pour la réparation des cassures double brin : la recombinaison homologue (HR) et la recombinaison non homologue par la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ ou Non Homologous End Joining). Les deux principales différences entre ces deux voies sont (i) la présence ou non de l'ADN homologue de la chromatide sœur et (ii) la fidélité de la réparation. La recombinaison homologue corrige les cassures double brin en utilisant l'information génétique provenant de la molécule d'ADN homologue, non endommagée. La majorité des recombinaisons homologues a donc lieu en fin de phase S, en phase G2 et en phase M lorsque la chromatide sœur non endommagée est disponible puisque répliquée. Les

cellules différenciées, les cellules en phase G0 et phase G1 ont recours à l'autre voie de réparation non homologue, NHEJ.

La recombinaison homologue (HR) assure une réparation fidèle de la cassure double brin en se servant de la séquence homologue non endommagée comme « modèle » pour la réparation. La recombinaison homologue est initiée quand le complexe MRN (Mre11/Rad50/NBS1) détecte les cassures double brin. Sa phosphorylation par ATM stimule son activité 5'-3'exonucléasique. Il catalyse une digestion partielle des extrémités 5' générant des extrémités simple brin recouvertes par les protéines RPA pour les protéger. Puis, la réparation HR fait intervenir le groupe Rad52 comprenant les protéines Rad50, Rad51, Rad52, Rad54 et Mre11. Rad51 et ses paralogues Rad52 et Rad54 déplacent les protéines RPA en se liant à l'extrémité simple brin pour former un nucléofilament (ou filament nucléoprotéique). Puis, grâce à sa fonction de recombinaison, Rad51 associé à l'ADN recherche la région homologue intacte sur la chromatide sœur qui servira de matrice pour la réparation. La région génomique délétée en 3' est ensuite copiée grâce à l'ADN polymérase, puis liée grâce à l'ADN ligase 1. Ainsi, la lésion est réparée sans perte génétique.

La réparation HR est un mécanisme de réparation fidèle qui n'engendre généralement pas de perte génétique. Cependant, lorsque les cassures ont lieu dans des séquences hautement répétitives, la recherche d'homologie et la recombinaison peuvent être source de translocation.

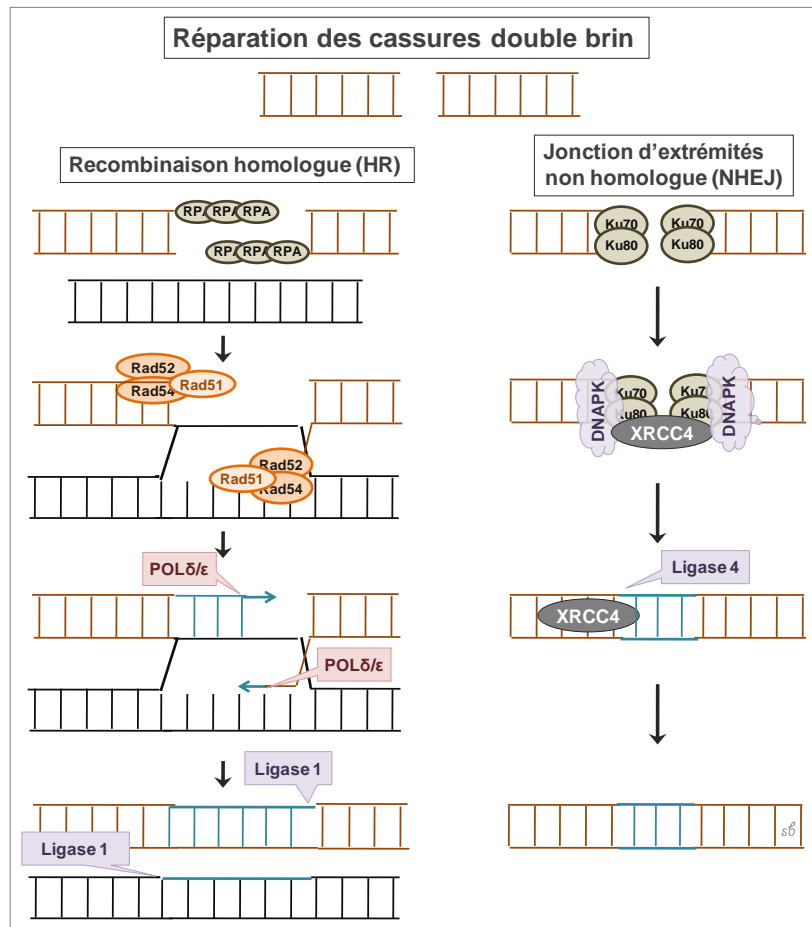


Figure 18. Réparation des cassures double brin (DSBR)

La réparation non homologue par la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) relie directement les extrémités de la cassure indépendamment de la présence de séquence homologue mais la correction des lésions s'accompagne d'erreurs accidentelles pouvant être à l'origine de pertes génétiques (délétions) ou d'insertions. La jonction d'extrémités non homologues est la forme majeure de réparation des cassures double brin lorsque le brin homologue n'est pas disponible comme en phase G₀, G₁ et au début de la phase S du cycle cellulaire. L'hétérodimère Ku70/Ku80 initie la jonction d'extrémités non homologues en se liant aux extrémités libres de l'ADN. Après la liaison à l'ADN rompu, l'hétérodimère s'associe à la sous unité catalytique DNA-PKcs formant l'holoenzyme DNA-PK (revue de Smith et Jackson, 1999). Cette protéine permet le maintien des deux extrémités au niveau du site de cassure. La protéine DNA-PK permet le recrutement au niveau de la cassure d'autres protéines telles que la protéine Artemis, XRCC4, le complexe MRN et l'ADN ligase 4. Afin d'être ultérieurement reliées, les extrémités libres de la cassure sont alignées et traitées par différentes protéines ou complexes : le complexe MRN qui possède des activités exonucléase, endonucléase et hélicase (Paull et Gellert, 1999), la protéine Artemis qui possède une activité exonucléase dégradant les épingles à cheveux lorsqu'elle est associée à la DNA-PKcs qui

l'active par phosphorylation (Schlissel, 2002), et la PNK qui présente des activités 5' kinase et 3' phosphatase (Karimi-Busheri *et al.*, 1999). Enfin, les deux extrémités de l'ADN bicaténaire nettoyées et mises bout à bout sont directement liées par le complexe ADN ligase 4/XRCC4.

La réparation NHEJ est un mécanisme de réparation qui peut engendrer des erreurs conduisant à des pertes génétiques (délétions), des translocations et des insertions.

3. Apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée qui dépend de l'activation de caspases (protéases). Selon le signal initial, l'apoptose est déclenchée selon deux voies apoptotiques : la voie intrinsèque ou la voie extrinsèque (revue de Jin et El-deiry, 2005).

La voie extrinsèque de l'apoptose, également appelée voie médiée par les récepteurs de mort, nécessite pour son activation la fixation d'un ligand sur des récepteurs membranaires situés à la surface de la cellule. La fixation du ligand stimule un ensemble de complexes de signalisation (DISC ou death-inducing signaling complex) induisant la mort cellulaire. Ces complexes sont formés de molécules adaptatrices et de la pro-caspase 8, et sont situés au niveau du domaine cytosolique du récepteur activé. La formation du DISC induit l'oligomérisation et l'activation de la caspase 8 initiateur. Cette caspase active par clivage des caspases effectrices en aval comme la caspase 3 pour induire la mort cellulaire.

La voie intrinsèque de l'apoptose induit la mort cellulaire par interruption du fonctionnement mitochondrial. En réponse à un stimulus apoptotique, les membres de la famille proapoptotique Bcl-2 s'accumulent et perméabilisent la membrane mitochondriale ayant pour conséquence la libération du cytochrome c. Le cytochrome c cytosolique permet la formation de l'apoptosome, formé du cytochrome c, de la pro-caspase 9 et de l'Apaf1 (Apoptotic protease activating factor-1). La formation de l'apoptosome active la caspase 9 initiateur. Cette caspase active par clivage les caspases effectrices comme la caspase 3, qui activent à leur tour par clivage des protéines responsables de l'apoptose.

Il existe également des morts cellulaires programmées indépendantes des caspases (Belmonkhtar *et al.*, 2003), et en particulier une voie mitochondriale faisant intervenir l'AIF.

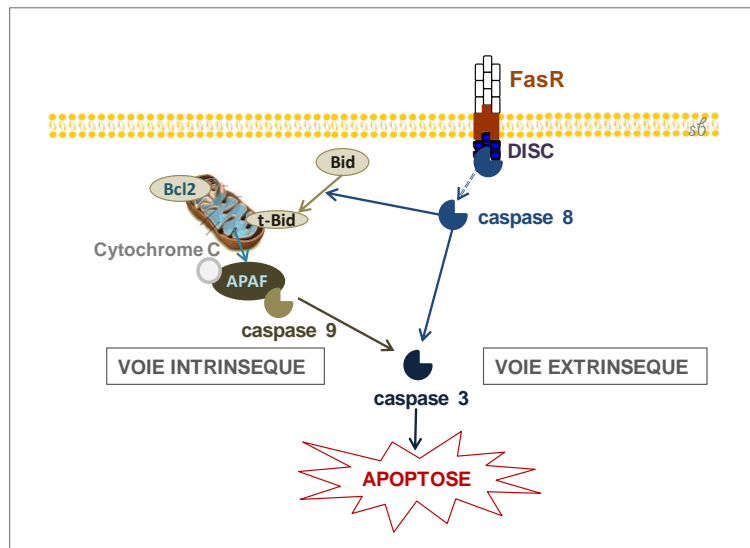


Figure 19. Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

Lorsque les lésions génomiques sont très importantes, p53 par sa fonction transactivatrice stimule l'apoptose. La protéine p53 favorise la voie extrinsèque de l'apoptose en régulant positivement les récepteurs de mort comme TRAIL, DR4 (death receptor 4), DR5 (death receptor 5), mais également les récepteurs Fas (CD95) et Fas/APO1 ligand (Owen-schaub *et al.*, 1995 ; Jin et El-Deiry, 2005).

La protéine p53 active également la voie intrinsèque de l'apoptose par de nombreux mécanismes récapitulés dans la revue de Harms (2004). Elle induit par son activité transactivatrice les membres de la famille proapoptotique Bcl-2, Bax, Noxa et PUMA. Elle stimule également l'expression d'Apaf1 et p53AIP1 impliquées également dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Par ailleurs, p53 favorise la libération du cytochrome c lorsqu'il est transloqué dans la mitochondrie (Mihara *et al.*, 2003).

4. Sénescence

La sénescence cellulaire est définie comme un programme physiologique induit par (i) le raccourcissement des télomères, c'est la sénescence répllicative et (ii) par d'autres stress tels que les lésions de l'ADN et l'activation d'oncogènes, c'est la sénescence prématurée ou métabolique. Les cellules sénescents sont caractérisées par un arrêt permanent du cycle cellulaire, une altération du programme transcriptionnel et l'impossibilité de répliquer l'ADN.

La protéine p53 régule à la fois la sénescence répllicative et la sénescence prématurée. La sénescence répllicative est activée par des signaux télomériques et est maintenue par la voie p53-p21-Rb (protéine du rétinoblastome). La phosphorylation de p53 sur la sérine 15 et l'accumulation de p21 durant la sénescence répllicative suggèrent que le raccourcissement des télomères pourrait induire un signal analogue à celui des cassures double brin (Adda di

Fagagna *et al.*, 2003). En revanche, la sénescence prématurée est activée par un signal non télomérique, comme les lésions de l'ADN, l'activation d'oncogènes ou la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). Le signal non télomérique active à la fois la voie p53-p21-Rb et la voie p16-Rb pour induire la sénescence (Robles et Adami, 1998).

Pour démontrer le rôle important de p53 et p21 dans le programme de sénescence, il a été montré que les cellules HCT116 mutée p53-/p53- et p21-/p21- sont moins capables d'entrée en sénescence suite à des lésions de l'ADN (Schmitt *et al.*, 2002).

5. Différenciation

La différenciation peut également être une autre voie par laquelle la protéine p53 élimine les cellules endommagées. Les cellules souches ayant la capacité d'autorenouvellement résistent à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose, faisant d'elles les cibles principales de processus tumoraux. La protéine p53 favorise la différenciation des cellules souches en un type cellulaire moins tumoral et compétent pour l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Il a été montré que suite à des lésions, p53 réprime l'expression de Nanog, une protéine impliquée dans l'autorenouvellement des cellules souches (Lin *et al.*, 2005). Par ailleurs, p53 induit la différenciation des cellules L12, une lignée cellulaire B murine. Les cellules doivent sortir du cycle cellulaire pour se différencier et p53, en permettant l'arrêt du cycle cellulaire, favorise la différenciation (Shaulsky *et al.*, 1991). La protéine p21 joue vraisemblablement un rôle dans cette différenciation et contribue certainement à l'arrêt initial du cycle cellulaire.

Ainsi, suite à des lésions de l'ADN, p53 induirait p21 et réprimerait Nanog.

6. Autophagie

L'autophagie est un processus intracellulaire dans lequel le cytoplasme et les organites sont séquestrés dans une structure limitée par une membrane, appelée « autophagosome », puis dégradée par les lysosomes. Au départ, l'autophagie a été considérée comme une forme de mort cellulaire programmée, actuellement l'autophagie est considérée comme compétente pour promouvoir à la fois la mort et la survie cellulaire (Baehrecke, 2005 ; Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009).

Il a été suggéré que l'autophagie pourrait être une voie suppressive de tumeurs puisque les souris hétérozygotes pour Beclin-1 (protéine impliquée dans l'autophagie) montrent une atténuation de l'autophagie et une augmentation de la prolifération cellulaire (Qu *et al.*, 2003). Cependant, d'autres études suggèrent un rôle important de l'autophagie dans la survie cellulaire. Dans des conditions normales de croissance cellulaire, l'autophagie est inhibée par mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), une kinase de la voie de survie PI3K/Akt. Suite à

des lésions de l'ADN, p53 bloque la répression de l'autophagie par mTOR par l'induction de PTEN et TSC2 et l'activation d'AMPK (Feng *et al.*, 2005).

A l'heure actuelle, l'autophagie induite par p53 présenterait une fonction protectrice en éliminant les mitochondries capables de produire des ROS et en recyclant les composés cytosoliques lors d'une privation de nutriment. En effet, la présence de mitochondries altérées ne permet pas de maintenir la production énergétique mais génère des ROS, conduisant ainsi à l'activation de p53. L'apoptose nécessitant de l'ATP pour l'activation des caspases, l'autophagie induite par p53 serait une forme alternative de mort cellulaire pour les cellules déplétées en énergie (Liu *et al.*, 2009).

III. GENOTOXICITE DES RADIOFREQUENCES

A. Problématique générale

Les effets biologiques des ondes électromagnétiques (OEM) résultent d'un transfert d'énergie à la matière vivante. Ce transfert est à l'origine d'une série de phénomènes physiques et chimiques qui induisent des lésions cellulaires dont une des cibles peut être l'ADN. Il peut être altéré de manière directe par des phénomènes d'ionisation ou d'excitation (RI), ou bien de manière indirecte par la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). Il est admis qu'une énergie d'1 eV est nécessaire pour rompre les liaisons des molécules d'ADN. Or les radiofréquences de 900 à 1800 MHz présentent une énergie trop faible pour endommager directement l'ADN. Cependant, des lésions de l'ADN peuvent être provoquées indirectement par des mécanismes encore inconnus ou par exemple par la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS) issues de la transformation de molécules d'eau (Oktem *et al.*, 2005 ; Ozguner *et al.*, 2005 ; Desai *et al.*, 2009). Ces lésions provoquées conduisent à un arrêt du cycle cellulaire pour permettre leur réparation. Si les anomalies sont trop importantes, un processus apoptotique est activé conduisant la cellule à une mort cellulaire programmée. Cependant, certaines anomalies non ou mal réparées peuvent persister et conduire à des instabilités génétiques, pouvant être à l'origine d'un processus tumoral (Mitelman, 1995).

La cancérogenèse est un processus multi-étape par lequel une cellule normale va progressivement et lentement se transformer en cellule maligne (revue de Fearon, 1991). Cette transformation résulte de l'activation d'oncogènes (c-fos, c-jun, c-myc...) et de l'accumulation d'anomalies génétiques (mutations) en particulier au niveau de gènes critiques comme les gènes suppresseurs de tumeur (p53) et les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN conduisant la cellule à une instabilité

génétique. Classiquement, on considère que la cancérogenèse s'effectue en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 20).

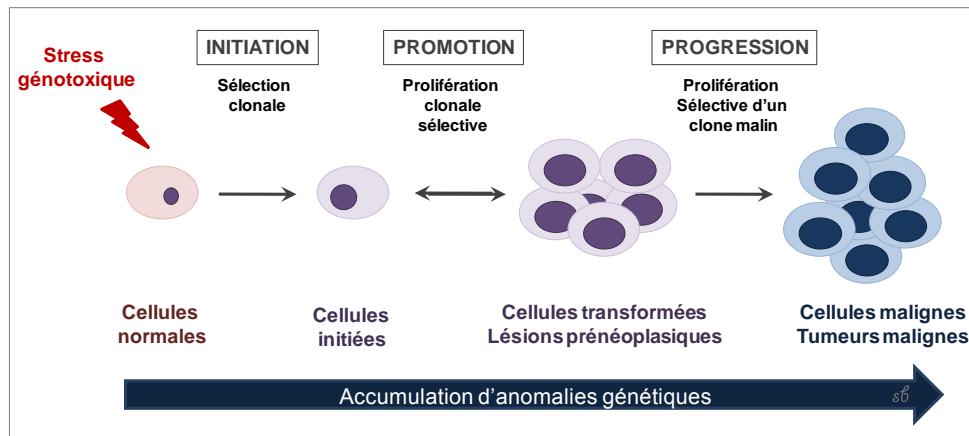


Figure 20. Processus de cancérogenèse

L'initiation correspond à un processus irréversible secondaire à l'apparition de lésions génétiques définitives qui seront transmises aux cellules filles. La cellule acquiert un avantage sélectif lui permettant de donner naissance à un premier clone de cellules anormales présentant une altération de la maturation. Les cellules initiées ne sont pas des cellules tumorales et leur capacité de prolifération n'est pas augmentée. La phase d'initiation conduit à des lésions précancéreuses ou des dysplasies pour les cellules épithéliales. Cette phase est initiée par des agents initiateurs capables de provoquer des lésions génomiques. Ces agents génotoxiques ou mutagènes peuvent être de nature chimique, physique, biochimique (ROS) et biologique (virus)....

La promotion consiste en une prolifération clonale des cellules initiées. L'augmentation du taux de divisions cellulaires augmente le risque de mutations. Dans ces cellules présentant un avantage sélectif, la probabilité qu'une seconde mutation apparaisse et soit sélectionnée est plus importante. Dans ce cas, une seconde population sera générée, plus anormale que la première. La promotion conduit à la formation de cellules transformées à la limite de la malignité. La transformation cellulaire s'accompagne progressivement de la perte de la différenciation, de l'incapacité des cellules cancéreuses à équilibrer la division cellulaire par la mort cellulaire (apoptose) et de la formation de leur propre système vasculaire (angiogénèse). La phase de promotion aboutit à la formation de lésions préneoplasiques ou de formes dites « *in situ* ». Cette phase est favorisée par les des agents promoteurs capables soit de stimuler la prolifération cellulaire, soit de causer une désorganisation tissulaire (inflammation, infection, déséquilibres hormonaux, alcool...).

La progression correspond à une multiplication des cellules malignes. L'accumulation successive de plusieurs mutations, chacune d'elles permettant la sélection d'un clone de plus

en plus malin, conduit à une cellule hautement cancéreuse. Les cellules cancéreuses perdent leur capacité d'interaction, présentent une croissance non contrôlée, ne régulent plus leur cycle cellulaire, échappent à l'apoptose et résistent aux agents antimitotiques. Elles envahissent les tissus environnants et se disséminent finalement par voie sanguine ou lymphatique pour gagner les organes distants formant des métastases.

L'étude des effets génotoxiques des radiofréquences est importante étant donné que les lésions de l'ADN peuvent représenter un mécanisme initiateur d'un processus cancérigène.

B. Méthodes d'étude de la génotoxicité des radiofréquences

Afin d'évaluer les effets génotoxiques des radiofréquences sur les cellules eucaryotes, quatre tests ont été largement utilisés, ce sont des méthodes de génotoxicité dites « classiques » : le test des comètes, le test des échanges de chromatides sœurs, le test des aberrations chromosomiques et le test des micronoyaux. D'autres méthodes ont également été employées mais leur usage reste encore limité : l'étude de l'expression H2AX et de 53BP1 par immunofluorescence, l'étude des aneuploïdies par l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et l'étude de la conformation de la chromatine par la mesure de la viscosité au cours du temps (AVTD ou anomalous viscosity time dependencies). Le test d'Ames est le seul test réalisé sur cellules procaryotes pour étudier les effets mutagènes d'un agent génotoxique.

1. Méthodes classiques

a) Test des comètes

Le test des comètes (ou « single cell gel electrophoresis assay ») doit son nom à la forme des images analysées au microscope. Il comporte une électrophorèse en microgel qui permet d'évaluer les lésions primaires de l'ADN (cassures double brin) cellule par cellule. Le traitement alcalin introduit par l'équipe de Singh (1988) permet de dénaturer l'ADN et de détecter ainsi les sites labiles alcalins, les cassures simple brin, les sites de réparation et les pontages.

Ce test ne nécessitant pas de culture *in vitro* permet de détecter des lésions précoces de l'ADN.

Cette méthode est généralement réalisée sur les lymphocytes sanguins, mais elle peut être utilisée sur n'importe quel type cellulaire (cellules nerveuses, cellules épithéliales, spermatozoïdes...). Les cellules peuvent être immédiatement traitées. Elles sont mélangées avec de l'agarose qui sera étalé sur une lame de microscope en formant un gel. Ensuite, elles

sont lysées avec un détergent et les protéines sont extraites par des solutions salines afin de libérer l'ADN. L'ADN nucléaire est généralement dénaturé en milieu alcalin (pH > 13) (Singh *et al.*, 1988), puis subit une électrophorèse. Les fragments d'ADN nucléaires de petite taille migrent en direction de l'anode en formant une image de comète à l'avant des molécules d'ADN nucléaire intactes. Après l'électrophorèse, l'ADN est coloré avec un fluorochrome tel que le bromure d'éthidium. Dans le cas d'un traitement alcalin, une étape de neutralisation est réalisée avant la coloration.

Au moins 50 cellules sont analysées (Figure 21-D) avec un système d'analyse d'image (par exemple Komet 3.0) afin de déterminer plusieurs paramètres associés aux lésions de l'ADN :

- Longueur de la comète (comet length ou CL) qui correspond à la longueur totale de la comète exprimée en μm
- Longueur de la queue de la comète (tail length ou TL) mesurée du centre du noyau jusqu'à la fin de la queue (exprimée en μm)
- Le pourcentage d'ADN migré dans la queue de la comète par rapport à l'ADN total (tail DNA ou TD)
- Le moment de la queue de la comète (tail moment ou TM) qui correspond à la longueur de la queue multipliée par le pourcentage d'ADN avec $\text{TM} = \text{TL} \times \text{TD}$.

Ce test est un des plus utilisés en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de son faible coût.

b) Test des échanges de chromatides sœurs (SCE)

Le test des échanges de chromatides sœurs (SCE pour « Sister Chromatid Exchange ») consiste à étudier les échanges entre chromatides sœurs pendant la phase S du cycle cellulaire. Ces échanges résultent de cassures des deux brins de l'ADN, suivie d'un échange des fragments d'ADN double brin. Cette méthode permet de d'observer les échanges symétriques et asymétriques entre les chromatides sœurs au cours du phénomène de réparation des cassures double brin par recombinaison homologue et d'étudier les molécules qui interfèrent avec la réplication de l'ADN.

Ce test est généralement réalisé sur des lymphocytes sanguins en culture. La prolifération lymphocytaire est obtenue par stimulation par la phytohémagglutinine pendant 72 heures, soit 2 cycles cellulaires. La culture cellulaire est réalisée en présence de bromodésoxyuridine (BrdU, analogue de la thymidine) afin d'obtenir une coloration différentielle des deux chromatides sœurs. A la fin des 72 heures de culture, les lymphocytes en division sont bloqués au stade de (pro)métaphase de la mitose par l'ajout d'un inhibiteur du fuseau mitotique comme la colchicine. Les cellules bloquées en métaphase subissent un choc hypotonique et sont fixées (mélange méthanol/acide acétique) et colorées par du giemsa. Les chromatides dans lesquelles

un brin d'ADN a incorporé du BrdU au cours de la réplication présentent une coloration foncée normale. Les chromatides dans lesquelles les deux brins d'ADN ont incorporé le BrdU présentent une coloration claire. Les échanges entre chromatides sœurs peuvent être ainsi détectés par l'aspect arlequin caractéristique des chromosomes (Figure 21-C). Cette méthode peut être également réalisée sur d'autres types cellulaires, à condition qu'ils soient cultivables *in vitro*.

Les paramètres permettant d'évaluer les lésions de l'ADN sont les suivants :

- Le taux d'échanges de chromatides sœurs par cellule (SCE/cell) qui correspond au nombre total de SCE divisé par le nombre total de cellules analysées. Il est généralement évalué sur 50 métaphases en 2^{ème} division (M2).
- Le pourcentage de cellules en 1^{ère} division (M1), en 2^{ème} division (M2) et en 3^{ème} division (M3) en analysant environ au moins 200 métaphases
- L'indice de prolifération (PI) peut être ainsi déterminé avec $PI = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / 100$
- Le taux d'aberrations chromosomiques incluant les cassures des chromatides et des chromosomes, les gaps, les fragments acentriques et les chromosomes dicentriques

Cette méthode impliquant une culture cellulaire est longue et donc peu utilisée.

c) Test des aberrations chromosomiques (CA)

Le test des aberrations chromosomiques (CA pour « Chromosomal Aberrations ») consiste à étudier les anomalies de structure et de nombre des chromosomes. Les aberrations chromosomiques de structure sont secondaires à des cassures suivies ou non d'un recollement incorrect. Elles se traduisent par des fusions chromosomiques, des translocations (échanges de segments chromosomiques), des délétions (pertes d'un segment chromosomique), des duplications (gains d'un segment chromosomique)... Les aberrations chromosomiques sont également dues à un défaut de réparation des mésappariements. Les réarrangements chromosomiques sont fortement impliqués dans les processus de cancérogenèse faisant de ce test une méthode importante pour estimer le risque tumoral (Solomon *et al.*, 1991 ; Mitelman, 1995).

Le test des aberrations chromosomiques est généralement réalisé à partir de lymphocytes sanguins cultivés *in vitro*. Cependant, ce test peut être également réalisé sur d'autres types cellulaires en prolifération. La culture lymphocytaire est réalisée pendant environ 48 heures en présence de phytohémagglutinine, molécule stimulant la prolifération lymphocytaire. A la fin de la culture, un inhibiteur du fuseau mitotique de type colchicine est ajouté afin de bloquer les lymphocytes au stade de (pro)métaphase de la mitose. Les cellules en métaphase

subissent un choc hypotonique et sont fixées (mélange méthanol/acide acétique) puis colorées par le giemsa.

Les paramètres analysés pour évaluer les effets génotoxiques sont les suivants :

- Le pourcentage de cellules présentant des aberrations chromosomiques
- Le score d'aberrations cytogénétiques : (i) les aberrations de type chromosome : les cassures chromosomiques (score 2) les chromosomes dicentriques (score 4), les chromosomes acentriques (score 2), les chromosomes en anneau (score 4) et (ii) les aberrations de type chromatidique : les cassures chromatidiques (score 1), les gaps et isogaps.
- La fréquence des aberrations chromosomiques correspondant au nombre total d'aberrations sans les gaps pour 100 cellules analysées.

Il est également possible de déterminer les anomalies numériques (gains ou/et pertes chromosomiques).

Cette méthode est peu utilisée car elle exige des compétences et expertises spécifiques et demande un travail conséquent.

d) Test des micronoyaux (MN)

Le test des micronoyaux (ou CBMN pour « Cytokinesis-Blocked MicroNucleus ») a été développé par Fenech et Morley (1985). Il consiste à étudier les pertes de matériel génétique sous forme d'un micronoyau. Le MN se forme au cours de la division cellulaire lorsqu'un chromosome entier ou un fragment chromosomique n'est pas réintégré dans le noyau de la cellule fille. Le test des micronoyaux détecte les effets aneuploïdogènes avec perte d'un chromosome entier par retard à l'anaphase ou perturbation du fuseau mitotique et les effets clastogènes avec perte d'un fragment acentrique suite à une cassure chromosomique.

Le test des micronoyaux est généralement réalisé sur des lymphocytes sanguins cultivés *in vitro*, mais il peut être également réalisé sur d'autres types cellulaires (fibroblastes). Au bout de 44 heures de culture cellulaire, la cytodierèse est bloquée par l'ajout de la cytochalasine B, un inhibiteur des actines. Ainsi, les cellules ayant effectué une division cellulaire sont binucléées alors que les cellules ne se divisant pas restent mononucléées. Les cellules sont ensuite fixées (mélange méthanol/acide acétique) après 72 heures de culture et colorées au giemsa (Figure 21-A) ou au DAPI. La combinaison du test des micronoyaux avec l'hybridation *in situ* (FISH) à l'aide de sondes (péri)centromériques permet de distinguer les MN contenant un chromosome entier (MN centromère positif) des MN contenant un fragment chromosomique acentrique (MN centromère négatif). La recherche d'une région (péri)centromérique peut être également réalisée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps

anti-kinétochores qui se fixent sur la région d'attachement du fuseau mitotique sur le chromosome.

Les paramètres généralement étudiés pour évaluer la génotoxicité sont les suivants :

- Le pourcentage de cellules binucléées
- Le nombre total de cellules binucléées comportant (i) des MN, (ii) un MN (BN1MN), (iii) deux MN (BN2MN) et (iv) trois MN (BN3MN)
- Le nombre total de MN pour 100 à 4000 cellules binucléées avec nombre total de MN = $(1 \times \text{BN1MN}) + (2 \times \text{BN2MN}) + (3 \times \text{BN3MN})$
- L'index de réplication (RI) avec $\text{RI} = (1 \times \text{CMN} + 2 \times \text{CBN} + 3 \times \text{CTN}) / \text{nombre total de cellules}$ (CMN : cellule mononucléée, CBN : cellule binucléée, CTN : cellule trinuécléée)

Le test des micronoyaux peut être également réalisé en l'absence de cytochalasine B. La présence des micronoyaux résulte d'une division *in vivo* et est évalué sur des cellules mononucléées (Figure 21-B). Ce test est généralement pratiqué sur les érythrocytes médullaires ou sanguins dans lesquels un micronoyau (ou corps de Jolly) peut persister lors de la transformation de l'érythroblaste en érythrocyte. L'étude des MN est complétée par l'évaluation de la maturité cellulaire après coloration par l'acridine orange afin de déterminer le taux d'érythrocytes immatures polychromatophiles.

Le test des micronoyaux est très utilisé du fait sa rapidité de mise œuvre et de son faible coût.

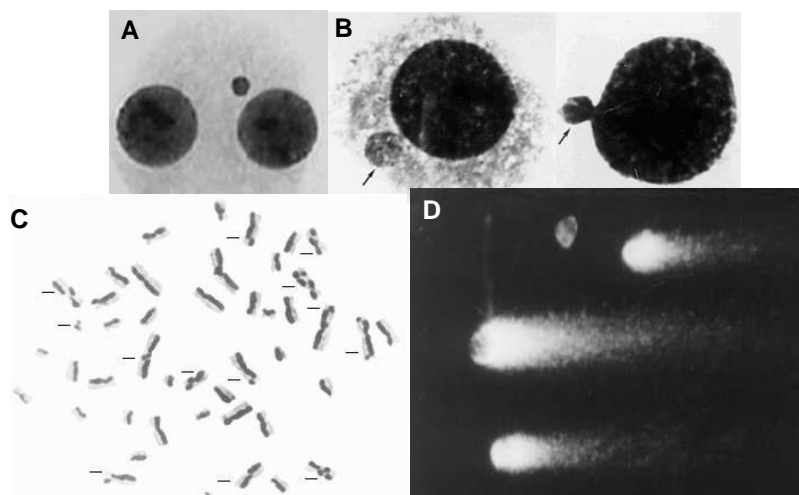


Figure 21. Les méthodes classiques d'évaluation de la génotoxicité.
Figures A et B : test des micronoyaux. Figure C : test des échanges de chromatides sœurs.
Figure D : test des comètes

2. Les autres méthodes

Les effets génotoxiques des radiofréquences ont également été évalués par d'autres méthodes moins utilisées du fait de leur développement plus récent, à l'exception du test d'Ames.

- **Test d'Ames** est une méthode réalisée sur des cellules procaryotes telles que les bactéries. Cette méthode développée par l'équipe d'Ames (1973) permet d'étudier les effets mutagènes d'une substance. Le test d'Ames est généralement réalisé sur *Salmonella typhimurium* inapte à synthétiser l'histidine, souche auxotrophe (his⁻). Ce test consiste à évaluer la prolifération de ces bactéries dans un milieu dépourvu d'histidine par mutation réverse des gènes pour l'histidine, redonnant ainsi des souches sauvages (his⁺).

- **L'hybridation Fluorescente *in situ* (FISH ou Fluorescence *In situ* Hybridation)** consiste à hybrider une région chromosomique à l'aide de sondes fluorescentes complémentaires de la séquence génomique étudiée. L'hybridation réalisée à l'aide de sondes centromériques permet d'étudier les effets aneuploïdogènes (pertes ou gains chromosomiques). L'hybridation totale de certains chromosomes par peinture chromosomique permet d'étudier les cassures chromosomiques et les aberrations chromosomiques. L'hybridation est généralement ciblée et ne concerne que certaines régions d'un nombre limité de chromosomes.

- **L'étude de l'expression de protéines recrutées lors de lésions de l'ADN comme H2AX et 53BP1** peut être réalisée par western blot ou immunofluorescence. La forme phosphorylée de l'histone H2AX forme des agrégats ou foyers au niveau des cassures double brin de l'ADN. La protéine 53BP1 se lie également à l'ADN endommagé. Ces deux protéines sont des marqueurs indirects des cassures double brin de l'ADN, impliquées dans la voie d'ATM. Par ailleurs, l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose peut être également étudiée sur puce (« microarray »).

- **L'état de condensation de la chromatine** est étudié par une technique de mesure de la viscosité (AVTD) décrite par Alipov et Belyaev (1996). La compaction de la chromatine est modulée par des modifications épigénétiques de l'ADN (méthylation, phosphorylation et acétylation des histones) qui jouent un rôle dans la régulation de l'expression de gènes.

Conclusion sur les méthodes d'étude de la génotoxicité : de nombreuses méthodes sont employées pour étudier de manière directe les effets génotoxiques. Elles permettent d'évaluer (i) les effets clastogènes provoqués par des cassures chromosomiques, (ii) les effets aneuploïdogènes résultant d'une malségrégation d'un chromosome ou d'un fragment chromosomique et (iii) les effets mutagènes par augmentation du nombre spontané de mutations. Ces dernières années, sont apparues de nouvelles méthodes, permettant d'évaluer les effets génotoxiques de manière indirecte par la détection de certaines protéines impliquées

dans les voies de signalisation des lésions de l'ADN et dans la réponse cellulaire, ainsi que par les modifications de la compaction de la chromatine.

La figure 22 résume la finalité des différentes méthodes permettant d'évaluer la génotoxicité.

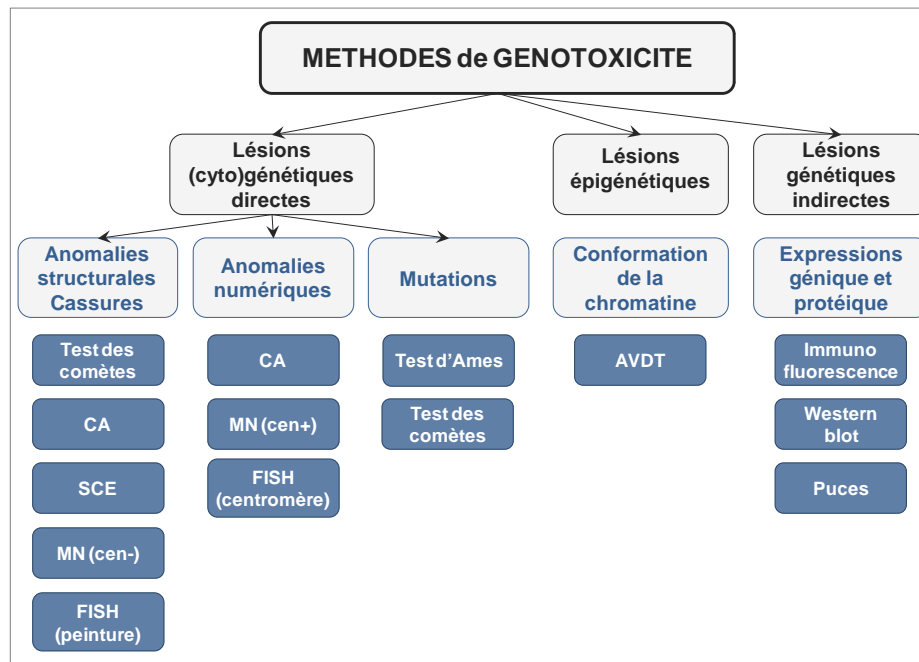


Figure 22. Les différentes méthodes utilisées pour évaluer la génotoxicité des radiofréquences et leurs finalités

C. Présentation générale des études de génotoxicité réalisées dans le cadre des radiofréquences

L'étude des effets génotoxiques des radiofréquences est importante puisque les lésions de l'ADN peuvent représenter un facteur initiateur d'un processus cancérogène. Une revue de la littérature des quinze dernières années (1995-2010) portant sur les effets génotoxiques des radiofréquences allant de 800 MHz à 2450 MHz a été réalisée afin de faire le point sur les méthodes d'exposition, les modèles biologiques exposés et les méthodes utilisées pour étudier un potentiel effet génotoxique des radiofréquences. Quarante et deux articles représentant environ 800 protocoles expérimentaux différents portant sur les effets génotoxiques des RF ont été analysés (annexe 1). Par ailleurs, les seize études publiées entre 2005 et 2010 portant sur les effets des RF sur l'expression génique, ont également été lues (annexe 2). Les études utilisant des tests de transformation cellulaire n'ont pas été prises en compte.

Cette revue de la littérature montre que les études sont extrêmement variées quant aux conditions d'exposition (fréquence, type signal, DAS, durée d'exposition, co-exposition...) et quant aux méthodes biologiques employées (exposition *in vitro* ou *in vivo*, modèle biologique,

méthodes d'évaluation de la génotoxicité...). Les études portant sur l'exposition humaine n'ont pas été prises en compte du fait que le DAS ne peut être calculé et que les conditions d'exposition ne sont pas précisément définies (durée d'exposition, fréquence d'exposition...) (Garaj-Vhrovac, 1999 ; Gadhia *et al.*, 2003 ; Gandhi et Singh, 2005A ; Gandhi et Gandhi 2005B ; Maes *et al.*, 2006 ; Yadav et Sharma, 2008)

Les systèmes biologiques ont été exposés soit *in vitro*, soit *in vivo*. Les études *in vitro* représentent le $\frac{3}{4}$ des études (62/82, soit 76%). Elles ont été réalisées à partir (i) de cellules humaines ou animales isolées de tissus afin de réaliser des cultures primaires, la majorité des études ayant été réalisée à partir de leucocytes sanguins de donneurs humains (ii) de lignées cellulaires humaines ou animales soit obtenues à partir de tumeurs, soit issues d'un processus d'immortalisation et/ou de transformation et (iii) de cellules procaryotes comme les bactéries (test d'Ames). A notre connaissance, très peu d'études de génotoxicité ont porté sur des plantes (Quian *et al.*, 2006 ; Roux *et al.*, 2007). Les études *in vivo* sont généralement réalisées sur des rats ou des souris pouvant être génétiquement modifiées. Elles représentent un quart des études (20/82, soit 24%).

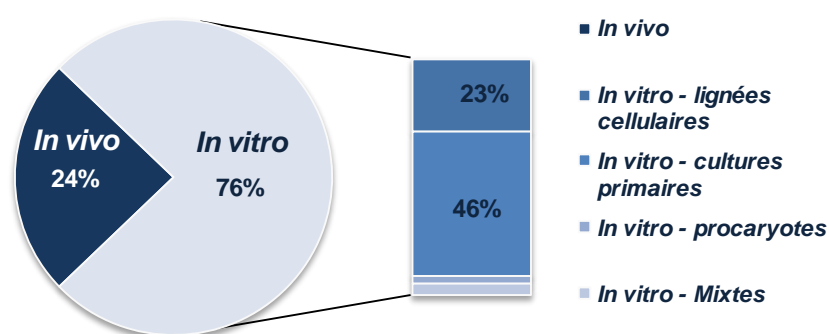


Figure 23. Parts des différents types d'études et modèles biologiques (n = 82 publications).

Ces différents modèles biologiques ont été exposés à des radiofréquences allant de 800 à 2450 MHz dans des conditions d'exposition extrêmement variables en ce qui concerne la fréquence, le type de signal, la puissance moyenne (DAS), la durée d'exposition, le caractère continu ou intermittent de l'exposition et la durée post-exposition avant l'analyse.

La durée d'exposition des études *in vitro* est généralement courte variant d'un quart d'heure à 72 heures, l'exposition est qualifiée d'aigüe ou subaigüe. La durée d'exposition sur les modèles animaux *in vivo* a été assez longue allant de plusieurs semaines à plusieurs années, elle est alors qualifiée de chronique.

Les modalités d'exposition ont varié : pour les études réalisées *in vitro*, l'exposition aux radiofréquences a majoritairement été continue (51/62 publications, soit 82%). Certaines expositions ont été réalisées de manière intermittente (11/62 publications, soit 18%). Pour les

études *in vivo*, l'exposition a généralement été discontinuée pendant plusieurs semaines ou mois.

Parmi l'ensemble des études analysées ($n = 82$), le DAS moyen a varié d'une étude à l'autre, il s'étend de 0,0024 W/kg (Phillips *et al.*, 1998) à 200 W/kg (Koyama *et al.*, 2004). La majorité des expérimentations a été réalisée à des niveaux de puissance inférieure à 5 W/kg (67/82 publications, soit 81%). Il faut noter qu'un grand nombre d'études énoncent une valeur de DAS sans préciser la méthode dosimétrique.

Un quart des études ont étudié un éventuel effet génotoxique retardé (21/82 publications, soit 25%). Pour rechercher cet effet, l'analyse a été réalisée un certain temps après la fin de l'exposition et la durée post-exposition a varié de 4 heures à 72 heures.

Certaines études ont combiné l'exposition de l'onde électromagnétique avec un autre agent génotoxique pouvant être de nature chimique (bléomycine, mitomycine...) ou physique (UV, rayons X et gamma) afin d'évaluer un effet co-génotoxique potentialisateur des radiofréquences. Cet effet co-génotoxique a été recherché dans environ un tiers des études (26/82 publications, soit 31%).

L'étude des effets génotoxiques a été réalisée à l'aide de différentes méthodes (cf. paragraphe précédent) : (i) les méthodes dites « classiques » comprenant les tests des comètes, des micronoyaux, des échanges de chromatides sœurs et des aberrations chromosomiques et (ii) les autres méthodes d'usage plus limité comme l'expression de la forme phosphorylée H2AX, le test d'Ames, la FISH... La figure 24 montre l'importance de chaque méthode pour étudier les effets génotoxiques des radiofréquences.

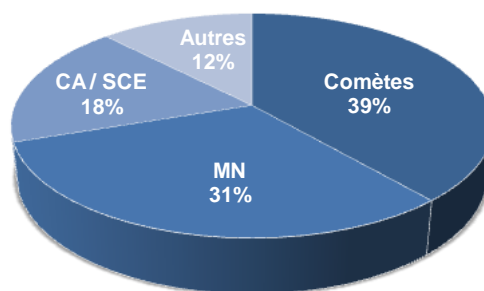


Figure 24. Parts des différentes méthodes d'évaluation de la génotoxicité des radiofréquences ($n = 82$ études)

Les résultats de ces études publiées ont été analysés à l'aide de tests statistiques en comparant les résultats des modèles exposés aux résultats des modèles sham-exposés ou contrôles. Des effets génotoxiques significatifs ont été retrouvés dans environ la moitié des études (39/82 publications, soit 47%). Mais ce chiffre est à nuancer car seulement 20% (157/800) des

conditions expérimentales ont montré des effets positifs. Certains de ces effets ont même été infirmés dans d'autres études (Lai et Singh 1995, 1996 et 1997 ; Malyapa *et al.*, 1997A et 1997B).

La figure 25 résume les différentes conditions expérimentales réalisées pour évaluer les effets génotoxiques *in vivo* des radiofréquences en fonction de la fréquence et du niveau de puissance testé (DAS). Vingt publications ont été analysées, huit publications montrent des effets génotoxiques significatifs (ou « positifs »), soit 40%. Au total, cent huit conditions expérimentales ont été testées, seulement 15% des expérimentations (16/108) montrent des effets positifs. La plupart de ces effets positifs ont été infirmés ultérieurement.

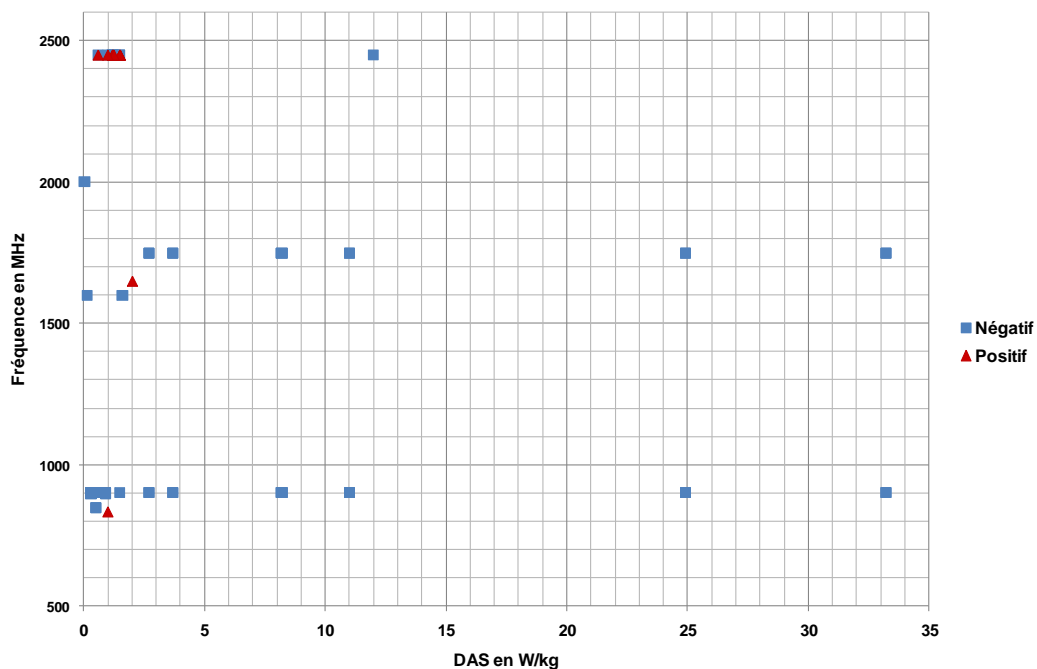


Figure 25. Répartition des études positives et négatives réalisées *in vivo* en fonction de la fréquence et de la puissance ($n = 108$ expériences publiées dans 20 études).
 Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).
 Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négatif (carré bleu).

De même les figures 26-A et 26-B récapitulent les différentes conditions expérimentales réalisées pour étudier les effets génotoxiques *in vitro* des radiofréquences en fonction de la fréquence et du niveau de puissance (DAS). Seules les expérimentations utilisant des méthodes classiques ont été prises en compte. Cinquante trois publications ont été analysées. Vingt quatre publications décrivent des effets génotoxiques significatifs (24/53, soit 45%), mais seulement 18% des conditions expérimentales (116/626 expériences) montrent un effet positif. La plupart des conditions expérimentales montrant des effets positifs ont été reproduites révélant parfois des résultats contradictoires.

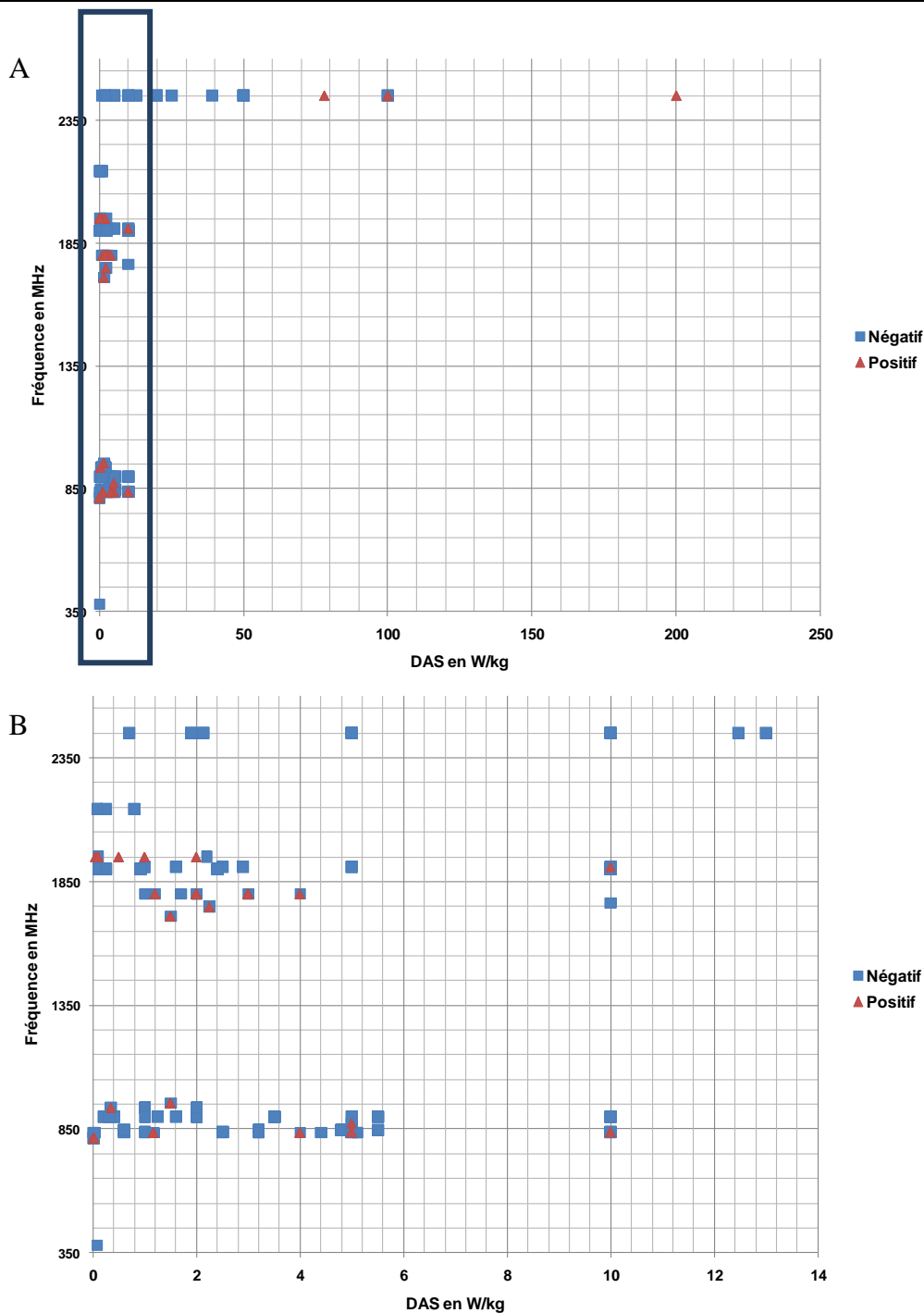


Figure 26. Répartition des études positives et négatives réalisées in vitro en fonction de la fréquence et de la puissance ($n = 626$ expériences publiées dans 53 études).

Figure A : échelle de DAS de 0 à 250 W/kg.

Figure B : échelle de DAS de 0 à 14 W/kg.

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négatif (carré bleu).

Ces résultats contradictoires semblent liés à des méthodologies approximatives portant sur la dosimétrie, les méthodes biologiques mises en œuvre et les méthodes statistiques employées. En ce qui concerne la dosimétrie, elle n'a pas été réalisée dans certaines études et/ou le DAS n'est pas mentionné (Zotti-Martelli *et al.*, 2000 et 2005 ; Li *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Hansteen *et al.*, 2009). En ce qui concerne les méthodes biologiques, le nombre d'expériences

et de donneurs est parfois limité avec un nombre de donneurs inférieur ou égal à 2 (Vijayalaxmi *et al.*, 1997 ; Zotti-Martelli *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Tice *et al.*, 2002 ; Baohong *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2008) et les variations de température mal, voire non contrôlées. Ces différentes expériences positives seront discutées dans la discussion générale.

D. Objectifs du travail

Notre travail a porté sur l'évaluation des lésions de l'ADN après une exposition à des ondes utilisées par la téléphonie mobile GSM-900 présentant une fréquence de 900 MHz et une modulation du signal de type GSM. Toutes les expériences ont été réalisées sur des cellules amniotiques humaines exposées pendant 24 heures à des ondes GSM-900. Ce type cellulaire a été choisi pour diverses raisons : (i) l'origine humaine des cellules, (ii) la possibilité de réaliser des cultures primaires à partir de cultures non entretenues (non trypsinisées) évitant l'émergence de clones cellulaires génétiquement modifiés par rapport aux clones de départ, (iii) la facilité d'obtention de ce type cellulaire par le laboratoire hospitalier de cytogénétique et (iv) l'étude de cellules embryonnaires. Ce type cellulaire a déjà été utilisé pour évaluer la cytotoxicité des ondes électromagnétiques de basse fréquence (50 Hz) et des radiations ionisantes (Lange *et al.*, 2002 et 2004 ; Richard *et al.*, 2002) mais, à notre connaissance, ce modèle biologique n'a jamais été exposé aux radiofréquences.

Dans la première partie de notre travail, nous avons évalué l'effet génotoxique des radiofréquences par des méthodes étudiant directement les aberrations génomiques en recherchant des effets clastogènes et aneuploïdogènes (caryotype) et des effets uniquement aneuploïdogènes (FISH). Les aberrations chromosomiques ont été évaluées après une exposition à un DAS moyen de 0,25 W/kg grâce au test des aberrations chromosomiques complété d'un marquage en bandes R des chromosomes qui a permis la réalisation de caryotypes. Le caryotype en bandes R est une méthode plus sensible et plus spécifique que le test des aberrations chromosomiques. Il permet en effet de détecter un plus grand nombre de réarrangements comme les délétions, les translocations, les insertions... et d'identifier les chromosomes impliqués dans ces réarrangements. A notre connaissance, c'est la première fois que cette méthode est utilisée pour évaluer les effets génotoxiques des radiofréquences.

En ce qui concerne la méthode FISH, elle a été réalisée à différents niveaux de puissance (DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg) afin d'établir une relation dose-effet pour infirmer ou confirmer les études réalisées par FISH montrant toutes un effet aneuploïdogène significatif (Maeshevich *et al.*, 2003 ; Mazor *et al.*, 2008).

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons évalué l'effet génotoxique des radiofréquences par des méthodes indirectes en étudiant l'expression et/ou l'activation de protéines impliquées dans la détection des lésions de l'ADN et la transduction du signal. En effet, la nature des lésions potentiellement provoquées par les radiofréquences de faible énergie n'est pas encore déterminée. Nous avons donc étudié l'expression et l'activation de la protéine p53 par phosphorylation et l'expression de la forme phosphorylée de H2AX à différents niveaux de puissance (DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg).

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons étudié l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire qui peuvent constituer des réponses cellulaires aux lésions de l'ADN. Nous avons étudié l'activation de la caspase 3 par clivage au cours de l'apoptose et le cycle cellulaire en cytométrie de flux à différents niveaux de puissance (DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg).

Après une partie sur les protocoles expérimentaux, nous exposerons nos résultats qui seront discutés selon les résultats des études utilisant les mêmes méthodes d'approche pour évaluer la génotoxicité. Enfin, la discussion générale portera sur une analyse de nos conditions d'exposition au regard de conditions expérimentales similaires publiées ces quinze dernières années sous forme de revue de la littérature.

**PROTOCOLES
EXPERIMENTAUX**

I. CULTURE CELLULAIRE

La culture cellulaire a été réalisée à partir de cultures d'amniocytes non utilisées par le laboratoire de cytogénétique constitutionnelle du CHU de Limoges après avoir rendu le résultat du caryotype fœtal. Il a été réalisé après avoir obtenu le consentement des patientes et pour les indications suivantes : âge maternel, marqueurs sériques maternels élevés, antécédents d'anomalies chromosomiques, anomalies génétiques parentales, anomalies échographiques. Les cultures d'amniocytes disponibles que nous avons utilisées devaient présenter un nombre suffisant de clones et un caryotype normal quel que soit le sexe fœtal. Ces cultures primaires d'amniocytes humains n'ont pas été entretenues (non trypsinisées) jusqu'au résultat du caryotype afin d'éviter un stress cellulaire et l'émergence d'anomalies génétiques clonales.

Vingt quatre heures avant l'exposition, les cultures ont été trypsinisées à l'aide de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco) et cultivées dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre (Nunc[®]) en présence de 2 mL de milieu de culture composé de 50% d'Amniomax[®] (milieu prêt à l'emploi, Gibco) et 50% de RPMI 1640 + L-glutamine (Gibco). La culture a été réalisée à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂.

II. EXPOSITION AUX ONDES GSM-900

Les cellules amniotiques ont été cultivées dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre (Nunc[®]) en présence 2 ml de milieu de culture Amniomax[®] (Gibco). Ces boîtes ont été disposées dans des boîtes de pétri de diamètre supérieur, 60 mm (Nunc[®]) formant ainsi des double-boîte de pétri. Nous avons ajouté 5 mL d'eau distillée stérile dans la grande boîte de pétri afin que l'exposition aux ondes soit homogène.

Le système d'exposition a été fourni par Philippe Lévêque du département Ondes et Systèmes à l'institut de recherche XLIM (Unité mixte de recherche à l'Université de Limoges). Il a été décrit par Laval *et al.*, 2000. Il est situé dans un incubateur et comprend deux cellules fil-plaques placées l'une au dessus de l'autre (Figure 27) : l'une est reliée au générateur d'ondes électromagnétiques par une sonde coaxiale et sert à exposer les cellules (cellules exposées ou EX) et l'autre est située au dessous et sert aux cultures contrôles (cellules sham-exposées ou SE). Chaque cellule fil-plaque peut recevoir 8 double-boîtes de pétri. Chaque cellule fil-plaque est placée dans une boîte en plexiglas dont les parois sont constituées de ferrite afin d'éviter la diffusion des ondes.

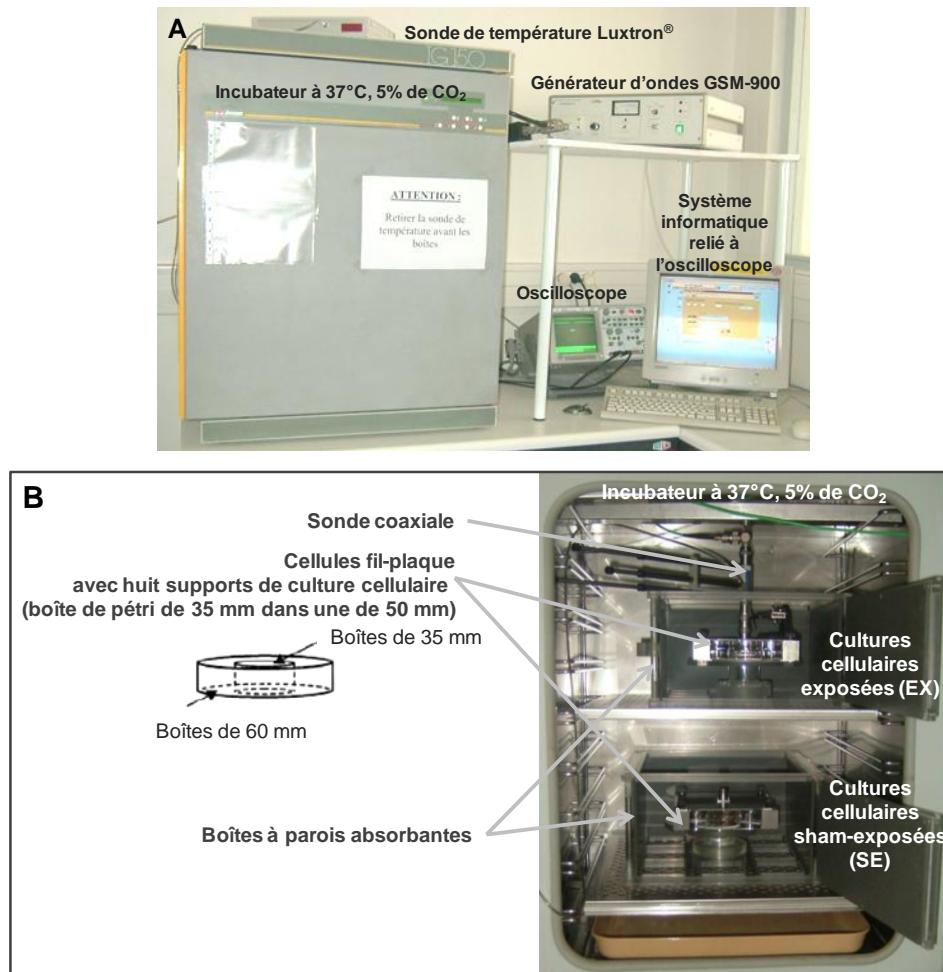


Figure 27. Ensemble du système d'exposition fourni par XLIM.
Figure A. Partie du système à l'extérieur de l'incubateur avec le générateur d'ondes, l'oscilloscope, le système relié à la sonde température et le système informatique.
Figure B. Partie du système à l'intérieur de l'incubateur avec les deux cellules fil-plaques (Laval et al., 2002), la sonde coaxiale et les deux boîtes à parois absorbantes.

Huit double-boîtes ont été disposées dans la cellule fil-plaque reliée au générateur : ce sont les cellules exposées (EX). Huit double-boîtes ont été placées dans une cellule fil-plaque non reliée à un générateur et situées dans la même étuve : ce sont les cellules sham-exposées (SE).

Pour toutes nos conditions d'exposition, les double-boîtes de pétri contenant la culture cellulaire ont été placées au moins deux heures avant l'exposition dans le système afin de stabiliser la température des milieux biologiques. Puis les cellules ont été exposées pendant 24 heures à des ondes électromagnétiques d'une fréquence de 900 MHz modulée selon le protocole GSM (pulsations de 0,577 ms avec une répétition de 217 MHz) dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de CO₂. Seuls les niveaux de puissance de l'exposition ont varié et les différents DAS testés ont été 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. La puissance émise a été réglée au niveau du générateur.

La température a été relevée au cours de l'exposition dans le milieu de culture des cellules exposées grâce à une fibre optique (Luxtron[®], BFI Optilas) reliée à un système d'acquisition informatisé. La température a été relevée 30 minutes avant le début de l'exposition et au cours des 24 heures d'exposition à raison de quatre mesures par seconde (une mesure toutes les 15 secondes).

III. EXPOSITION AUX AGENTS GENOTOXIQUES OU CYTOTOXIQUES

A. Bléomycine

La bléomycine est un agent radiomimétique générant de nombreuses cassures simple et double brin de l'ADN. Elle a été utilisée comme contrôle positif des cassures de l'ADN et des voies de signalisation des lésions de l'ADN.

Une solution mère de bléomycine à 1,5 mg/mL a été obtenue par dilution de la poudre pour solution injectable de Bléomycine Bellon[®] (Aventis) dans de l'eau distillée. Les cultures cellulaires ont été exposées à la bléomycine à une concentration finale de 20 µg/mL (soit 15 µM) pendant 2 heures.

B. Staurosporine

La staurosporine est un inhibiteur large spectre des protéines kinases, notamment la PKC qui est connue pour induire l'apoptose (Boix *et al.*, 1997).

Une solution mère de staurosporine à 1 mM a été préparée par dilution de la staurosporine (Sigma-Aldrich) dans du DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma-Aldrich). Les cultures cellulaires ont été exposées à la staurosporine en concentration finale de 0,5 µM pendant 8 heures.

IV. CARYOTYPE EN BANDES R

Le caryotype permet d'étudier les anomalies chromosomiques de structure et de nombre. Les chromosomes sont visibles au stade métaphase de la mitose, où ils s'alignent sur la plaque équatoriale. Le caryotype est réalisé à partir de cellules en prolifération bloquées au stade de métaphase de la mitose en utilisant un inhibiteur du fuseau mitotique, la colchicine (ou démécolcine).

Une partie des cultures cellulaires a été arrêtée juste à la fin de l'exposition (EX0 et SE0) et l'autre partie a été arrêtée 24 heures après la fin de l'exposition (EX24 et SE24) afin d'évaluer un effet génotoxique retardé. Pour cela, les cultures cellulaires ont donc été maintenues pendant 24 heures supplémentaires dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de CO₂ (Figure 28).

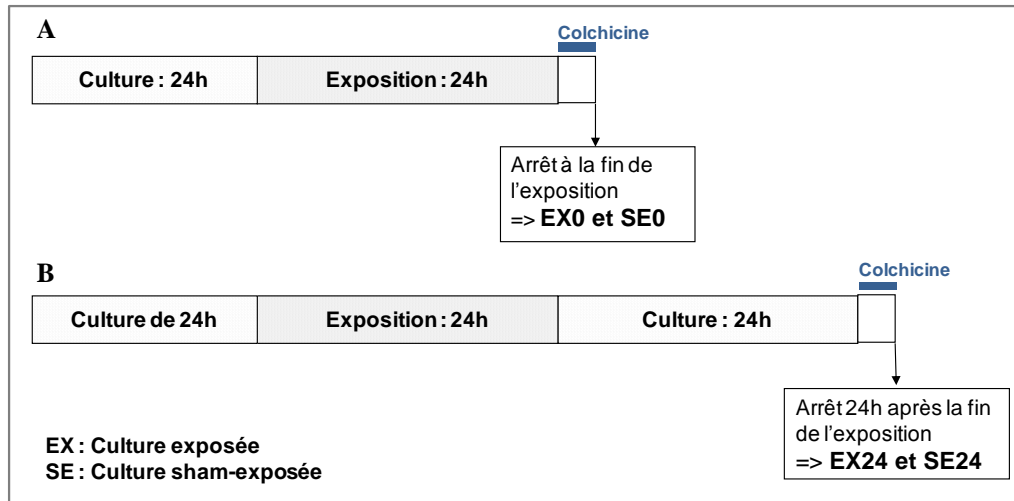


Figure 28. Protocoles d'arrêt des cultures cellulaires pour la réalisation du caryotype en bandes R.

Figure A. Cultures cellulaires exposées et sham-exposées arrêtées juste à la fin des 24 heures d'exposition (EX0 et SE0).

Figure B. Cultures cellulaires exposées et sham-exposées arrêtées après 24 heures après la fin de l'exposition et incubées pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂ (EX24 et SE24).

La prolifération cellulaire a été arrêtée au stade de métaphase de la mitose par ajout de démécolcine 10 µg/mL (Sigma-Aldrich) à la concentration finale de 0,14 µg/mL pendant 1h30. La culture cellulaire a été ensuite trypsinisée à l'aide de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco). Un choc hypotonique permettant de disperser les chromosomes est réalisé par l'ajout du sérum de veau fœtal (Lonza) dilué au 1/6. Le choc hypotonique a été réalisé pendant 30 minutes dans un incubateur à 37°C. Puis les métaphases ont été fixées à l'aide d'un mélange d'un volume d'acide acétique (Merck) et de 3 volumes de méthanol (Carlo Erba) permettant de figer les différents constituants cellulaires. La fixation a consisté à resuspendre 2 fois le culot cellulaire dans 10 mL de fixateur pendant 30 minutes à 4°C. Les métaphases ont été ensuite étalées sur une lame glacée après avoir ajusté la densité cellulaire. Le marquage en bandes R pour réaliser le caryotype est obtenu par une dénaturation chromosomique par la chaleur au bain marie à 87-88°C pendant 1 heure dans du tampon d'Earle (Sigma-Aldrich) dilué au 1/10, pH 5,8. Cette dénaturation a été suivie d'une coloration pendant 7 min avec une solution de giemsa (Prochilab) diluée à 5%.

Les métaphases ont ensuite été observées au microscope optique, soit en contraste de phase, soit en présence d'un filtre vert. Nous avons utilisé le logiciel Cytovision® (Applied Imaging,

Grande Bretagne) pour la lecture et l'analyse. Le caryotype a été réalisé en classant les chromosomes en fonction de la taille, la position du centromère et la coloration en bandes des chromosomes selon les règles internationales. Le caryotype a permis de dénombrer les aneuploïdies, les cassures chromosomiques et les réarrangements chromosomiques selon la nomenclature internationale ISCN 2009 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Nous avons réalisé 100 caryotypes par condition (EX0, SE0, EX24 et SE24) pour chaque donneur.

V. HYBRIDATION FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

La FISH est une technique d'hybridation *in situ* de sondes d'ADN fluorescentes sur leurs séquences complémentaires au niveau de l'ADN cible sous forme de noyaux interphasiques ou métaphases. La fluorescence émise par les sondes permet de visualiser la présence ou l'absence de séquences chromosomiques au microscope à épifluorescence. Nous avons utilisé des sondes centromériques ou α -satellites des chromosomes 11 et 17 (Vysis[®], Abbott), marquées avec des fluorochromes émettant respectivement une fluorescence de couleur blanche (ou aqua) ou de couleur rouge au microscope à épifluorescence.

Les cellules exposées et sham-exposées aux ondes GSM ou aux agents toxiques ont été trypsinisées, puis la suspension cellulaire obtenue a été fixée 2 fois à l'aide du fixateur (1 volume d'acide acétique et 3 volumes de méthanol). Les cellules fixées ont ensuite été étalées sur des lames. Les lames ont été déshydratées dans 3 bains successifs d'alcool éthylique de degré croissant pendant 2 minutes (bains d'alcool successifs à 70%, 90% puis 100%). Une fois les lames sèches, 5 μ L d'un mélange de sondes fluorescentes ont été déposées au niveau du dépôt cellulaire. La préparation a été recouverte d'une lamelle qui a été scellée sur la lame avec du « rubber cement ». L'ADN cible et le mélange de sondes ont été co-dénaturés sur une plaque chauffante à 73°C durant 4 minutes et trente secondes afin d'obtenir de l'ADN monocaténaire. L'hybridation de la sonde sur ses séquences complémentaires a été réalisée en chambre humide dans une étuve à 37°C durant une nuit. Après l'étape d'hybridation, les lames ont été lavées dans deux bains de solutions stringentes afin d'éliminer le bruit de fond et le marquage non spécifique : le premier lavage a été réalisé dans une solution de SSC 0,4X (Abbott) au bain marie à 73°C, le deuxième lavage a été réalisée à température ambiante (TA) dans une solution de SSC 2X (Abbott). Enfin, l'ADN a été contre-coloré à l'aide de DAPI et d'antifading (Abbott). La préparation a été recouverte d'une lamelle. Les lames ont été observées au microscope à épifluorescence (Zeiss) puis analysées et capturées grâce au logiciel Cytovision[®] (Applied Imaging, Grande Bretagne). Entre 100 et 300 noyaux

interphasiques ont été analysés par condition. Trois donneurs ont été analysés pour chaque niveau de puissance testée (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg).

VI. WESTERN BLOT

Le western blot permet d'étudier l'expression protéique et l'activation protéique par des modifications post-traductionnelles à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines natives ou modifiées.

Les cultures cellulaires exposées et sham-exposées ont été lavées par du PBS 1X. L'extraction protéique a été réalisée à l'aide du tampon de Laemmli 1X, pH 6,8 (2% de SDS, 10% de glycérol et 60 mM de tris-HCl). Les extraits cellulaires sont ensuite soumis aux vibrations ultrasoniques au sonificateur (35 pulsations à 80 Hz), puis centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C pour compléter la lyse et purifier les protéines. Le surnageant protéique a été récupéré et congelé jusqu'au dosage protéique.

Les protéines des échantillons ont été dosées selon la méthode de Lowry à l'aide du kit DC Protein Assay (Bio-Rad) à partir d'une gamme protéique réalisée avec différentes concentrations de BSA (Bovine Serum Albumine) diluée dans une solution de Laemmli modifiée, de 0 à 2000 µg/mL. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe coloré entre les protéines en solution et les réactifs. L'intensité de la coloration bleue est fonction de la concentration en protéines. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 630 nm, elle est proportionnelle à la quantité de protéines. Une droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la concentration en protéines de la gamme protéique a été tracée à l'aide du logiciel Excel (Office 2007, Windows) afin de déterminer la concentration protéique des différents échantillons. Dans une plaque de 96 puits, chaque échantillon a été dosé 4 fois en réalisant 4 dépôts de 5 µL. La quantité protéique a été déterminée en réalisant une moyenne des 4 dosages.

Les extraits protéiques ont ensuite été dénaturés pendant 10 minutes à 95°C sur une plaque chauffante après ajout de 1/10 (v/v) de dithiothréitol (DTT) à 1 M, de 1/100 (v/v) de β-mercaptoéthanol et de 0,05% de bleu de bromophénol.

Les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire par migration électrophorétique sur gel polyacrylamide 4% et 10% en condition dénaturante SDS-PAGE. La même quantité de protéines (25 µg) a été déposée au niveau des puits pour les différents échantillons. La migration a été effectuée dans un tampon de migration à pH 8,3 (25 mM de Tris, 192 mM de

Glycine et 0,1% de SDS). Un marqueur de poids moléculaire (Page Ruler Prestained Protein ladder, Fermentas) a migré en parallèle.

Après la migration, les gels polyacrylamides, les papiers Whatman et les membranes PVDF 0.45 μm (membrane polyvinylidène fluoride, Immobilon-P, Millipore) préalablement régénérées dans du méthanol ont été équilibrés pendant 30 minutes dans du tampon de transfert (50 mM de Tris, 380 mM de Glycine, 0,03% de SDS et 20% de méthanol).

Les protéines ont ensuite été transférées du gel polyacrylamide vers la membrane PVDF sous un champ électrique de 12 volts pendant 90 minutes en présence du tampon de transfert dans un appareil de transfert semi-sec (Trans-blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad).

A la fin du transfert, les membranes ont été colorées au rouge S-ponceau afin de vérifier la migration et le transfert des protéines, puis les membranes ont été rincées dans du TBS 1X, pH 7,4.

Les sites non spécifiques des membranes ont été saturés pendant 1 heure dans une solution de saturation (TBS 1X, 5% de lait écrémé et 0,01 % de Tween-20). Après rinçage dans du TBS 1X, les membranes ont été incubées en présence de différents anticorps primaires dilués au 1/1000 dans une solution de TBS 1X et Tween-20 à 0,01%. L'incubation a eu lieu dans un réfrigérateur à 4°C sous agitation durant une nuit. Les anticorps primaires utilisés sont les anticorps de lapin dirigés contre la protéine p53, les formes phosphorylées de la protéine p53 sur les sérines 15 et 37 (#9284, #9289, #9282, Cell Signaling[®]), la forme phosphorylée sur la sérine 139 de l'histone H2AX ou γ -H2AX (#2577, Cell Signaling[®]), et la caspase 3 clivée après le résidu aspartate 175 (#9664, Cell Signaling[®]). A la fin de l'incubation, les membranes ont été lavées 2 fois dans du TBS 1X.

Puis les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondant couplés à la peroxydase et dilués au 1/2000 dans du TBS 1X. L'incubation a été réalisée sous agitation à température ambiante pendant 1 h. Les membranes ont ensuite été lavées 3 fois pendant 5 min dans du TBS 1X.

Les complexes antigène-anticorps ont été révélés à l'aide d'une réaction de chimiluminescence en utilisant le système ECL+ Western Blotting Detection Reagents[®] (GE Healthcare Amersham) et visualisés et analysés avec la G-BOX et le logiciel « Gene Tools ».

Afin d'obtenir un contrôle interne du dépôt protéique pour la semi-quantification, les membranes ont été déshybridées en présence d'un tampon de déshybridation (62,5 mM de tris, 2% de SDS et 100 mM de β -mercaptoéthanol) sous agitation rotative dans un four à 50°C pendant 10 min. Puis après d'abondants lavages dans du TBS 1X et une nouvelle saturation pendant 1 heure, les membranes ont été incubées avec des anticorps primaires anti β -actine

(Sigma-Aldrich) pendant 2 h à température ambiante sous agitation, puis avec les anticorps secondaires pendant 1 h à température ambiante.

NB : tous les réactifs permettant la préparation des solutions nécessaires à l'extraction, la migration et au transfert protéiques proviennent de Sigma-Aldrich à l'exception des réactifs dont les fournisseurs sont indiqués entre parenthèses.

VII. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE DE FLUX

L'étude du cycle cellulaire par cytométrie de flux permet d'étudier la proportion (ou pourcentage) de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S, G2/M) d'un échantillon donné et d'étudier la prolifération cellulaire.

A la fin de l'exposition, les cultures exposées et sham-exposées ont été trypsinisées à l'aide de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco). Les suspensions cellulaires obtenues ont été lavées deux fois dans du PBS 1X. Le culot cellulaire a été resuspendu avec de l'éthanol 70% froid (-20°C) afin de perméabiliser et fixer les cellules. Les cellules ont été ainsi fixées et conservées pendant au moins une nuit à -20°C dans un congélateur.

Le jour du marquage de l'ADN par l'iodure de propidium (Sigma-Aldrich), les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS 1X à 4°C, puis centrifugées. Le culot cellulaire a été repris par 1 mL de PBS 1X et 60 µL de RNase (QIAGEN) et incubé pendant 2 heures à 4°C. Au bout de deux heures, 100 µL d'iodure de propidium (0,5 mg/mL) ont été ajoutés à la suspension cellulaire qui a été immédiatement analysée au cytomètre de flux sur le canal FL2 avec une excitation à 488 nm.

VIII. ETUDES STATISTIQUES

L'analyse statistique des résultats du caryotype en bandes R a été réalisée à l'aide d'une analyse des variances utilisant le logiciel SAS® 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) afin de comparer les résultats des cultures exposées aux cultures sham-exposées à 0 et 24 heures post-exposition. Une différence a été considérée significative si $p < 0,05$.

L'analyse statistique des résultats de FISH et de l'expression de la protéine p53 a été réalisée en utilisant un test de Student (Excel, Office 2007) afin de comparer les résultats des cultures exposées aux cultures sham-exposées. Le test de Student a été choisi car 3 échantillons

correspondant à 3 donneurs différents ont été analysés ($n < 30$). Le test a été unilatéral car l'hypothèse de départ H_0 est la présence d'un effet génotoxique des ondes RF. Une différence entre les cellules exposées et sham-exposées a été considérée significative si $p < 0,05$.

**RESULTATS
EXPERIMENTAUX**

I. PARTIE 1 - RELEVES THERMIQUES AU COURS DES EXPOSITIONS *IN VITRO* AUX RADIOFREQUENCES DE TYPE GSM-900

Lorsqu'une onde de type radiofréquence interagit avec un milieu biologique, l'énergie absorbée par le milieu est dissipée sous forme de chaleur. Il semble donc important de quantifier l'augmentation de température afin de déterminer la nature thermique ou non thermique des éventuels effets biologiques induits par l'interaction de l'onde avec le milieu.

Au cours de ce travail, nous avons exposé des amniocytes humains *in vitro* à des ondes de type GSM et à une fréquence de 900 MHz (GSM-900) pendant 24 heures. Pour la plupart des expériences, nous avons étudié les effets génotoxiques à différents niveaux de puissance avec des DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. Au cours de ces différentes expositions, nous avons relevé la température dans le milieu de culture d'une des huit boîtes exposées à l'aide d'une fibre optique (Luxtron®) à raison de quatre mesures par seconde pendant 24 heures (soit au total 345600 mesures). Nous avons également relevé la température 30 minutes avant l'exposition (soit 7200 mesures).

Pour chaque DAS étudié (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 W/kg), nous avons calculé la moyenne, ainsi que les écart-types, des températures relevées avant et pendant l'exposition pour 3 à 4 expériences indépendantes. Ainsi, il a été possible de déterminer l'augmentation moyenne de la température pour chaque DAS. Les résultats des relevés de températures aux différents niveaux de puissance sont récapitulés dans le tableau 8 et la figure 29 :

Tableau 8. Moyennes et écart-types des températures relevées avant l'exposition (30 minutes) et pendant l'exposition aux GSM-900 (24 heures).

Température en °C	DAS (W/kg)	DAS 0,25	DAS 0,5	DAS 1	DAS 2	DAS 4
	n	4	3	4	4	4
Avant exposition	Moyenne	36,00	36,00	36,04	36,05	36,18
	Ecart type	0,00	0,00	0,07	0,10	0,30
Pendant exposition	Moyenne	36,27	36,47	36,99	37,54	39,69
	Ecart type	0,43	0,30	0,02	0,43	0,75
Augmentation de température	Moyenne	0,27	0,47	0,96	1,49	3,51
	Ecart type	0,43	0,30	0,07	0,37	0,77

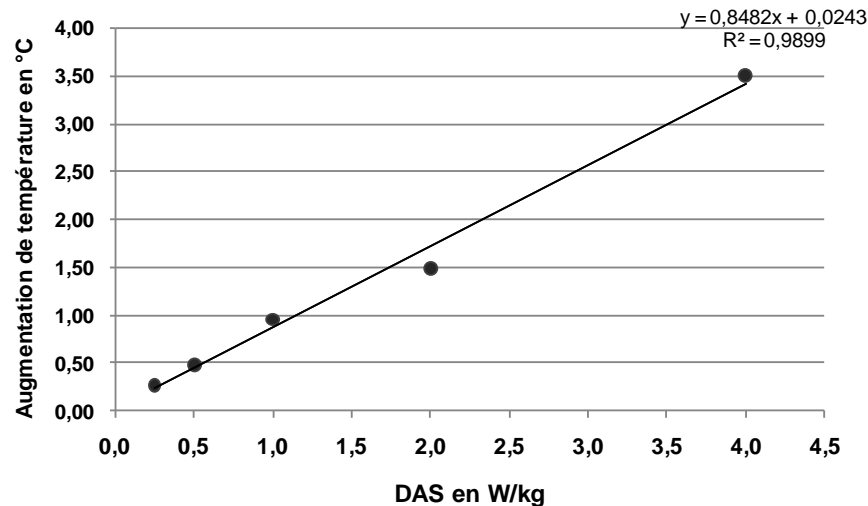


Figure 29. Augmentation de la température (en °C) en fonction du DAS moyen (en W/kg)

L'augmentation moyenne de la température au cours de l'exposition semble proportionnelle à la quantité d'énergie transférée au milieu biologique (DAS moyen) au cours de l'exposition (Figure 29). L'augmentation de température est de $0,27 \pm 0,43^\circ\text{C}$ ($n=4$) pour un DAS moyen de 0,25 W/kg, de $0,47 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ($n=3$) pour un DAS moyen de 0,5 W/kg, de $0,96 \pm 0,07^\circ\text{C}$ ($n=4$) pour un DAS moyen de 1 W/kg, de $1,49 \pm 0,37^\circ\text{C}$ ($n=4$) pour un DAS moyen de 2 W/kg et de $3,51 \pm 0,77^\circ\text{C}$ ($n=4$) pour un DAS moyen de 4 W/kg.

A un DAS moyen de 4 W/kg, l'augmentation de température en moyenne de $3,5^\circ\text{C} \pm 0,77^\circ\text{C}$ n'est plus négligeable et peut être à l'origine d'effets biologiques.

II. PARTIE 2 - ETUDE DES EFFETS CLASTOGENES ET ANEUPLOÏDOGENES

A. Etude des aberrations chromosomiques par le caryotype

1. Introduction

Les aberrations chromosomiques sont générées par des lésions et cassures de l'ADN non réparées. Elles représentent un facteur initiateur important dans le processus de cancérogenèse (Mitelman, 1995). En effet, l'altération de gènes suppresseurs de tumeurs, de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et l'activation d'oncogènes conduit à une instabilité génétique pouvant initier un processus oncogénique. La transformation maligne est un processus progressif multi-étape qui s'accompagne d'une accumulation d'anomalies génétiques aboutissant à la formation de cellules malignes. Tout agent génotoxique, ayant la capacité de provoquer des lésions de l'ADN, est potentiellement cancérogène.

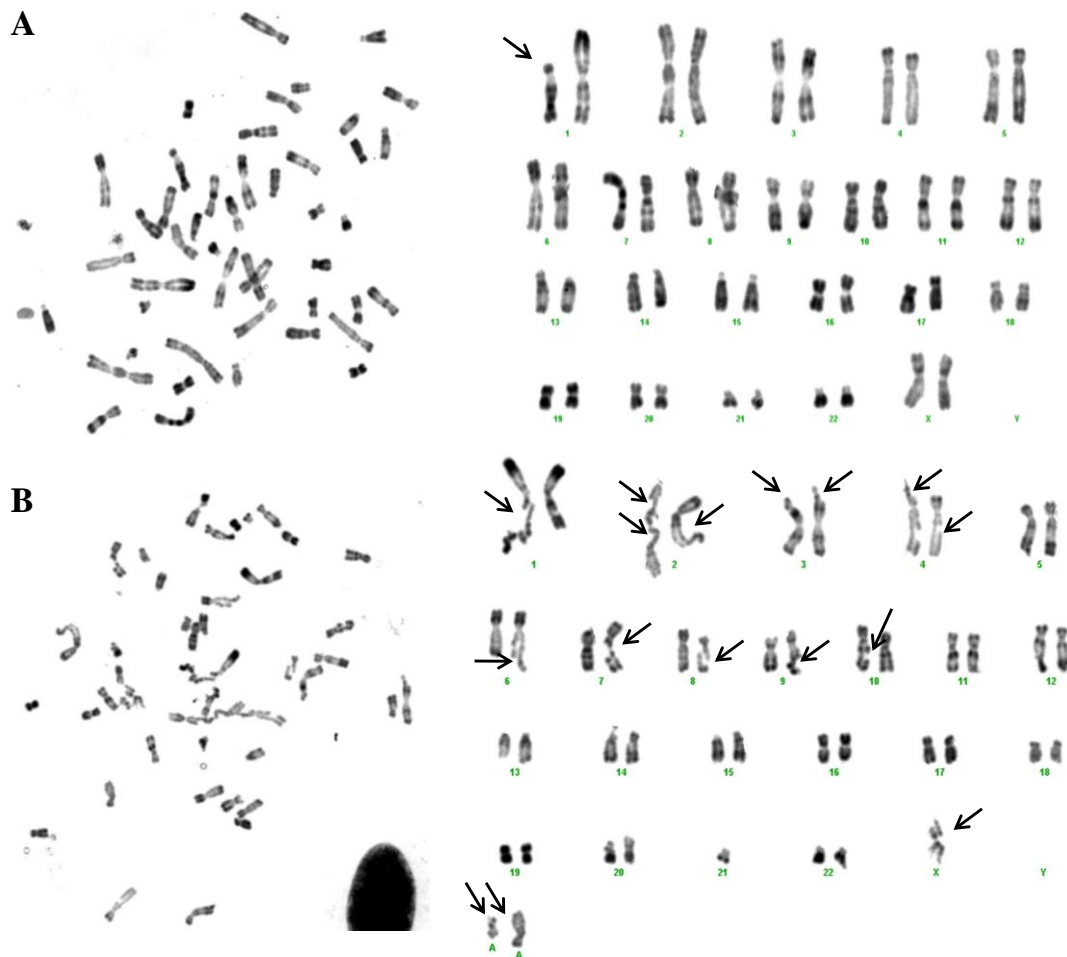
Les tests permettant d'évaluer les aberrations chromosomiques (CA et SCE) impliquent une culture cellulaire, puis un arrêt des cellules en métaphase (colchicine) où la chromatine au maximum de sa compaction est sous forme de chromosomes. Après un choc hypotonique, une fixation et une coloration à l'aide de giemsa, les métaphases sont observées au microscope afin de rechercher les aberrations chromosomiques de structure et de nombre. Les aberrations généralement comptabilisées sont les cassures chromosomiques d'une ou deux chromatides, les fragments acentriques, les chromosomes dicentriques et les chromosomes en anneau. Le test des échanges de chromatides sœurs se différencie du test des aberrations chromosomiques par l'ajout de BrdU au cours de la culture cellulaire. Son incorporation dans l'ADN nouvellement synthétisé génère des chromatides sœurs de coloration différente permettant de visualiser les échanges entre elles. Ces deux méthodes permettent de quantifier les cassures chromosomiques mais pas d'identifier les chromosomes et certains réarrangements chromosomiques comme les translocations et les délétions, largement impliquées en cancérogenèse. Par exemple, le chromosome Philadelphie a été la première anomalie chromosomique spécifique associée à une prolifération maligne, la leucémie myéloïde chronique (LMC) (Wahrman *et al.*, 1967). Cette anomalie génétique acquise initiant le processus tumoral correspond à la fusion Bcr/Abl issue d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22, identifiée en 1985 par l'équipe de Teyssier. Cette anomalie a pu être mise en évidence grâce à une méthode plus complète : le caryotype. Ce dernier est obtenu grâce à une étape supplémentaire de dénaturation soit enzymatique (bandes G), soit thermique (bandes R).

Notre travail a consisté à étudier les effets génotoxiques des radiofréquences de type GSM-900 sur des amniocytes humains cultivés *in vitro* en réalisant le caryotype en bandes R.

2. Résultats

Des cultures primaires d'amniocytes humains non entretenues ont été exposées à des ondes GSM-900 pendant 24 heures. Ces cellules ont été exposées (EX) ou sham-exposées (SE) à un DAS moyen de 0,25 W/kg (DAS crête de 2 W/kg). Quatre expositions ont été réalisées à partir de quatre donneurs différents. Immédiatement à la fin de l'exposition au bout d'un cycle cellulaire (EX0 et SE0) et 24 heures après la fin de l'exposition après deux cycles cellulaires, les cellules ont été bloquées au stade de métaphase afin de réaliser un caryotype en bandes R. Le caryotype est obtenu en classant les chromosomes par paire. Le nombre de chromosomes est spécifique de chaque espèce. Le caryotype humain comprend 46 chromosomes, soit 23 paires de chromosomes dont 22 paires d'autosomes identiques deux à deux et une paire de chromosomes sexuels ou gonosomes (XX pour la femme et XY pour l'homme). Le caryotype normal d'une femme s'écrit 46,XX et celui d'un homme 46,XY. Chaque chromosome est formé de deux chromatides sœurs identiques reliées au niveau du centromère. Chaque chromatide correspond à une molécule d'ADN.

L'exposition à la bléomycine (BLM) utilisée comme contrôle positif afin de valider la méthode utilisée (15 μ M pendant 2 heures) a montré que de multiples cassures monocaténares ou bicaténares sur toutes les cellules analysées (100%, n=15) (Figure 30-B). Il n'a pas été possible d'observer un plus grand nombre de cellules en raison d'une mort cellulaire importante.



*Figure 30. Métaphases et caryotypes en bandes R.
 Figure A. Métaphase et caryotype d'une cellule exposée aux GSM-900
 présentant une délétion des bras courts d'un chromosome 1.
 Figure B. Métaphase et caryotype d'une cellule exposée à la bléomycine
 présentant de nombreuses cassures indiquées par des flèches.*

Pour les cellules sham-exposées et exposées aux ondes GSM-900, nous avons analysé 100 métaphases par condition. Nous avons comptabilisé les métaphases avec des aberrations chromosomiques. Ces métaphases ont été classées en deux grandes catégories : les métaphases avec des anomalies de nombre et les métaphases avec des anomalies de structure. A chaque anomalie de structure a été attribué un score correspondant au nombre de points de cassure d'une chromatide nécessaire pour générer le réarrangement chromatidique ou chromosomique. Les scores sont les suivants :

- 0,5 pour un gap (chtg pour gap d'une chromatide ou chrg pour gap d'un chromosome),
- 1 pour une cassure d'une chromatide (chtb),
- 2 pour une cassure d'un chromosome (chrb) résultant de la cassure de deux chromatides ; une délétion (del) correspondant à la perte d'un fragment chromosomique et un marqueur (mar) correspondant à fragment chromosomique,

- 4 pour une duplication (dup) correspondant à un gain chromosomique ; une translocation (t) issue d'un échange chromosomique entre deux chromosomes ; un chromosome en anneau (r) ; une inversion (inv) et des réarrangements complexes.

Les scores des cassures d'une chromatide ou d'un chromosome correspondent à ceux utilisés par l'équipe de Maes *et al.* (1997 et 2001).

Les aberrations chromosomiques observées pour chaque donneur sont récapitulées dans le tableau 9.

Tableau 9. Total des aberrations chromosomiques de nombre et de structure observées pour les cultures exposées et sham-exposées à 0 et 24 heures post-exposition pour chaque donneur.

Pour chaque condition, 100 métaphases ont été analysées. Le total représente le pourcentage de cellules anormales.

		ANOMALIES de STRUCTURE					ANOMALIES de NOMBRE		TOTAL		
		Gaps	Cassures d'une chromatide (chtb) (n=46)	Cassures de 2 chromatides (chrb) (n=47)	Délétions (del)	Duplications (dup) Translocations (t) Anneaux (r) Inversions (inv) Matériel additionnel (add)	Score total des cassures	Métaphases avec anomalies de structure	Aneuploïdies	Métaphases avec anomalies de nombre	Nombre total de métaphases anormales
Scores		0,5	1	2	2	4					
Echantillon 1 (donneur 1)	EX0	1; 7	7; 6; 8; 7; 7; 4; 18		2; 4; 22	Add(5)	18	12	-Y; - 8	2	14
	SE0	5; 7	8; 7; 17; 3; 1; 1; 17; 10; 3	12; 1	18; X; 1		20	11	- 13; -12; -22; -18; +15	3	14
	EX24	2; X	2; 3	19;17		t(12;17)	11	7	- 3; -Y; -12; -18; -20	5	12
	SE24	2	10		2; 10	t(1;12); t(21;21)	13,5	6	-17; -15; -3; -20	4	10
Echantillon 2 (donneur 2)	EX0	7	2; 7; 12; 7	9; 1	15	dup(8); r(11)	18,5	10	-8; -18; -6	3	13
	SE0	2; 3; 12	8; 7		13; 18; 7; 6; 1		13,5	9	-19; -21	1	11
	EX24	1	5	mar	22		5,5	4	-21; -21; -10; -22; -20; -3; -21	7	11
	SE24	9; 16; 6; 7	9; 18; 16; 3				6	8	-3; -16; -19; -1; -21; -13; -17	7	14
Echantillon 3 (donneur 3)	EX0		17		15	t(6;7); t(9;19)	11	4	-18; -9; -22; -Y; -18; -7; -16	7	11
	SE0	10	6	12	12; 10; 10	t(5;10); t(15;21); dup(1)	21,5	9	-13; -9; -Y; +1	2	11
	EX24		11		8	add(21); t(6;7)	11	4	-14; -17; -18; -16; -12; -Y; -18; -14; -Y	9	13
	SE24		5	6	6	inv(5); t(6;7); add(10); t(6;7)	21	7	-19; -5; -14; -X; -22; -12; -22; -18	8	15
Echantillon 4 (donneur 4)	EX0	4	1; 13; 1		X; X; 16; 17	inv(1); dup(6); t(1;6)	23,5	11	-21; -16; + mar; + mar	2	13
	SE0	3			10; 19; 12	inv(2); t(7;9); r(X)	18,5	7	-13; -6; -19; +mar	3	10
	EX24		3			t(13;20)	5	2	-22	1	3
	SE24	7			19; 1	t(11;22); t(1;22); dup(2)	16,5	5	-20; -11; +21	2	7

Nous avons comparé les cultures exposées (EX) aux cultures sham-exposées (SE) à 0 h (EX0 et SE0) et à 24 heures (EX24 et SE24) post-exposition en considérant les moyennes et les médianes des cellules avec anomalies chromosomiques (n=100), des cellules avec anomalies de nombre (n=100), des cellules avec anomalies de structure (n=100) et des scores totaux de cassures chromosomiques obtenus pour 100 cellules analysées. Ces résultats sont récapitulés dans le tableau 10 et la figure 31.

Tableau 10. Résultats des moyennes (et écart-types) et des médianes (et quartiles) de l'analyse des caryotypes en bandes R.

Moyennes (et écart-types) et médianes (et quartiles) des pourcentages de métaphases présentant des aberrations chromosomiques, des anomalies de nombre, des anomalies de structure et les scores de cassures chromosomiques pour 100 métaphases pour les cultures exposées (EX) et sham-exposées (SE) pendant 24 heures à des ondes GSM-900 à un DAS de 0,25 W/kg.

		Durée post-exposition (h)			
		0 h		24 h	
		Moyennes et écart-types	Médianes et IQR	Moyennes et écart-types	Médianes et IQR
Pourcentage de métaphases anormales (n=4)	EX	12,75 ± 1,25	13 [12-13,5]	9,75 ± 4,57	11,5 [7-12,5]
	SE	11,5 ± 1,73	11 [10,5-12,5]	11,5 ± 3,69	12 [8,5-14,5]
Pourcentage de métaphases avec anomalies de nombre (n=4)	EX	3,5 ± 2,38	2,5 [2-5]	5,5 ± 3,41	6 [3-8]
	SE	2,5 ± 0,58	2,5 [2-3]	5 ± 2,58	5 [3-7]
Pourcentage de métaphases avec anomalies de structure (n=4)	EX	9,25 ± 3,59	10,5 [7-11,5]	4,25 ± 2,06	4 [3-5,5]
	SE	9 ± 1,63	9 [8-10]	6,5 ± 1,29	6,5 [5,5-7,5]
Scores de cassures chromosomiques pour 100 cellules (n=4)	EX	17,75 ± 5,14	18,25 [14,5-21]	8,125 ± 3,33	8,25 [5,25-11]
	SE	18,375 ± 3,47	19,25 [16-20,75]	14,25 ± 6,30	15 [9,75-18,75]

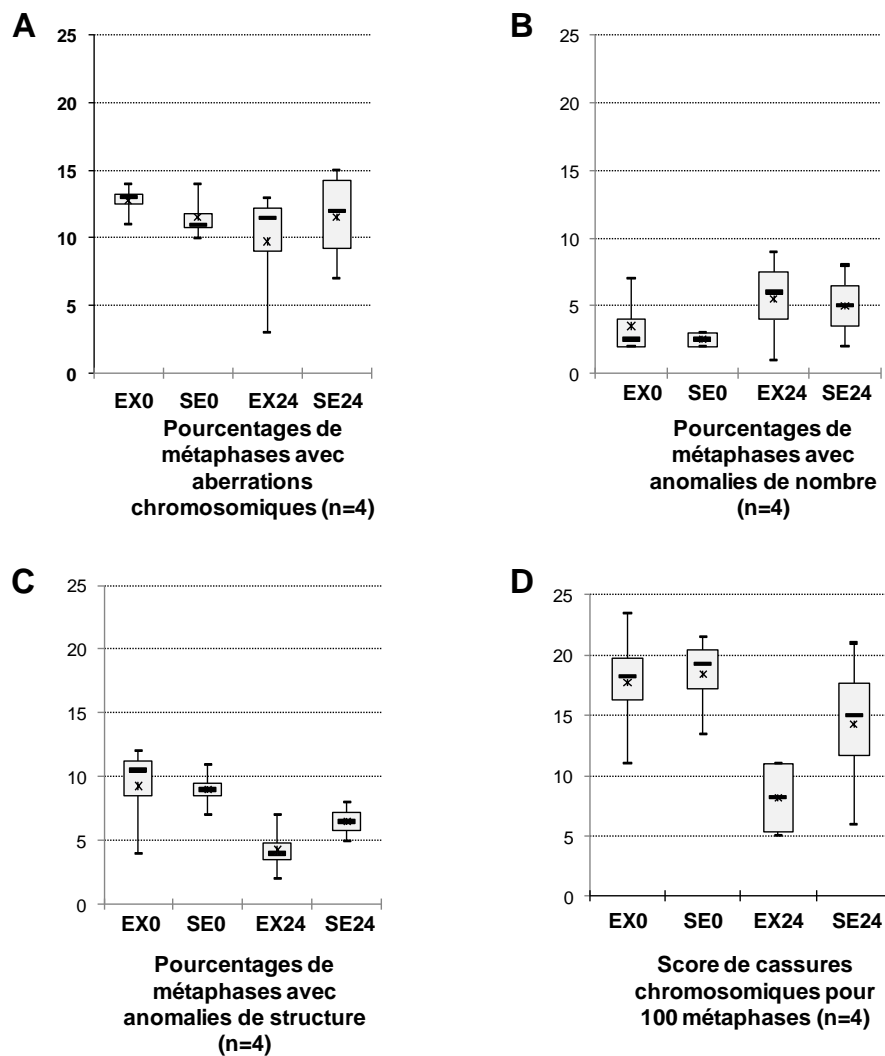


Figure 31. Résultats de l'analyse des caryotypes en bandes R. Dot-plots représentant les médianes, les quartiles inférieurs, les quartiles supérieurs, les minimums et les maximums des pourcentages de métaphases avec aberrations chromosomiques (figure A), métaphases avec anomalies de nombre (figure B), métaphases avec anomalies de structure (figure C), et les scores des cassures chromosomiques pour 100 métaphases (figure D) des cultures exposées et sham-exposées pendant 24 heures à des ondes GSM-900 à un DAS moyen de 0,25 W/kg.

Une étude statistique a été réalisée à l'aide d'une analyse des variances afin de comparer les résultats des cultures exposées aux cultures sham-exposées à 0 et 24 heures post-exposition.

La comparaison des résultats des cellules exposées par rapport à celui des sham-exposées n'indique pas d'augmentation significative ($p > 0,05$) des métaphases avec des aberrations chromosomiques, des anomalies de nombre ou de structure, ni une augmentation significative du score de cassures chromosomiques pour 100 cellules (Tableau 11).

Tableau 11. Valeurs des p de l'analyse statistique des résultats des caryotypes en bandes R.

	Valeurs de p		
	Exposition EX / SE	Post- exposition 0 h / 24 h	Interraction entre exposition EX/SE and post-exposition 0 h / 24 h
Pourcentage de métaphases anormales (n=4)	0,84	0,61	0,32
Pourcentage de métaphases avec anomalies de nombre (n=4)	0,72	0,1	0,76
Pourcentage de métaphases avec anomalies de structure (n=4)	0,38	0,007*	0,31
Scores de cassures chromosomiques pour 100 cellules (n=4)	0,13	0,018*	0,31

Cependant, nos résultats montrent une diminution significative des anomalies de structure, ainsi que du score des cassures chromosomiques à 24 heures post-exposition comparées à 0 heure post-exposition pour les cellules à la fois exposées et sham-exposées.

3. Discussion

Nous avons recherché les aberrations chromosomiques en utilisant le caryotype en bandes R qui permet d'évaluer à la fois les effets clastogènes et aneuploïdogènes. A notre connaissance, c'est la première fois que cette méthode est utilisée pour évaluer des effets génotoxiques des radiofréquences. Cette méthode semble beaucoup plus sensible pour détecter les anomalies de structure comme les délétions, les translocations et les inversions, que les tests des aberrations chromosomiques ou des échanges de chromatides sœurs. Elle permet également d'identifier les chromosomes impliqués dans les réarrangements. Cependant, cette méthode reste beaucoup trop longue dans son interprétation. C'est pour cette raison, qu'une seule puissance a été testée (0,25 W/kg).

Nos résultats montrent que les radiofréquences de type GSM-900 ne provoquent pas de cassure, ni de réarrangement chromosomiques de manière significative sur des cellules amniotiques exposées pendant 24 heures à un DAS moyen de 0,25 W/kg en réalisant un caryotype en bandes R immédiatement à la fin de l'exposition. Il n'y a également pas d'effet génotoxique retardé à 24 heures post-exposition. Par ailleurs, les ondes GSM-900 n'induisent pas de perte, ni de gain chromosomique significatif pour une exposition continue à une puissance moyenne de 0,25 W/kg pendant 24 heures. Le faible nombre d'aberrations chromosomiques observées (< 20%) correspond à des anomalies de culture liées aux facteurs

de croissance et aux mitogènes présents dans le milieu de culture. Ces taux sont classiquement retrouvés en routine au laboratoire de cytogénétique constitutionnelle (CHU de Limoges).

Ces quinze dernières années, de nombreuses études utilisant le test des aberrations chromosomiques ou des échanges de chromatides sœurs ont été réalisées afin de rechercher d'éventuels effets génotoxiques des radiofréquences utilisées par la téléphonie mobile (Maes *et al.*, 1995, 1996 et 1997 ; Antonopoulos *et al.*, 1997 ; Vijayalaxmi *et al.*, 1997 ; Vijayalaxmi *et al.*, 2001A et 2001C ; Maes *et al.*, 2001 ; Komatsubara *et al.*, 2005 ; Nikolova *et al.*, 2005 ; Zeni *et al.*, 2005 ; Stronati *et al.*, 2006 ; Vijayalaxmi, 2006 ; Kim *et al.*, 2008 ; Hansteen *et al.*, 2009). Toutes les études ont été réalisées *in vitro*, en majorité à partir de lymphocytes sanguins provenant de donneurs humains (Maes *et al.*, 1995, 1996 et 1997 ; Antonopoulos *et al.*, 1997 ; Vijayalaxmi *et al.*, 1997B ; Maes *et al.*, 2001 ; Vijayalaxmi *et al.*, 2001A et 2001C ; Zeni *et al.*, 2005 ; Stronati *et al.*, 2006 ; Vijayalaxmi, 2006 ; Hansteen *et al.*, 2009). Seulement, trois études ont utilisé des lignées cellulaires de souris (Komatsubara *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2008) ou des progéniteurs de cellules nerveuses de souris (Nikolova *et al.*, 2005). Pour ces 16 études, les cellules ont été exposées à des ondes continues, modulées ou pulsées d'une fréquence variant de 800 à 2450 MHz. Les puissances moyennes ont varié de 0,08 W/kg (Antonopoulos *et al.*, 1997) à 100 W/kg (Komatsubara *et al.*, 2005). Les expositions ont été soit courtes durant de 1,5 à 2 heures (Maes *et al.*, 1995, 1996 et 1997 ; Vijayalaxmi *et al.*, 1997 ; Maes *et al.*, 2001 ; Komatsubara *et al.*, 2005 ; Zeni *et al.*, 2005 ; Vijayalaxmi, 2006), soit longues de 24 à 56 heures correspondant à un ou deux cycles cellulaires, (Antonopoulos *et al.*, 1997 ; Vijayalaxmi *et al.*, 2001A et 2001C ; Nikolova *et al.*, 2005 ; Stronati *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2008 ; Hansteen *et al.*, 2009). Certaines études ont étudié la co-génotoxicité des radiofréquences avec des agents physiques tels que les rayons X (Maes *et al.*, 2001 ; Stronati *et al.*, 2006) ou avec des agents chimiques tels que la mitomycine C, un agent provoquant des pontages avec l'ADN (Maes *et al.*, 1996, 1997 et 2001 ; Hansteen *et al.*, 2009), le 4-nitroquinoline-1-oxide ou NQO, un agent UV mimétique et le cyclophosphamide monohydrate ou CPA (Kim *et al.*, 2008). Seules les études de Maes (1995, 1996 et 1997) montrent des effets génotoxiques significatifs en utilisant les tests des aberrations chromosomiques ou des échanges de chromatides sœurs après exposition de lymphocytes sanguins humains pendant 2 heures à des ondes GSM d'environ 850 MHz et à des puissances moyennes variant de 0,3 à 1,5 W/kg. Ces expériences ont été reproduites par la même équipe en 2001 (Maes *et al.*, 2001) qui n'a pas retrouvé d'effets génotoxiques significatifs. Une de ces études positives n'est plus référencée sur le site PubMed en raison des conditions expérimentales critiquables (Maes *et al.*, 1995).

Tableau 12. Etudes publiées ayant évalué la génotoxicité des radiofréquences par les tests des aberrations chromosomiques ou des échanges de chromatides sœurs. Les conditions expérimentales montrant une génotoxicité significative sont indiquées en rouge.

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm ²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse classique	Effets génotoxiques significatifs
Maes, Collier, Slaetz	1995	Sang	8 donneurs humains	<i>In vitro</i>	954	GSM	1,5		2				Lymphocytes	CA	OUI
Maes, Collier, Slaets	1996	Sang	8 donneurs humains	<i>In vitro</i>	954	GSM	1,5		2		Mitomycine C		Lymphocytes	SCE	OUI
Antonopoulos, Eisenbrandt et Obe	1997	Sang	15 donneurs humains	<i>In vitro</i>	380 - 900 - 1800	PW - DCS - GSM	0,08 - 0,208 - 1,7		56				Lymphocytes	SCE	NON
Maes, Collier, Van Gorp	1997	Sang	4 à 6 donneurs humains	<i>In vitro</i>	935	GSM	0,3 à 0,4		2		Mitomycine C		Lymphocytes Leucocytes	CA - SCE - Comet	OUI - NON
Vijayalaxmi, Mohan, Meltz	1997	Sang	2 donneurs humains	<i>In vitro</i>	2450	CW	12,46	5	1,5 - 3	Continue Intermittente : 30 min ON / 30 min OFF 3 cycles			Lymphocytes	CA/SCE - MN	NON
Maes, Collier, Verschaeve	2001	Sang	4 donneurs humains	<i>In vitro</i>	900	CW - GSM - PW	0,4 - 2 - 3,5 - 5,5 - 10		2	Continue - GSM - Stand by	Rayon X 1Gy Mitomycine C		Lymphocytes	CA - SCE	NON
Vijayalaxmi, Pickard, Bisht	2001A	Sang	4 donneurs humains	<i>In vitro</i>	835	FDMA	4,4 - 5		24				Lymphocytes	CA - MN	NON
Vijayalaxmi, Bisht, Pickard	2001C	Sang	5 donneurs humains	<i>In vitro</i>	847	CDMA	4,9 - 5,5		24				Lymphocytes	CA - MN	NON
Komatsubara, Hirose, Sakurai	2005	m5S	LC - Cellules de peau d'embryon de souris	<i>In vitro</i>	2450	CW - PW	5 - 10 - 20 - 50 - 100		2			24	m5S	CA	NON
Nikolova, Czyz, Rolletschek	2005	ES R1	Cl - Progéniteurs de cellules nerveuses de souris (dérivés de cellules souches)	<i>In vitro</i>	1710	GSM	1,5		6 - 48	Intermittente : 5 min ON / 30 min OFF		0 - 18	ES R1	Comet neutre comet alcaline - CA - SCE	OUI - NON
Zeni, Romano, Perrotta	2005	Sang	5 donneurs humains	<i>In vitro</i>	900	GSM	0,3 - 1		2				Leucocytes Lymphocytes	Comet - CA - SCE	NON
Stronati, Testa, Moquet	2006	Sang	14 donneurs humains	<i>In vitro</i>	935	GSM	1 - 2		24		Rayons X 1Gy		Leucocytes Lymphocytes	Comet CA - SCE - MN	NON
Vijayalaxmi	2006	Sang	2 donneurs humains	<i>In vitro</i>	2450	PW	2,13	5	2				Lymphocytes	SCE / CA - MN	NON
Kim, Hong, Lee	2007	L5178Y Tk ^{+/-}	LC - Cellules de lymphome murin (souris)	<i>In vitro</i>	835	CDMA	4		24 - 48		CPA - 4NQO - EMS		L5178Y Tk ^{+/-}	Comet - CA	OUI - NON
Hansteen, Clausen, Haugan	2009	Sang	4 à 6 donneurs humains	<i>In vitro</i>	2300	CW - PW		1	53		Mitomycine C		Lymphocytes	CA	NON

En accord avec la majorité des études publiées, nos résultats ne montrent pas d'effet clastogène, ni aneuploïdogène des radiofréquences de type GSM-900 sur des amniocytes humains exposés pendant 24 heures à une puissance moyenne de 0,25 W/kg (soit une puissance crête de 2 W/Kg). Il n'y a également pas d'effet génotoxique retardé, 24 heures après la fin de l'exposition (un cycle cellulaire supplémentaire).

Les effets clastogènes peuvent être également évalués par le test des comètes. Il semble intéressant de comparer les résultats des études réalisées avec les tests des CA et SCE avec ceux obtenus par le test de comètes.

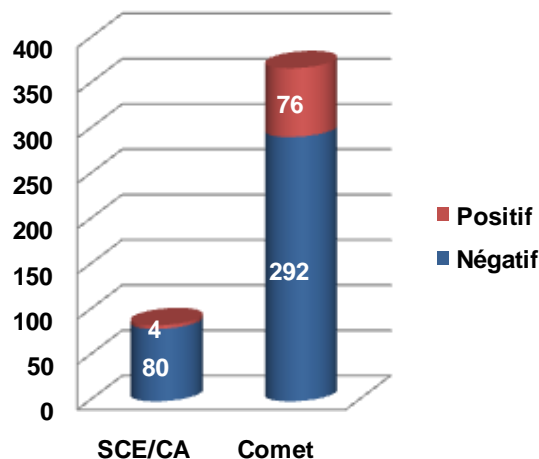


Figure 32. Expériences réalisées avec les méthodes évaluant les effets clastogènes : tests des SCE, CA et comètes ($n = 452$ pour un total de 693 expériences).

Les barres indiquent le nombre des expérimentations avec un effet génotoxique significatif ou positif (en rouge) et des expérimentations sans effet génotoxique ou négatif (en bleu) pour chacune des méthodes.

Ces quinze dernières années, le test des comètes ($n = 368$) a plus largement été utilisé que celui des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs ($n = 84$). Les tests des SCE et CA montrent une très faible proportion d'études significativement positives (5% ou 4/84) en comparaison avec le test des comètes (21% ou 76/368). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer le taux plus élevé d'expériences positives avec ce dernier : (i) absence de culture cellulaire pour le test des comètes qui permet d'examiner toutes les cellules exposées, et non celles uniquement en prolifération nécessaires pour la réalisation des SCE/CA, (ii) analyse réalisée immédiatement à la fin de l'exposition pour le test des comètes, contrairement aux tests des SCE/CA qui nécessitent généralement une culture cellulaire post-exposition pour la réalisation de la technique et (iii) détection des cassures simple brin et double brin de l'ADN par le test des comètes, alors que les tests des SCE et CA ne détectent que les cassures double brin d'une chromatide ou des deux chromatides d'un chromosome.

Les méthodes des SCE, CA et du caryotype présentent l'inconvénient majeur de nécessiter des cellules en division pour leur réalisation. Or, l'apparition de lésions de l'ADN va conduire à un arrêt du cycle cellulaire pour leur réparation, et si ces lésions sont trop importantes à un processus de mort cellulaire programmée. Il paraît donc important de compléter ces méthodes par une étude en parallèle du cycle cellulaire et de l'apoptose (cf. paragraphe III des résultats). Ces deux mécanismes pourraient expliquer la diminution significative des aberrations chromosomiques de structure que nous observons entre 0 h et 24 heures post-exposition à la fois pour les cellules exposées et les cellules sham-exposées.

B. Etude des effets aneuploïdogènes par hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

1. Introduction

L'étude des anomalies de nombre et des remaniements chromosomiques est importante pour évaluer la génotoxicité d'un agent. D'un point de vue génétique, un processus tumoral est généralement initié par la perte homozygote par mutation ou délétion d'un gène suppresseur de tumeur ou l'activation d'oncogènes. Puis, la progression tumorale s'accompagne généralement d'anomalies additionnelles qui vont jouer un rôle majeur dans la transformation maligne. Ces anomalies additionnelles consistent généralement en des gains et pertes chromosomiques générant des clones hypodiploïdes (nombre de chromosomes entre 35 et 45) ou hyperdiploïdes (nombre de chromosomes entre 47 et 57), classiquement observées dans les cellules tumorales. Dans la leucémie myéloïde chronique, la fusion BCR/ABL résultant de la translocation entre les chromosomes 9 et 22, est un facteur initiateur du processus oncogène. A cette anomalie initiale, s'ajoutent des anomalies additionnelles telles que la trisomie 8 donnant un caractère péjoratif au pronostic (Aurer *et al.*, 1991).

La perte d'un chromosome portant un gène suppresseur de tumeur, ou de gènes codant pour des protéines impliquées dans la détection des lésions et la transduction du signal, la réponse cellulaire et/ou la réparation de l'ADN peut être un facteur important dans la transformation maligne. Les pertes ou gains chromosomiques observés au niveau des cellules tumorales résultent de malségrégations chromosomiques au cours de la mitose. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'apparition de ces malségrégations : (i) absence de réparation de l'anomalie par échappement de la cellule aux points de contrôle du cycle cellulaire situés en mitose, (ii) retard d'un chromosome à l'anaphase, et (iii) perturbation du fuseau mitotique.

L'hybridation *in situ* fluorescente (ou FISH) est une méthode permettant l'étude de pertes ou gains chromosomiques en utilisant des sondes fluorescentes complémentaires de certaines régions génomiques.

Nous avons étudié les pertes ou gains des chromosomes 11 et 17 par FISH sur cellules amniotiques interphasiques exposées pendant 24 heures à des radiofréquences de type GSM à une fréquence de 900 MHz (GSM-900). Le choix de ces chromosomes tient à la présence de gènes importants dans le processus tumoral. Le gène ATM situé en 11q22 code pour une protéine impliquée dans la détection des lésions, l'amplification et la transduction du signal. Les mutations constitutionnelles du gène ATM sont retrouvées dans l'ataxie télangiectasie qui prédispose aux cancers et à une radiosensibilité. Le gène codant pour la protéine p53 est situé en 17p13. Cette protéine joue un rôle fondamental dans la réponse cellulaire suite à un stress cellulaire (cf. chapitre II de l'introduction concernant les lésions de l'ADN). La perte de la protéine p53 est retrouvée dans la moitié des tumeurs et les mutations constitutionnelles du gène p53 sont retrouvées dans le syndrome de Li-Fraumeni associé à un grand nombre de tumeurs.

2. Résultats

Des cultures primaires d'amniocytes humains non entretenues ont été exposées à des ondes GSM-900 pendant 24 heures. Ces cellules ont été exposées (EX) ou sham-exposées (SE) à différents niveaux de puissance de DAS moyen 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. Pour chaque DAS, trois expositions indépendantes à partir de trois donneurs différents ont été réalisées. Immédiatement à la fin de l'exposition, les cellules ont été fixées, puis co-hybridées à l'aide des sondes centromériques des chromosomes 11 et 17 (locus respectifs D11Z1 et D17Z1, Vysis[®]) et contre-colorées par un agent intercallant, le DAPI. Les centromères des chromosomes 11 sont hybridés par des sondes émettant un signal fluorescent rouge alors que les centromères des chromosomes 17 sont marqués par des sondes émettant un signal fluorescent aqua ou blanc. Une cellule humaine diploïde présente 46 chromosomes ou 23 paires de chromosomes homologues. Le marquage d'une cellule normale présentera donc deux signaux rouges correspondant aux chromosomes 11 et deux signaux aqua ou blanc correspondant aux chromosomes 17. La figure 33 montre le marquage obtenu sur des cellules interphasiques et des cellules en cytotélière.

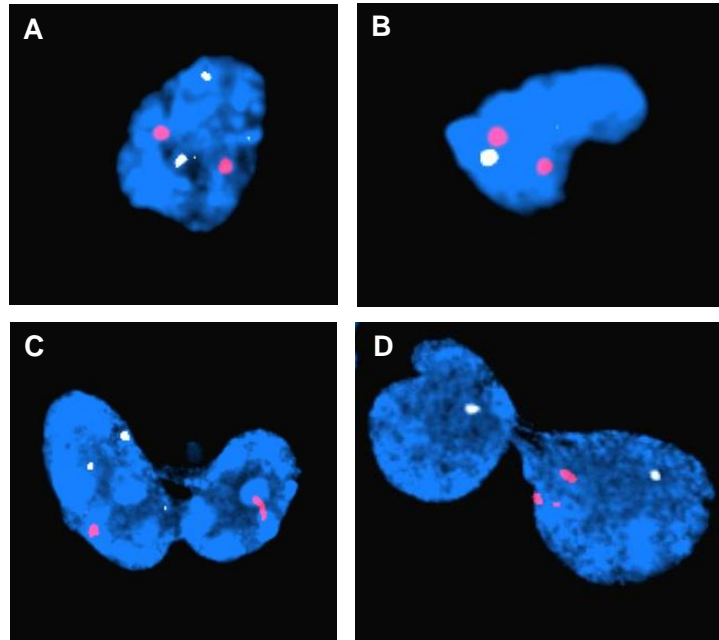


Figure 33. Hybridation in situ (FISH) de cellules interphasiques et en cytodierèse à l'aide des sondes centromériques des chromosomes 11 (rouge) et des chromosomes 17 (aqua ou blanc).

La figure A montre un marquage normal.

La figure B montre une aneuploïdie avec perte d'un des chromosomes 17.

Les figures C et D montrent des cellules en cytodierèse avec des malségrégations chromosomiques : du chromosome 17 (figure C) et du chromosome 11 (figure D).

Nous avons observé au moins 150 noyaux par culture exposée (EX) ou sham-exposée (SE). Pour chaque cellule interphasique analysée, nous avons comptabilisé le nombre de signaux rouge et aqua. Les résultats sont exprimés en proportion (%) de cellules aneuploïdes (présentant une anomalie de nombre des chromosomes 11 et/ou 17) pour les cellules exposées et sham-exposées aux différents niveaux de puissance. Les résultats sont représentés sur la figure 34.

Une étude statistique a été réalisée en utilisant un test de Student (Excel, Office 2007) afin de comparer les résultats des cultures exposées aux cultures sham-exposées. Nous n'observons pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les cellules exposées et les cellules sham-exposées aux différents DAS étudiés 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg suggérant que les radiofréquences de type GSM-900 ne sont pas susceptibles d'induire des malségrégations chromosomiques.

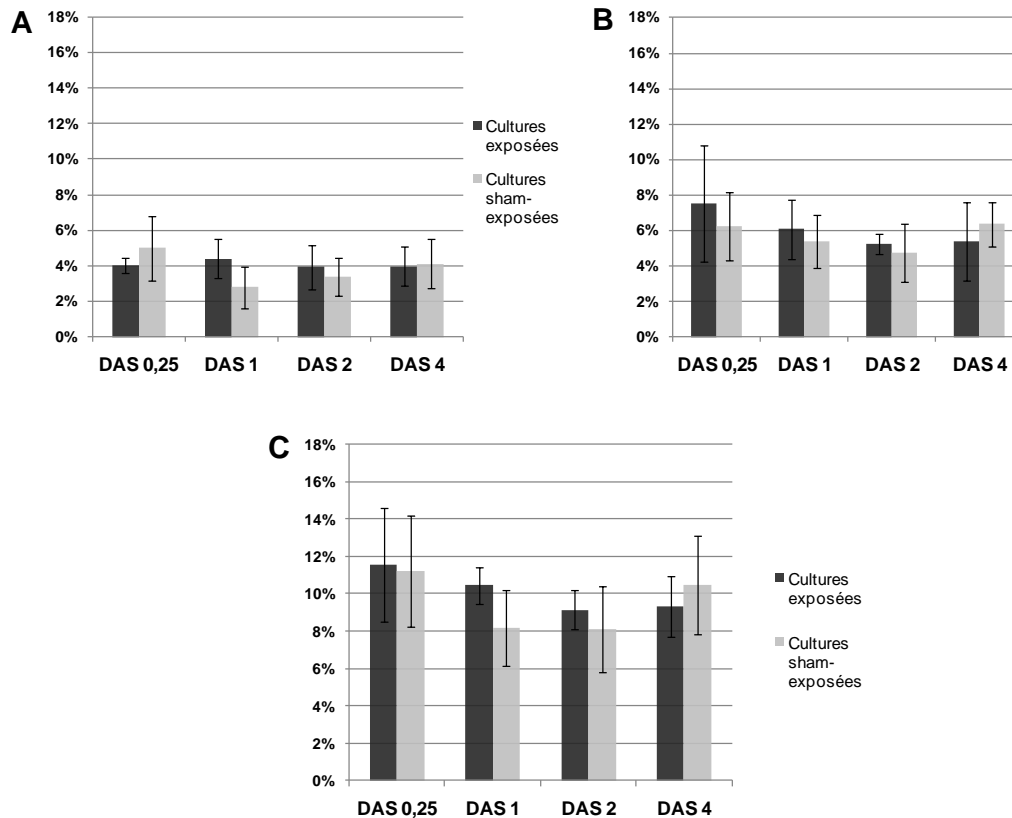


Figure 34. Résultats de l'hybridation in situ (FISH) des marquages centromériques des chromosomes 11 et 17.

La FISH a été réalisée à partir de cultures exposées et sham-exposées pendant 24 heures à des ondes GSM-900 à différents niveaux de puissance 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. Les barres montrent les moyennes et les écart- types des résultats de la FISH des cellules aneuploïdes pour le chromosome 11 (figure A), le chromosome 17 (figure B) et les chromosomes 11 et 17 (figure C).

3. Discussion

Nos résultats ne montrent pas d'effet aneuploïdogène (chromosomes 11 et 17) des radiofréquences de type GSM-900 sur des cellules amniotiques exposées pendant 24 heures à différents niveaux de puissance avec des DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. Ces résultats diffèrent de ceux publiés par Mashevich (2003) et Mazor (2008) qui ont montré que des ondes continues d'une fréquence d'environ 800 MHz (CW-800) sont capables d'induire une augmentation significative du taux d'aneuploïdies (anomalies de nombre des chromosomes) dans les lymphocytes humains pour des DAS supérieurs à 2 W/kg.

L'équipe de Mashevich (2003) a exposé pendant 72 heures des lymphocytes sanguins humains (5 donneurs) en culture avec de la phytohémagglutinine à des ondes continues de 830 MHz (CW-830). Quatre niveaux hétérogènes de puissance ont été étudiés : $2 \pm 0,3$; $2,9 \pm 0,3$; $4,3 \pm 0,2$ et $8,2 \pm 0,6$ W/kg. Ils ont évalué les effets aneuploïdogènes par FISH à l'aide de la sonde centromérique du chromosome 17. Ils ont montré une augmentation progressive des cellules aneuploïdes parallèlement à l'augmentation de la puissance d'exposition par rapport

aux cultures contrôles. Cette augmentation de l'aneuploïdie est significative pour les puissances de 2,9 ; 4,3 et 8,6 W/kg. Cependant, les expositions à des niveaux de DAS croissants s'accompagnent d'une élévation de la température. Afin de limiter la température à 38°C au cours de l'exposition, la température de l'incubateur a été diminuée afin de compenser cette élévation de température. Une gamme de température a été réalisée en parallèle pour étudier l'effet aneuploïdogène de la température. Le taux d'aneuploïdie n'est pas affecté par des températures variant de 34,5 à 38,5°C. En revanche, une température de 40°C conduit à une augmentation significative de l'aneuploïdie. Les auteurs ont donc conclu à un effet génotoxique non thermique des radiofréquences de type CW-830.

L'équipe de Mazor (2008) a reproduit l'étude de Mashevich (2003). Ils ont exposé pendant 72 heures des lymphocytes sanguins humains (14 donneurs) en culture avec de la phytohémagglutinine à des ondes continues de fréquence 800 MHz (CW-800). Deux niveaux de puissance ont été étudiés : 2,9 et 4,1 W/kg et la température pendant l'exposition a été maintenue entre 36 et 37°C. L'effet aneuploïdogène a été évalué par FISH à l'aide des sondes centromériques des chromosomes 1, 10, 11 et 17. Les auteurs ont montré un effet aneuploïdogène dépendant du DAS. Une augmentation significative du taux de l'aneuploïdie des chromosomes 1 et 10 a été observée à un DAS de 4,1 W/kg par rapport aux contrôles alors que celle des chromosomes 11 et 17 a été observée à un DAS de 2,9 W/kg. Ils ont également étudié l'effet aneuploïdogène de la température. Le taux des aneuploïdies des chromosomes 11 et 17 a été évalué sur des lymphocytes en culture pendant 72 heures à différentes températures 33,5 ; 37 ; 38,5 et 40°C. Ils n'ont pas observé de différence significative avec les cultures maintenues à 37°C.

Ces deux études montrant des effets aneuploïdogènes significatifs ont été réalisées toutes les deux sur des lymphocytes sanguins humains exposés pendant 72 heures à des ondes continues d'une fréquence d'environ 800 MHz. Les effets significatifs sont observés pour des DAS supérieurs à 2 W/kg. Notre étude ne montre pas d'effet aneuploïdogène significatif pour des puissances moyennes allant de 0,25 à 4 W/kg. Cette absence d'effet aneuploïdogène observé au DAS moyen de 0,25 W/kg confirme les résultats du caryotype en bandes R ne montrant pas d'augmentation de l'aneuploïdie à 0 et 24 heures post-exposition. A la différence des deux études précédentes, nous avons exposé pendant 24 heures des amniocytes humains à des ondes d'une fréquence de 900 MHz modulées selon le protocole GSM. Trois facteurs peuvent être à l'origine de cette discordance dans les résultats : (i) le type cellulaire exposé, (ii) le type d'onde et (iii) la durée de l'exposition. Une exposition de 72 heures implique 3 cycles cellulaires et donc 3 fois plus de risque de perte ou gain chromosomique pendant la mitose par rapport à une exposition de 24 heures (1 cycle cellulaire).

Par ailleurs, une température moyenne de 39,7°C générée par l'exposition à une puissance de 4 W/kg n'engendre pas une augmentation significative du taux d'aneuploïdie. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats des études montrant des effets non aneuploïdogènes d'une température inférieure à 40°C (Mashevich *et al.*, 2003 ; Mazor *et al.*, 2008).

La FISH est une méthode facile et rapide à mettre en œuvre mais semble très limitée pour étudier les effets aneuploïdogènes du fait que seules les aneuploïdies de quelques chromosomes définis sont évaluées. Par ailleurs, les effets aneuploïdogènes semblent varier en fonction des chromosomes (Mazor *et al.*, 2008). Du fait de sa faible utilisation, la pertinence cette méthode à évaluer les effets aneuploïdogènes est difficile à appréhender.

Les effets aneuploïdogènes peuvent être également étudiés par le test des micronoyaux. Cependant cette méthode est limitée à l'étude des pertes d'un chromosome ou d'un fragment chromosomique contrairement à la FISH qui permet d'étudier à la fois les pertes et les gains chromosomiques. Le test des micronoyaux est une méthode largement utilisée (25% ou 174/693 expériences) contrairement à la FISH. Des effets génotoxiques significatifs ont été retrouvés dans 21% des expérimentations (37/174), taux similaire à celui du test des comètes (Figure 35).

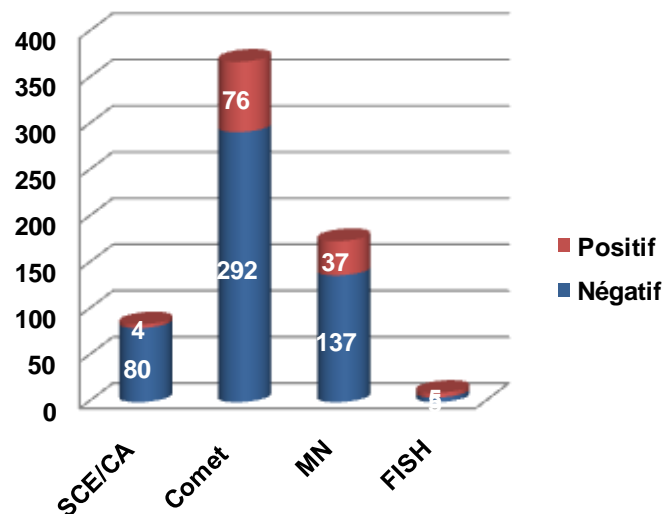


Figure 35. Expériences réalisées avec les méthodes évaluant les effets clastogènes et aneuploïdogènes : tests des SCE, CA, comètes, micronoyaux et FISH ($n = 636$ pour un total de 693 expériences).

Les barres indiquent le nombre des expérimentations avec un effet génotoxique significatif ou positif (en rouge) et des expérimentations sans effet génotoxique ou négatif (en bleu) pour chacune des méthodes.

De nombreuses études n'ont révélé aucune augmentation significative du taux de micronoyaux dans des cellules exposées aux radiofréquences (Vijayalaxmi *et al.*, 1997, 2001A and 2001C; Zhang *et al.*, 2002; Bisth *et al.*, 2002; McNamee *et al.*, 2002A and 2002B; Zeni *et al.*, 2003; Scarfi *et al.*, 2006; Stronati *et al.*, 2006; Vijayalaxmi, 2006; Speit *et al.*,

2007). Cependant, quelques études positives ont été publiées (Zotti-Martelli *et al.*, 2000 and 2005; d'Ambrosio *et al.*, 2002; Tice *et al.*, 2002; Koyama *et al.*, 2003, and 2004; Schwarz *et al.*, 2008). Toutes ces études sont résumées dans le tableau 13. La majorité des études montrant des effets génotoxiques significatifs ont été réalisées à des fréquences de 1800-2450 MHz et à des niveaux de puissance élevés de 5 à 200 W/kg, à l'exception de deux études réalisées à 837 MHz (Tice *et al.*, 2002) et à des faibles DAS allant de 0,05 à 2 W/kg (Schwarz *et al.*, 2008). La plupart de ces études positives présentent des résultats contradictoires comme ceux de Tice *et al.* (2002) et Vijayalaxmi *et al.* (2001A and 2001C) mais également ceux des études de Schwarz *et al.* (2008) et Speit *et al.* (2007). Deux études positives n'ont pas précisé la dosimétrie (Zotti-Martelli *et al.*, 2000 and 2005).

En résumé, nos résultats ont montré une absence d'effets aneuploïdogènes des radiofréquences de 900 MHz par FISH, ces résultats sont en adéquation avec la majorité des études réalisées avec le test des micronoyaux.

Tableau 13. Etudes publiées ayant évalué la génotoxicité des radiofréquences par le test des micronoyaux. Les conditions expérimentales montrant une génotoxicité significative sont indiquées en rouge.

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm ²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Effets génotoxiques significatifs
Vijayalaxmi, Mohan, Meltz	1997	Sang	2450	CW	12,46	5	3	Continue/ Intermittente			NON
Zotti-Martelli, Peccatori, Scarpato	2000	Sang	2450	CW		10 - 20 - 30	0,25 - 0,5 - 1				OUI - NON
Vijayalaxmi, Pickard, Bisht	2001A	Sang	835	FDMA	4,4 - 5		24				NON
Vijayalaxmi, Bisht, Pickard	2001C	Sang	847	CDMA	4,9 - 5,5		24				NON
d'Ambrosio, Massa, Scarfi	2002	Sang	1748	CW - GMSK	2,25		0,25				OUI - NON
Bisht, Moros, Straube	2002	C3H 10T1/2	835 - 847	FDMA	3,2 - 4,8 - 5,1		3 - 8 - 16 - 24			0 - 18	NON
McNamee, Bellier, Gajda, Miller	2002A	Sang	1900	CW	0,1 - 0,26 - 0,92 - 2,4 - 10		2				NON
McNamee, Bellier, Gajda, Lavallée	2002B	Sang	1900	PW	0,1 - 0,26 - 0,92 - 2,4 - 10		2				NON
Tice, Hook, Donner	2002	Sang	837 - 1909	RF analog - CDMA - TDMA - GSM	1 - 2,5 - 5 - 10		3 - 24				OUI - NON
Zhang, He, Jin	2002	Sang	2450	CW		5	2				NON
Koyama, Nakahara, Wake	2003	CHO-K1	2450	CW	13 - 25 - 39 - 50 - 78 - 100		18				OUI - NON
McNamee, Bellier, Gajda	2003	Sang	1900	CW - PW	0,1 - 0,26 - 0,92 - 2,4 - 10		24				NON
Zeni, Chiavoni, Sannino	2003	Sang	900	CW - GSM	0,2 - 1,6		44	Intermittente			NON
Koyama, Iozumi, Suzuki	2004	CHO-K1	2450	CW	5 - 10 - 20 - 50 - 100 - 200		2				OUI - NON
Zotti-Martelli, Peccatori, Maggini	2005	Sang	1800	CW		5 - 10 - 20	1 - 2 - 3				OUI
Scarfi, Fresegna, Villani	2006	Sang	900	GSM	1 - 5 - 10		24				NON
Stronati, Testa, Moquet	2006	Sang	935	GSM	1 - 2		24				NON
Vijayalaxmi	2006	Sang	2450	PW	2,13	5	2				NON
Speit, Schütz, Hoffman	2007	ES1 V79	1800	CW	1 - 2		1 - 4 - 18 - 22 - 24	Intermittente		0 - 18	NON
Schwarz, Kratochvil, Pilger	2008	Fibroblastes	1950	UMTS	0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 2		4 - 8 - 12 - 16 - 20 - 24 - 48	Continue/ Intermittente			OUI - NON
Zeni, Schiavoni, Perrotta	2008	Sang	1950	UMTS	2,2		24 - 44 - 68	Intermittente			NON
Sannino, Sarti, Reddy	2009A	Sang	900	GSM	1,25		20		Mitomycine C		NON
Sannino, Costanzo, Brescia	2009B	Fibroblastes dermiques	900	GSM	1		24				NON

III. PARTIE 3 - ETUDE DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES VOIES DE SIGNALISATION DES LESIONS DE L'ADN

A. Expression et activation de p53

1. Introduction

Suite à des lésions de l'ADN, de nombreuses protéines sont recrutées au niveau de l'ADN endommagé. Elles détectent les lésions puis induisent l'activation de voies de signalisation en particulier les voies des PIKKs qui aboutissent à l'activation de protéines effectrices impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et/ou l'apoptose.

La protéine p53 est une protéine qui joue un rôle majeur dans les différentes réponses cellulaires. Dans les cellules non stressées, p53 est maintenue à un niveau basal grâce à son interaction avec la protéine Mdm2. Lors d'un stress cellulaire, la protéine p53 est activée et stabilisée par des modifications post-traductionnelles consistant essentiellement en des phosphorylations et acétylations des domaines N-terminal et C-terminal. La phosphorylation de sérines (15, 20 et 37) au niveau de son domaine N-terminal de transactivation inhibe l'interaction de p53 avec Mdm2 ayant deux conséquences majeures (i) l'inhibition de l'exportation de p53 vers le cytoplasme et donc de sa dégradation par le protéasome aboutissant à une augmentation de l'expression de p53 et (ii) l'interaction de p53 avec des cofacteurs transcriptionnels, CBP et PCAF au niveau de son domaine N-terminal. Ces cofacteurs, ayant une activité intrinsèque histone acétyltransférase, induisent l'acétylation des lysines du domaine C-terminal, ce qui augmente la capacité de liaison de p53 à l'ADN et donc favorise sa fonction de facteur de transcription. L'activation de p53 conduit ainsi à la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation et/ou l'apoptose générant ainsi une réponse cellulaire.

Dans ce travail, il nous a paru intéressant d'évaluer le stress cellulaire potentiellement induit *in vitro* par des radiofréquences de type GSM-900 en étudiant le niveau d'expression de la protéine p53 et de son activation par la phosphorylation de certaines sérines du domaine N-terminal.

2. Résultats

Des cultures primaires d'amniocytes humains non entretenues ont été exposées à des ondes GSM-900 pendant 24 heures. Ces cellules ont été exposées (EX) ou sham-exposées (SE) à différents niveaux de puissance avec des DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. Pour chaque DAS, trois expositions indépendantes à partir de 3 donneurs différents ont été réalisées. Immédiatement à la fin de l'exposition, les protéines totales ont été extraites et l'expression

protéique a été étudiée par westerns blots réalisés à l'aide d'anticorps IgG polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine humaine p53 totale et ses formes phosphorylées sur les sérines 15 et 37 (#9284, #9289, #9282, Cell Signaling®). La bléomycine a été utilisée comme contrôle positif.

La figure 36 montrent les différents westerns blots obtenus aux différents DAS avec les anticorps reconnaissant la protéine p53, les formes phosphorylées phospho-p53 (ser15) et phospho-p53 (ser37) (Cell Signaling®) et la β -actine (Sigma-Aldrich). Pour chaque DAS, un western blot a été réalisé avec les extraits protéiques de 3 cultures indépendantes exposées (EX) et sham-exposées (SE) et des cultures exposées à la bléomycine servant de contrôle positif (CTRL).

Les westerns blots réalisés avec l'anticorps dirigé contre la protéine p53 montrent un niveau d'expression faible pour les cultures exposées et sham-exposées quel que soit le DAS, comparé à celui de la bléomycine (Figure 36).

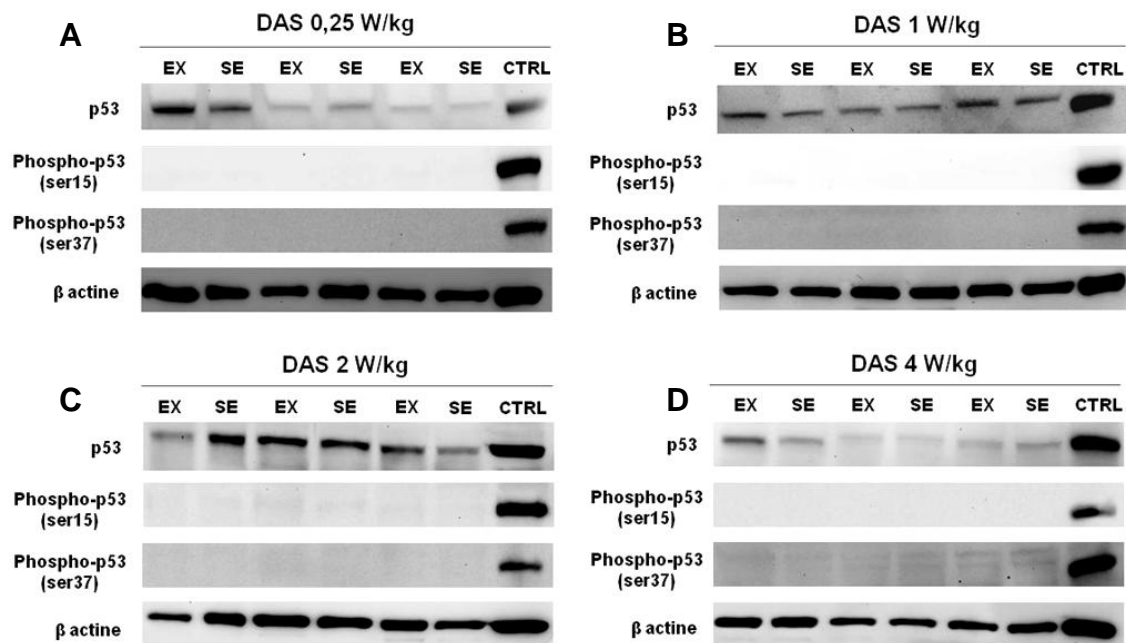


Figure 36. Westerns blots réalisés avec les anticorps anti-p53, anti-phospho-p53 (ser15), anti-phospho-p53 (ser37) et anti- β actine.

Les westerns blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques obtenus de cultures exposées (EX) et sham-exposées (SE) pendant 24 heures à des ondes GSM-900 à différents niveaux de puissance avec des DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg (figures A, B, C et D respectivement). L'exposition à la bléomycine a été utilisée comme contrôle positif (CTRL).

Une analyse semi-quantitative a été réalisée avec la G-Box et le logiciel « Gene Tools » (Syngene, UK) afin de comparer les cultures exposées aux cultures sham-exposées. Pour chaque culture, le niveau d'expression de p53 a été normalisé par celui de la β -actine. La figure 37 montre les moyennes et les écart-types obtenus pour les trois cultures exposées et sham-exposées à chaque niveau de puissance.

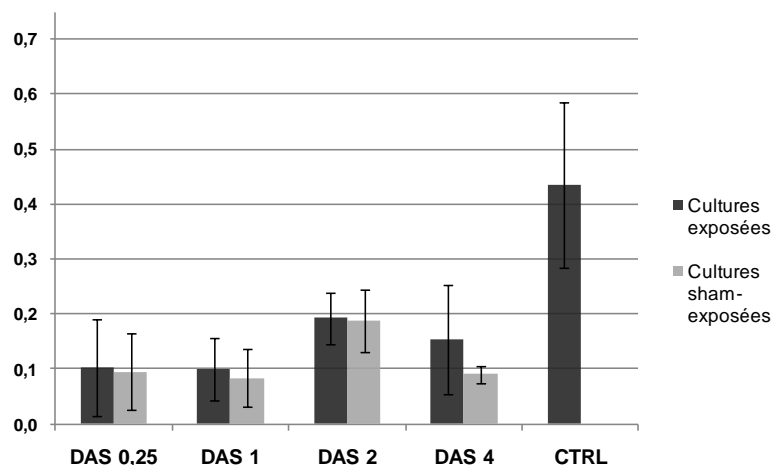


Figure 37. Résultats de l'expression de p53 normalisée par l'actine. Les barres indiquent les moyennes et les écart-types de l'expression de p53 (analyse semi-quantitative réalisée avec Gbox et logiciel Gene Tools) des cultures exposées et sham-exposées à des ondes GSM-900 pendant 24 heures à différents niveaux de puissance (DAS de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg)

Une étude statistique a été réalisée en utilisant un test de Student (Excel, Office 2007). Cette étude montre qu'il n'y a pas d'augmentation significative ($p > 0,05$) de l'expression de p53 dans les cultures exposées comparées aux cultures sham-exposées aux différents niveaux de puissance (DAS de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg).

Tableau 14. Valeurs des p de l'analyse statistique de l'expression de p53 normalisée. Valeurs de p déterminées à partir des moyennes et écart-types de l'expression de p53 normalisée par rapport à l'actine à différents niveaux de puissance (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg) durant une exposition de 24 heures aux ondes GSM-900.

		Moyennes et écart-types	
		Expression de p53 (rapport p53/actine)	valeurs de p
DAS 0,25	EX	0,1015 ± 0,0878	0,4618
	SE	0,0949 ± 0,0698	
DAS 1	EX	0,1000 ± 0,0572	0,3644
	SE	0,0833 ± 0,0524	
DAS 2	EX	0,1924 ± 0,0478	0,4538
	SE	0,1871 ± 0,0570	
DAS 4	EX	0,1539 ± 0,1005	0,1686
	SE	0,0901 ± 0,0148	

Les westerns blots réalisés avec les formes phosphorylées de la protéine p53 sur les sérines 15 et 37 montrent une absence de détection de ces différentes formes phosphorylées pour les cultures exposées et sham-exposées aux différentes puissances de DAS, contrairement aux cultures contrôles exposées à la bléomycine (CTRL).

3. Discussion

Ces résultats montrent que l'exposition de cultures d'amniocytes humains à des radiofréquences de type GSM-900 pendant 24 heures aux niveaux de puissance 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg n'induit pas d'augmentation, ni d'activation de la protéine p53. Les radiofréquences de type GSM-900 à des DAS moyens inférieurs ou égal à 4 W/kg ne sont pas capables d'induire un stress cellulaire significatif sur des cultures primaires d'amniocytes humains non entretenues (lignée fibroblastique) même en présence d'une augmentation de la température en moyenne de 3,5°C pour un DAS moyen de 4 W/kg.

D'autres équipes ont étudié les effets des RF sur l'expression et l'activation de p53. Ainsi l'équipe de Li (1999) a montré que des fibroblastes WS1neo exposés à des ondes continues de 837 MHz pendant 2 heures à des DAS allant de 0,9 à 9 W/kg n'augmentent pas de manière significative l'expression de p53. De même l'équipe de Hirose (2006) n'a pas montré d'augmentation significative de l'expression de p53 et de la forme phosphorylée sur la sérine 15 (i) de cellules A172 (lignée de glioblastome humain) exposées à des ondes CDMA-2450 pendant 24 heures à des niveaux de puissance de 80, 250 et 800 mW/kg, (ii) de cellules A172 exposées à des ondes CDMA-2450 pendant 48 heures à 80 mW/kg, (iii) de cellules A172 exposées à des ondes CW-2450 pendant 24 heures à 80 mW/kg et (iv) à des cellules IMR-90 (lignée de fibroblaste humain) exposées à des ondes CDMA-2450 et CW-2450 pendant 28 heures à 80 mW/kg. Cette équipe a également étudié l'expression génique de p53 à l'aide de la puce à expression Affymetrix (Human genome HG-U133 Plus2.0, USA) (Hirose *et al.*, 2006). Ils n'ont également pas observé de différence significative pour l'expression de p53 et des protéines associées à p53 (53BP, Mdm2...) entre les cellules A172 exposées et sham-exposées à des ondes CDMA-2450 pendant 24 heures à des DAS de 80 et 800 mW/kg.

Par ailleurs, l'expression génique a également été étudiée sur puces pangénomiques Human Atlas[®] (Nylund et Leszczynski, 2006), Affymetrix[®] (Belyaev *et al.*, 2006 ; Gurisik *et al.*, 2006 ; Zeng *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2007B), Agilent[®] (Qutob *et al.*, 2006 ; Chauhan *et al.*, 2007), Applied Biosystem[®] (Huang *et al.*, 2008) et en utilisant la méthode SAGE (Lee *et al.*, 2005). Ces études n'ont pas montré de différence significative dans l'expression de la protéine p53 pour les cultures exposées aux radiofréquences comparées aux cultures contrôles ou sham-exposées.

En résumé, nos résultats sont en adéquation avec les études portant sur les effets des radiofréquences sur l'expression et l'activation de p53.

Tableau 15. Etudes publiées entre 2005 et 2010 portant sur l'expression génique réalisée sur puces pangénomiques et méthode SAGE.

Auteurs (3 premiers auteurs)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS (W/Kg)	Durée d'exposition (heure)	Modalités d'exposition	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse expression génique	Gènes analysés	Effets génotoxiques significatifs	Résultats / Commentaires
Lee, Jonhson, Dunbar	2005	HL-60	Cellules humaines	<i>In vitro</i>	2450	PW	10	2 - 6		HL-60	SAGE	155696 cibles	OUI	2h RF : 221 gènes différemment exprimés 6h RF : 759 gènes différemment exprimés
Belyaev, Koch, Terenius	2006	Rats	Rats	<i>In vivo</i>	915	GSM	0,4	2		Cervelet de rats	Affymetrix U34 GeneChips	8800 gènes	OUI - NON	12 gènes différemment exprimés Non confirmés en RT-PCR
Guristik, Warton, Martin	2006	SK-N-SH	LC - SK-N-SH : neuroblastome	<i>In vitro</i>	900	GSM	0,2	2		SK-N-SH	Affymetrix Human Focus gene array	8400 gènes	OUI - NON	6 gènes différemment exprimés Confirmation des résultats de 4 gènes par RT-PCR
Hirose, Sakuma, Kaji	2006	A172 IMR-90	LC- A172 : lignées de glioblastome humain IMR-90 : lignée de fibroblastes humains	<i>In vitro</i>	2142	CW CDMA	0,08 0,25 0,8	24 - 28 - 48		ARN de LC A172 IMR-90	Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip	38000 sondes	NON	Etude de p53, p53BP, caspase 9 et Apaf1
Nylund et Leszczynski	2006	EA.hy926 EA.hy926v1	LC - Cellules endothéliales humaines	<i>In vitro</i>	900	GSM	2,8	1		cDNA EA.hy926 EA.hy926v1	Atlas human v1.2 cDNA array RT-PCR	1167 gènes	OUI - NON	14 gènes différemment exprimés Non confirmés en RT-PCR
Qutob, Chauhan, Bellier	2006	U87MG	Glioblastome humain	<i>In vitro</i>	1900	PW	0,1 - 1 - 10	4		U87MG	Agilent Human 1A array 22K RT-PCR	22000 sondes	NON	Pangénomique + Etude des Hsp
Zeng, Chen, Weng	2006	MCF-7	LC - Tumeur mammaire humaine	<i>In vitro</i>	1800	GSM	2 - 3,5	24	Intermittente 5 min ON / 10 min OFF	MCF-7	Affymetrix HG-U133A GeneChip array	22000 sondes	NON	NON à 2 W/kg A 3,5 W/kg : 5 gènes différemment exprimés Non confirmés en RT-PCR
Chauhan, Qutob, Lui	2007	U87MG MM6	LC - U87MG : glioblastome humain MM6 : LC monocyte humain	<i>In vitro</i>	1900	PW	0,1 - 1 - 10	24 6 - 24	Intermittente 5 min ON / 10 min OFF	U87MG MM6	Agilent Human 1Av2 array 22K	22000 sondes	NON	Pangénomique + Etude des Hsp
Hirose, Sakuma, Kaji	2007	A172 IMR-90	LC- A172 : lignées de glioblastome humain IMR-90 : lignée de fibroblastes humains	<i>In vitro</i>	2142	CW CDMA	0,08 0,8	2 - 28 - 48		ARN de LC A172 IMR-90	Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip	38000 sondes	NON	Etude de Hsp27, Hsp40, Hsp 70 et Hsp105/110
Zhao, Zhang, Xu	2007B	Neurones de rats	Cultures primaires de neurones de rats	<i>In vitro</i>	1800	GSM	2	24	Intermittente 5 min ON / 10 min OFF	Neurones de rats	Affymetrix Rat Neurobiology U34 array	1200 sondes	OUI - NON	34 gènes différemment exprimés Confirmés par RT-PCR
Huang, Lee, Oh	2008	Jurkat T	LC - Cellules de lymphome T Jhumain	<i>In vitro</i>	1763	CDMA	10	24		Jurkat T	Applied Biosystem 1700 full genome expression human microarray	30000 genes	OUI - NON	10 gènes différemment exprimés

B. Expression de γ -H2AX

1. Introduction

L'histone H2AX est une isoforme de l'histone H2A. Selon le type cellulaire considéré, elle peut représenter jusqu'à 25% de l'histone H2A. Cette histone est recrutée au niveau des cassures double brin de l'ADN où elle est phosphorylée sur la sérine 139 par les PIKKs (ATM, ATR et DNA-PKcs) générant la forme γ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1998). ATM est la principale kinase associée à la phosphorylation d'H2AX dans les cassures double brin. DNA-PKcs et ATR sont également capables de phosphoryler H2AX. DNA-PKcs peut phosphoryler H2AX après interaction avec les protéines Ku liées aux extrémités libres de la cassure double brin de l'ADN. De même, ATR une fois activée peut également phosphoryler H2AX lorsque les cassures double brin sont générées par un stress réplcatif ou par l'exposition aux rayonnements UV. La phosphorylation de H2AX est rapide et a lieu dans les minutes qui suivent les cassures double brin.

La forme phosphorylée γ -H2AX permet de recruter au niveau des lésions de l'ADN d'autres protéines telles que NBS1 (Kobayashi *et al.*, 2002), 53BP1 (Ward *et al.*, 2003), MDC1 (Stewart *et al.*, 2003) et BRCA1 (Paull *et al.*, 2000). L'interaction de MDC1 avec γ -H2AX aux sites de cassure de l'ADN induit des voies de signalisation et de réparation. MDC1 interagit avec NBS1, protéine du complexe MRN indispensable à l'activation d'ATM (Lukas *et al.*, 2004B ; Falck *et al.*, 2005). Ainsi, il se forme une boucle de rétrocontrôle positif amplifiant la phosphorylation des molécules d'H2AX (environ 2000) s'étendant le long de la chromatine sur environ 2 Mb dans la région de la cassure double brin. Cette amplification de la phosphorylation d'H2AX provoque des modifications de la chromatine sur environ 30 Mb (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002). Ces molécules γ -H2AX sont visibles en immunofluorescence sous forme d'agrégats nucléaires (Rogakou *et al.*, 1998). Il a été montré que la phosphorylation d'H2AX et la présence d'agrégats de γ -H2AX sont des marqueurs quantitatifs des cassures double brin de l'ADN (Kinner *et al.*, 2008).

De cette relation quantitative entre les cassures double brin et la forme phosphorylée γ -H2AX, il nous a paru intéressant d'étudier l'expression de γ -H2AX après exposition à des radiofréquences de type GSM-900.

2. Résultats

Des cultures primaires d'amniocytes humains non entretenues ont été exposées à des ondes GSM-900 pendant 24 heures. Ces cellules ont été exposées (EX) ou sham-exposées (SE) à différents niveaux de puissance de DAS moyen 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. Pour chaque DAS, trois

expositions indépendantes ont été réalisées à partir de 3 donneurs différents. Les extraits protéiques obtenus à la fin de l'exposition ont été analysés par western blot afin d'étudier l'expression de la forme phosphorylée γ -H2AX à l'aide de l'anticorps de lapin dirigé contre la protéine humaine phospho-histone H2AX (ser139) (#2577, Cell Signaling®). L'exposition à la bléomycine a été utilisée comme contrôle positif (CTRL).

La figure 38 représente les westerns blots réalisés aux différents niveaux de puissance (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg) à l'aide des anticorps anti phospho-H2AX (ser139) et anti β -actine (Sigma-Aldrich®). Pour chaque DAS, sont représentés les résultats des trois cultures exposées (EX) et sham-exposées (SE) et les cultures exposées à la bléomycine.

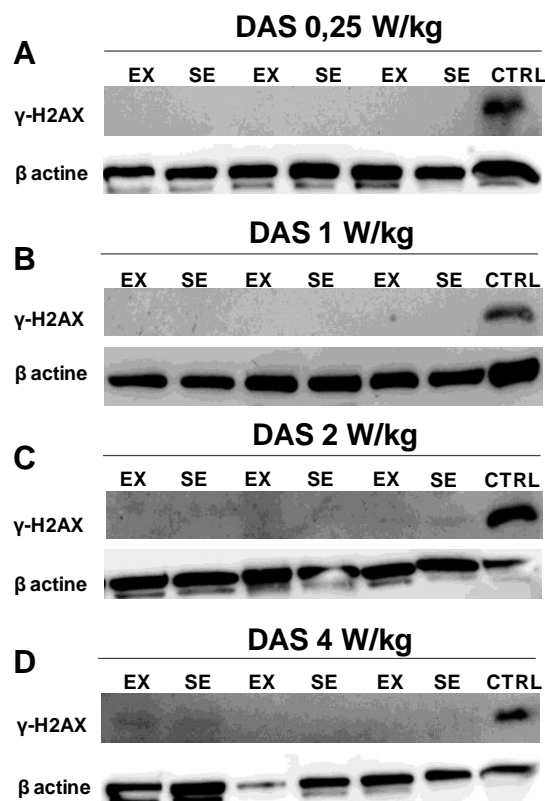


Figure 38. Westerns blots réalisés avec les anticorps anti- γ H2AX et anti- β actine à partir d'extraits protéiques obtenus de cultures exposées (EX) et sham-exposées (SE) pendant 24 heures à des ondes GSM-900 à différents niveaux de puissance avec des DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg (figures A, B, C et D). L'exposition à la bléomycine a été utilisée comme contrôle positif (CTRL).

La bléomycine est un agent radiomimétique qui induit de nombreuses cassures simple et double brin de l'ADN (cf. résultats des aberrations chromosomiques) et comme attendu, l'expression de γ -H2AX est augmentée pour les cultures exposées à cet agent génotoxique. En revanche, les cultures exposées aux radiofréquences de type GSM-900, quelle que soit la puissance, montrent un signal extrêmement faible, voire indétectable pour les cellules exposées et sham-exposées suggérant que les radiofréquences ne sont pas susceptibles d'induire des cassures double brin de l'ADN.

3. Discussion

Nos résultats montrent que les radiofréquences de type GSM-900 à des niveaux de puissance variant de 0,25 à 4 W/kg n'induisent pas une augmentation de la forme phosphorylée γ -H2AX dans des cellules amniotiques exposées pendant 24 heures.

L'histone H2AX phosphorylée sur la sérine 139 (γ -H2AX) est exprimée au niveau des cassures double brin de l'ADN. Ces résultats suggèrent donc que les radiofréquences de type GSM-900 n'induisent pas de cassure double brin de l'ADN, ce qui semble parfaitement en adéquation avec le fait que les radiofréquences de 900 MHz présentent une énergie intrinsèque trop faible pour induire directement des cassures double brin des molécules d'ADN. Par ailleurs, des cassures double brin de l'ADN ne semblent pas être générées de manière indirecte par le métabolisme cellulaire.

Trois études portant sur l'expression γ -H2AX après exposition à des radiofréquences type téléphonie mobile ont été publiées (Markova *et al.*, 2005 ; Yao *et al.*, 2008 ; Belyaev *et al.*, 2009). L'étude de Markova (2005) a porté sur l'expression de γ -H2AX par immunofluorescence sur des lymphocytes sanguins exposés pendant une heure à des ondes de type GSM de fréquence 905 MHz (GSM-905) et 915 MHz (GSM-915) à un DAS moyen faible de 0,037 W/kg. L'étude de l'expression de γ -H2AX en immunofluorescence par Yao (2008) a été réalisée sur des lignées cellulaires épithéliales humaines (hLEC) après exposition *in vitro* à des radiofréquences de type GSM-1800 pendant 24 heures de manière intermittente et à des DAS variant de 1 à 4 W/kg. Dans les travaux de Belyaev (2009), l'expression de γ -H2AX a été étudiée en immunofluorescence à 0 ; 24 et 72 heures après l'exposition de lymphocytes sanguins durant une heure à des radiofréquences de type GSM-905, GSM-915 et UMTS-1947 présentant un DAS moyen d'environ 0,04 W/kg.

Les études de Markova (2005) et Belyaev (2009) ne montrent pas d'augmentation de l'expression de γ -H2AX pour toutes les conditions d'exposition mais au contraire une diminution significative du nombre d'agrégats de γ -H2AX pour les cultures exposées pendant une heure à des signaux GSM-915 et UMTS-1947. Parallèlement à l'étude de γ -H2AX, les équipes ont également analysé l'expression de 53BP1, protéine également présente au niveau des cassures double brin de l'ADN, et la conformation de la chromatine par la mesure de la viscosité au cours du temps (AVTD), méthode décrite par l'équipe de Alipov et Belyaev (1996). L'étude de l'expression de 53BP1 et de la conformation de la chromatine a également été réalisée dans les travaux de Belyaev (2005) après 2 heures d'exposition à des radiofréquences de type GSM-905 et GSM-915 à un DAS de 0,037 W/kg. De même, ces travaux notent une diminution significative des agrégats de 53BP1 après exposition à des signaux GSM-915 (Belyaev *et al.*, 2005 ; Markova *et al.*, 2005 ; Belyaev *et al.*, 2009) et

UMTS-1947 (Belyaev *et al.*, 2009) et une augmentation de la condensation de la chromatine de manière significative pour les ondes GSM-915 juste à la fin de l'exposition (Belyaev *et al.*, 2005 ; Markova *et al.*, 2005 ; Belyaev *et al.*, 2009). Les auteurs ont suggéré que l'augmentation de la condensation de la chromatine semble diminuer l'accessibilité des protéines impliquées dans la réparation telles que γ -H2AX et 53BP1, aux cassures double brin de la chromatine, ce qui expliquerait la diminution significative des agrégats de γ -H2AX et 53BP1 observées en IF (Markova *et al.*, 2005 ; Belyaev *et al.*, 2009). Ces résultats ne sont observés que pour une fréquence d'exposition de 915 MHz, une durée d'exposition courte de 1 ou 2 heures et après une analyse réalisée immédiatement à la fin de l'exposition.

Ces résultats semblent contraster avec ceux de Yoa *et al.* (2008) qui ne montrent pas de diminution significative des agrégats de γ -H2AX après une exposition intermittente pendant 24 heures à des ondes de type GSM-1800. En revanche, les travaux révèlent une augmentation significative des agrégats de γ -H2AX après une exposition à un DAS de 4 W/kg dans des conditions athermiques avec une augmentation de température de 0,108°C (Yoa *et al.*, 2008). Cet effet semble disparaître avec la superposition d'un champ basse fréquence (2 μ T). Contrairement à Yoa *et al.* (2008), dans notre étude, l'exposition d'amniocytes humains à un DAS moyen de 4 W/kg en condition thermique ne conduit pas à une augmentation de l'expression de γ -H2AX par western blot.

IV. PARTIE 4 - ETUDE DES REPONSES CELLULAIRES

Les lésions de l'ADN activent des voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire afin de réparer l'ADN endommagé. Si ces lésions sont trop importantes ou délétères, une mort cellulaire programmée est induite afin que ces lésions ne soient pas transmises aux cellules filles. L'étude de l'apoptose, ainsi qu'une étude du cycle cellulaire ont été réalisées en complément des études de génotoxicité.

A. Etude de l'apoptose par l'activation de la caspase 3

1. Introduction

La mort cellulaire programmée ou apoptose peut être une réponse cellulaire aux lésions trop importantes de l'ADN. L'apoptose est un processus physiologique qui joue un rôle important dans le remodelage des tissus au cours du développement embryonnaire, mais également pendant la vie adulte. Il permet le maintien de l'homéostasie cellulaire et la destruction de cellules potentiellement dangereuses (cellules auto-immunes ou cellules tumorales). Une perturbation de ce processus conduit à des désordres pathologiques. Un excès de mort cellulaire contribue à l'émergence de pathologies dégénératives (maladie d'Alzheimer) ou des syndromes d'immunodéficience (Mattson, 2000) alors qu'un défaut de mort cellulaire peut contribuer au développement de pathologies cancéreuses ou auto-immunes (Green et Evan, 2002).

La mort cellulaire programmée peut être déclenchée par de nombreux stimulus, puis le signal apoptotique est transmis par des enzymes clés, les caspases (cysteine-dépendant aspartate-specific protease). Les caspases sont des protéases qui découpent leurs substrats spécifiquement après des résidus aspartate. Elles sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs qui possèdent une grande et une petite sous-unité précédées par un prodomaine en position N-terminale. Elles sont activées en protéases matures après clivage entre la petite et la grande sous-unité suivie de la libération du prodomaine. La grande et la petite sous-unité s'associent en hétérodimère pour former le site actif de l'enzyme sous forme tétramérique. On distingue deux types de caspases (i) les caspases initiatrices (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 et 14) formées d'un prodomaine long et activées par oligomérisation après interaction avec des protéines adaptatrices et (ii) les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) constituées d'un prodomaine court et activées par des protéases telles que les caspases initiatrices ou le granzyme B. Les caspases effectrices sont des protéases qui sont responsables de clivage protéolytique de nombreux substrats à l'origine des modifications morphologiques, structurales, biochimiques et moléculaires liées à l'apoptose (clivage du

cytosquelette, de la chromatine...). Deux grandes voies de signalisation caspases dépendantes peuvent conduire à la mort cellulaire programmée : (i) la voie des récepteurs dits « à domaine de mort » impliquant la caspase 8, appelée voie de signalisation extrinsèque et (ii) la voie mitochondriale conduisant au relargage de protéines mitochondriales (cytochrome c, Apaf1...) et à l'activation de la caspase 9, appelée voie de signalisation intrinsèque.

La caspase 3 est une caspase effectrice qui peut être clivée et activée soit par la caspase 8 (voie extrinsèque), soit par la caspase 9 (voie intrinsèque). L'activation de la caspase 3 par clivage est une étape clé de l'apoptose (Nicholson *et al.*, 1995). Les souris invalidées pour la caspase 3 furent les premières à présenter des profonds bouleversements dans le processus apoptotique. Elles meurent entre la première et la troisième semaine après la naissance (Kuida *et al.*, 1996 ; Woo *et al.*, 1998).

La caspase 3 pouvant être activée par les deux principales voies de l'apoptose dépendantes des caspases, il nous a paru intéressant d'étudier un éventuel effet apoptotique par le clivage de la caspase 3 par la technique du western blot après exposition d'amniocytes humains à des radiofréquences de type GSM-900.

2. Résultats

Après avoir exposé pendant 24 heures des amniocytes humains à des ondes de type GSM-900, l'apoptose a été étudiée en détectant la forme clivée de la caspase 3 par western blot en utilisant un anticorps de lapin dirigé contre la caspase 3 humaine clivée (Asp175) (#9664, Cell Signaling®). Le clivage de la caspase 3 a été étudié à plusieurs niveaux de puissance de DAS moyens (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg). Pour chaque DAS, nous avons réalisé trois expositions indépendantes à partir de 3 donneurs différents.

La figure 39 représente les westerns blots réalisés aux différents niveaux de puissance (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg) à l'aide des anticorps anti-caspase 3 clivée et anti β -actine. Pour chaque DAS, sont représentés les résultats des trois cultures exposées (EX) et sham-exposées (SE) et les cultures exposées à la staurosporine servant de contrôle positif (CTRL).

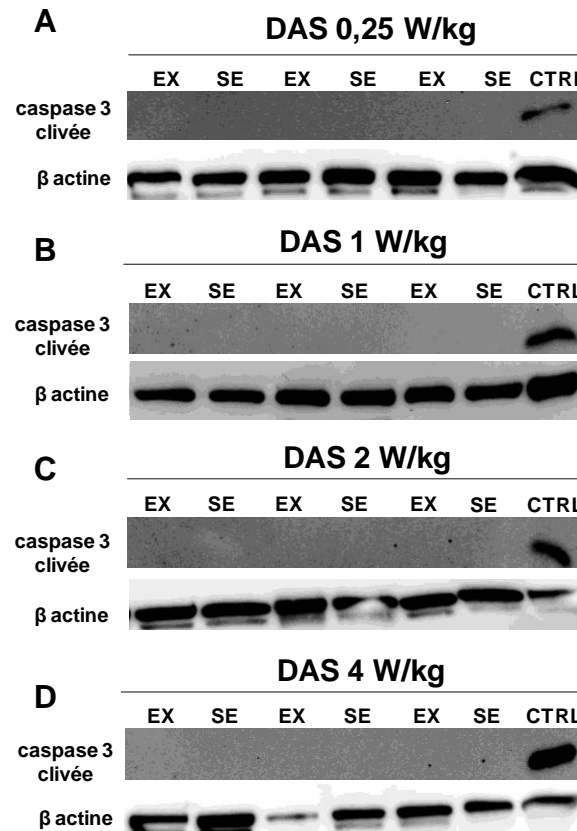


Figure 39. Western blots réalisés avec les anticorps anti-caspase 3 clivée et anti- β actine à partir d'extraits protéiques obtenus de cultures exposées (EX) et sham-exposées (SE) pendant 24 heures à des ondes GSM-900 à différents niveaux de puissance avec des DAS moyens de 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg (figures A, B, C et D). L'exposition à la staurosporine a été utilisée comme contrôle positif (CTRL).

La caspase 3 clivée n'a pas été détectée dans les cultures exposées et les cultures sham-exposées par westerns blots quel que soit le niveau de puissance testé, contrairement au contrôle positif qui montre un signal de forte intensité (Figure 39). Ces résultats suggèrent que les radiofréquences de type GSM-900 n'induisent pas le clivage de la caspase 3 et donc pas d'apoptose dans nos conditions expérimentales.

3. Discussion

Nos résultats montrent que les GSM-900 n'induisent pas l'apoptose dépendante des caspases sur des amniocytes humains exposés pendant 24 heures à différents niveaux de puissance 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg par détection de la caspase 3 clivée.

Dans la littérature, diverses méthodes ont été utilisées pour rechercher un processus apoptotique dans le cadre d'exposition aux radiofréquences : (i) détection par IF de l'annexine V qui se lie aux phosphatidylsérines exposées à la surface des cellules apoptotiques (Hirose *et al.*, 2006 ; Moquet *et al.*, 2008), (ii) marquage de l'ADN par le DAPI ou l'iodure de propidium (Joubert *et al.*, 2006, 2007 et 2008), (iii) détection de l'ADN fragmenté par la technique du TUNEL (Joubert *et al.*, 2006, 2007 et 2008), (iv) mesure de l'activité caspase 3

par fluorimétrie (Joubert *et al.*, 2006, 2007 et 2008 ; Merola *et al.*, 2006), (v) détection de l'expression et de l'activation de protéines impliquées dans le processus apoptotique par western blot et/ou immunofluorescence : PARP clivé, caspases clivées (Merola *et al.*, 2006 ; Palumbo *et al.*, 2008), Bcl-2, Fas..., (vi) étude de l'expression génique de gènes impliqués dans l'apoptose (Nikolova *et al.*, 2005 ; Hirose *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2007A et 2007B).

Nos résultats concordent avec ceux des études publiées dans le cadre d'exposition à des ondes de type GSM-900. En effet, il a été montré que les ondes de type GSM-900 n'induisent pas l'apoptose (i) de cellules issues de lignée de neuroblastome (SH-SY5Y) et de cultures primaires de neurones de rats exposées 24 heures à un DAS moyen de 0,25 W/kg (Joubert *et al.*, 2006 et 2007), (ii) de cellules issues de lignée de neuroblastome (LAN-5) pendant 24, 48 et 72 heures à un DAS moyen de 1 W/kg (Merola *et al.*, 2006), (iii) de lymphocytes humains et de cellules Jurkat T issues de lignée lymphocytaire exposés pendant 1 heure à un DAS moyen de 1,35 W/kg (Palumbo *et al.*, 2008).

Quelques études *in vitro* montrent des effets apoptotiques significatifs comme dans l'étude de Joubert *et al.* (2008) où des cultures primaires de neurones corticaux de rats ont été exposées pendant 24 heures à des ondes continues CW-900 présentant un DAS de 2 W/kg. L'apoptose pourrait être induite par une voie mitochondriale indépendante des caspases, médiée par l'AIF (Joubert *et al.*, 2008). D'après les auteurs, des effets thermiques locaux pourraient être à l'origine des effets observés. L'étude de Joubert *et al.* (2008) diffère de la nôtre pour deux paramètres : (i) la modulation du signal selon un protocole d'accès GSM dans notre étude alors que les cellules ont été exposées à des ondes continues dans l'étude de Joubert *et al.* (2008) et (ii) le type cellulaire : nous avons exposé des amniocytes humains alors que Joubert *et al.* (2008) ont exposé des cultures primaires de neurones corticaux de rats.

En résumé, nos résultats ne mettent pas en évidence une augmentation du clivage de la caspase 3 et sont en adéquation avec la plupart des travaux réalisés avec des types d'onde similaires.

B. Etude préliminaire du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les lésions de l'ADN génèrent une voie de signalisation qui induit un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN endommagé. Afin de déterminer un éventuel effet génotoxique des radiofréquences de type GSM-900 par l'arrêt du cycle cellulaire au niveau d'un des points de contrôle, nous avons étudié le cycle cellulaire en cytométrie de flux à l'aide d'un marquage de l'ADN par l'iodure de propidium. Cette méthode permet de déterminer le contenu en ADN d'une cellule, et par conséquent de déterminer la distribution des cellules

dans le cycle cellulaire : les cellules contenant 2N molécules d'ADN sont des cellules en G0 et G1 et les cellules contenant 4N molécules d'ADN sont en phase G2 ou mitose. Entre ces deux valeurs, se trouvent les cellules en phase S.

Les cellules amniotiques ont été exposées et sham-exposées aux GSM-900 pendant 24 heures à différents niveaux de puissance 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg. A la fin de l'exposition, les cellules ont été fixées dans l'éthanol à -20°C, puis marquées à l'aide de l'iodure de propidium. Nous avons réalisé 3 expériences indépendantes à partir de 3 donneurs différents, excepté pour le DAS de 2 W/kg pour lequel une seule exposition a pu être réalisée. Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie de flux (Figure 40).

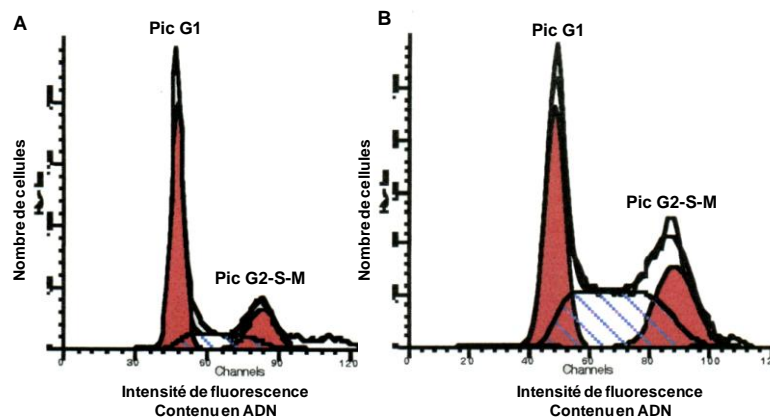


Figure 40. Histogrammes obtenus par cytométrie de flux après marquage de l'ADN par l'iodure de propidium.

Ces deux figures montrent l'aspect hétérogène des cultures cellulaires d'amniocytes.

Ainsi, il a été possible de déterminer le pourcentage des cellules en phase G0-G1, en phase S et en phase G2-M. Les résultats du cycle cellulaire sont représentés dans la figure 41 :

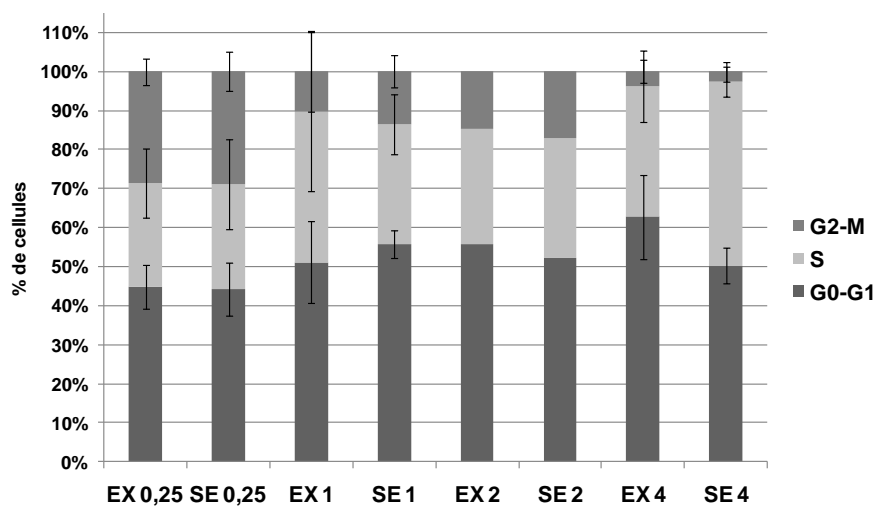


Figure 41. Résultats de l'étude du cycle cellulaire par cytométrie de flux.

Les barres expriment les moyennes et les écarts à la moyenne (SEM) des proportions de cellules situées en phase G0-G1, en phase S et en phase G2-M pour les cellules exposées et sham-exposées à des sondes GSM-900 pendant 24 heures à différents niveaux de puissance 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg.

L'analyse des graphes de cytométrie de flux et des résultats de la figure 41 montre que les cultures d'amniocytes sont très hétérogènes d'un point de vue morphologique. Cet aspect hétérogène pourrait résulter d'une différenciation *in vitro* de ces cellules sous l'effet de facteurs mitogènes présents dans le milieu de culture. Il semble qu'il n'y ait pas de différence entre les cellules exposées et les cellules sham-exposées, mais ces résultats restent à confirmer et une amélioration de la méthode devra être envisagée.

DISCUSSION GENERALE

Notre travail a porté sur l'étude des effets génotoxiques des radiofréquences de 900 MHz de type GSM sur des amniocytes humains exposés *in vitro* pendant 24 heures dans une cellule fil-plaque (Laval *et al.*, 2000). L'effet génotoxique a été évalué (i) par l'étude des effets clastogènes et aneuploïdogènes à l'aide du caryotype en bandes R sur des amniocytes exposés à un niveau de puissance moyen (DAS moyen) de 0,25 W/kg, (ii) par l'étude de l'effet aneuploïdogène à l'aide de la FISH interphasique à différents niveaux de puissance (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg), (iii) par l'étude de l'expression et de l'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation (p53 et γ -H2AX) et dans la réponse cellulaire (caspase 3 clivée) à différents niveaux de puissance (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg) au moyen du western blot.

Les résultats ne montrent aucun effet génotoxique significatif des radiofréquences de type GSM-900 sur des amniocytes humains exposés *in vitro* pendant 24 heures à différents niveaux de puissance (0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg), même en condition thermique (39,7°C en moyenne pour un DAS moyen de 4 W/kg). Une étude de l'apoptose ne montre pas d'augmentation significative de la mort cellulaire, une des réponses cellulaires aux lésions trop importantes de l'ADN.

Nos résultats et nos conditions expérimentales sont discutés dans les paragraphes suivants en fonction d'une revue de la littérature reprenant 626 expériences réalisées *in vitro*, évaluées par les méthodes de génotoxicité classiques (tests des comètes, des MN, des SCE et des CA) et publiées entre 1995 et mars 2010 (53 publications au total). Il nous a semblé intéressant de discuter cinq paramètres : le modèle biologique, la fréquence, la durée d'exposition, la puissance d'exposition (DAS) et la co-génotoxicité.

I. MODELE CELLULAIRE : AMNIOCYTES HUMAINS

Nous avons utilisé des amniocytes humains en culture primaire pour réaliser les différentes expériences. A notre connaissance, c'est la première fois que ce modèle cellulaire a été exposé *in vitro* aux radiofréquences pour évaluer la génotoxicité. Les amniocytes humains sont des cellules fœtales d'origine mésenchymateuse donnant entre autres la lignée fibroblastique. Ce modèle cellulaire a été choisi en raison de sa facilité d'obtention *via* le laboratoire de cytogénétique constitutionnelle, mais également en raison de la possibilité de réaliser des cultures primaires à partir de cultures non entretenues (non trypsinisées) évitant ainsi l'émergence d'anomalies génétiques clonales.

Dans la littérature, les lignées cellulaires sont assez souvent utilisées. Elles sont obtenues soit après immortalisation, voire transformation cellulaire, soit à partir de cellules tumorales. Elles

présentent généralement des anomalies génétiques clonales. La plupart des études sur fibroblastes ont été réalisées à partir de la lignée cellulaire de fibroblastes murins C3H10T1/2 (Malayapa *et al.*, 1997A et 1997B, Li *et al.*, 2001 ; Bisht *et al.*, 2002, Lagroye *et al.*, 2004A ; Whitehead *et al.*, 2006). Il a parfois été utilisé des cultures primaires de fibroblastes obtenues à partir de donneurs humains (Diem *et al.*, 2005 ; Speit *et al.*, 2007 ; Schwarz *et al.*, 2008 ; Sannino *et al.*, 2009B).

Tableau 16. Proportion des expériences réalisées *in vitro* à partir de fibroblastes par rapport au total des expériences

Autres modèles biologiques	Cultures primaires de fibroblastes	Lignée cellulaire fibroblastique	Total
501	56	69	626
80%	9%	11%	

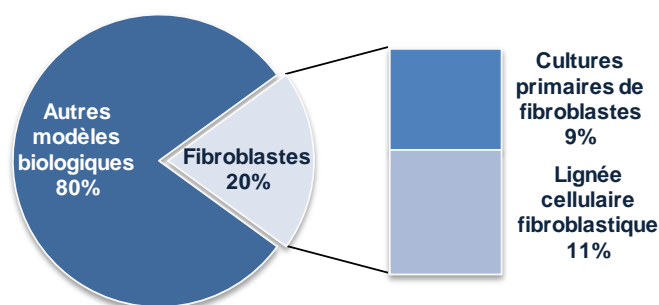


Figure 42. Part d'utilisation des fibroblastes dans les expériences de génotoxicité réalisées *in vitro* ($n = 626$).

La figure 43 représente la répartition des expériences positives et négatives réalisées à partir de fibroblastes en fonction de la fréquence et de la durée d'exposition.

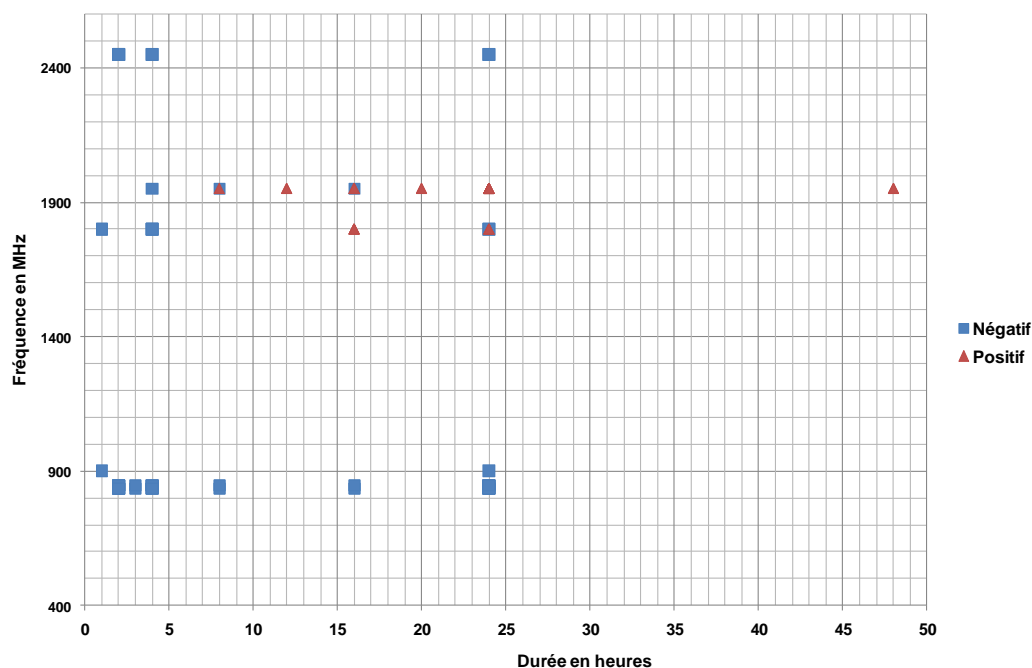


Figure 43. Répartition des études positives et négatives en fonction de la fréquence et de la durée d'exposition pour des expériences réalisées avec des fibroblastes en culture primaire et provenant de lignées cellulaires (n = 125).

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négatif (carré bleu).

La plupart des études réalisées sur des fibroblastes montrent des effets génotoxiques significatifs pour des fréquences de 1800 MHz (Figure 43).

Deux publications de la même équipe montrent des effets génotoxiques significatifs (Diem *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2008). L'équipe de Diem *et al.* (2005) a montré que des fibroblastes humains provenant de 6 donneurs exposés à des ondes de 1800 MHz de type continu ou GSM montrent une augmentation des cassures par le test des comètes à une puissance de 1,2 et 2 W/kg au cours d'une exposition de 16 et 24 heures, alors que les effets sont négatifs pour une exposition de 4 heures. Cette étude est en partie contradictoire avec l'étude de Speit *et al.* (2007) qui ne montre pas d'effet génotoxique par les tests des MN et des comètes sur des fibroblastes exposés de manière continue ou intermittente à des ondes continues de 1800 MHz (CW-1800), à une puissance de 2 W/kg et pour une durée d'exposition de 1, 4 et 24 heures. L'article de Diem *et al.* (2005) a largement été critiqué et commenté (Vijayalaxmi *et al.*, 2006 ; Rüdiger, 2009B ; Baan 2009 et 2010 ; Lerchl et Wilhelm, 2010). Il est même question de retirer l'article du journal.

L'étude de Schwarz *et al.* (2008) montre des effets génotoxiques significatifs par les tests des MN et des comètes sur des fibroblastes exposés de manière continue ou intermittente à des ondes de 1950 MHz présentant un signal UMTS, à une puissance 0,1 W/kg et pour des durées d'exposition de 12, 16, 20, 24 et 48 heures. Cependant, cette étude sur cultures primaires présente de faibles écarts types et n'a été réalisée qu'à partir d'un seul donneur. Cette étude a

été également commentée et critiquée (Lerchl, 2009 ; Rüdiger, 2009A ; Drexler et Schaller, 2009).

Aucune étude réalisée sur lignées cellulaires de fibroblastes murins C3H10T1/2 ne montre d'effet génotoxique significatif, de même que celles réalisées avec des radiofréquences de 900 MHz (Malyapa *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2001 ; Bisht *et al.*, 2002 ; Lagroye *et al.*, 2004). Les niveaux de puissance de ces études négatives s'étendent de 0,5 à 5,5 W/kg.

A noter que l'étude de Sannino *et al.* (2009B) proche de nos conditions expérimentales a été réalisée sur fibroblastes dermiques d'un donneur sain et d'un donneur (fœtus) atteint du syndrome de Turner. Les fibroblastes en culture ont été exposés de manière continue à des ondes de type GSM-900, à une puissance de 1 W/kg et pour une durée d'exposition de 24 heures. Les résultats ne montrent pas d'effet génotoxique significatif par les tests des comètes et des MN, que l'exposition aux radiofréquences soit réalisée seule ou en co-exposition avec du 3-chloro-4-(dichlorométhyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (25 µM pendant 1 heure à la fin de l'exposition).

Nos résultats sont donc concordants avec la plupart des études réalisées à partir de cellules fibroblastiques.

II. LA FREQUENCE D'EXPOSITION

A. Données générales de la littérature

Les fréquences d'exposition utilisées par les radiocommunications peuvent être regroupées en trois grandes catégories : (1) les fréquences aux alentours de 900 MHz utilisées par le système GSM, (2) les fréquences aux alentours de 1800 MHz utilisées par les systèmes GSM et UMTS et (3) les fréquences aux alentours de 2100 MHz (Tableau 17 et Figure 44).

Tableau 17. Total des expériences réalisées *in vitro* en fonction des différentes catégories de fréquence

	≈ 900 MHz	≈ 1800 MHz	> 2100 MHz	Total
Négatif	220	212	77	509
Positif	20	85	12	117
Total	240	297	89	626

La majorité des expériences ont été réalisées avec des ondes d'une fréquence aux alentours de 1800 MHz (297/626, soit 48%). Les expérimentations utilisant des ondes autour de 2100 MHz représentent la plus faible proportion (89/626, soit 14%). Les expériences réalisées avec des ondes aux alentours de 900 MHz représentent environ 38% des expériences (240/626).

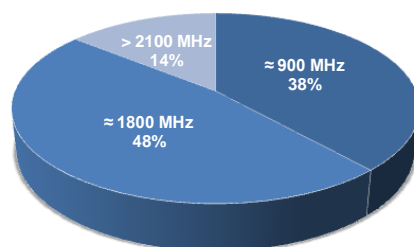


Figure 44. Parts des différentes fréquences testées pour évaluer la génotoxicité des radiofréquences ($n = 626$).

La figure 45 montre la proportion des expériences positives et négatives selon les trois catégories de fréquence. Il semble que les études positives sont majoritairement associées aux fréquences de 1800 MHz. La répartition des études *in vitro* positives et négatives en fonction de la fréquence et du DAS a été présentée en introduction (chapitre III).

La proportion des expériences montrant une génotoxicité significative représente un tiers (30%) des expériences réalisées avec des ondes d'une fréquence située autour de 1800 MHz (d'Ambrosio *et al.*, 2002 ; Tice *et al.*, 2002 ; Baohong *et al.*, 2005 ; Diem *et al.*, 2005 ; Nikolova *et al.*, 2005 ; Zotti-Martelli *et al.*, 2005 ; Lixia *et al.*, 2006 ; Baohong *et al.*, 2007 ; Schwarz *et al.*, 2008 ; Yao *et al.*, 2008 ; Franzellitti *et al.*, 2010 ; Zhijian *et al.*, 2010). Le taux d'expériences positives est faible (8%) pour les ondes d'une fréquence d'environ 900 MHz (Maes *et al.*, 1995, 1996 et 1997 ; Phillips *et al.*, 1998 ; Tice *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2008 ; Tiwari *et al.*, 2008 ; Luukkonen *et al.*, 2009). Les expériences réalisées avec des ondes d'une fréquence d'environ 2100 MHz sont positives dans 13% des cas (Zotti-Martelli *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Koyama *et al.*, 2003 ; Koyama *et al.*, 2004).

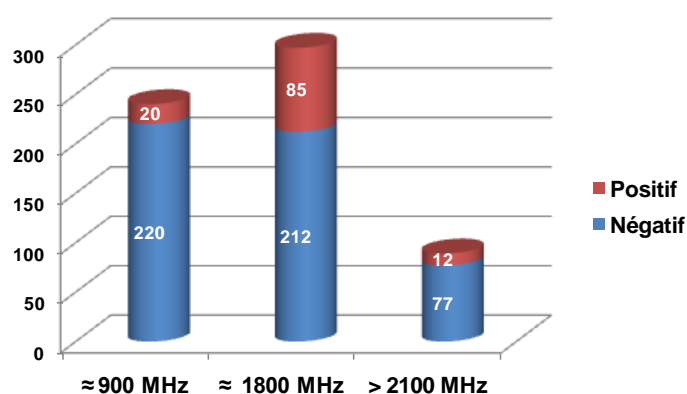


Figure 45. Total des expériences selon les différentes catégories de fréquences d'exposition ($n = 626$).

Les barres indiquent le nombre d'expériences avec un effet génotoxique significatif ou positif (en rouge) et celui sans effet génotoxique ou négatif (en bleu) pour chacune des catégories de fréquences.

Les travaux réalisés par Diem *et al.* (2005) et Schwarz *et al.* (2008), de la même équipe, montrent des effets génotoxiques positifs pour des fréquences aux alentours de 1800 MHz.

Comme déjà signalé au paragraphe 1 de la discussion, ces études ont largement été critiquées dans la littérature. Si ces expérimentations criticables sont retirées de l'analyse, le taux d'expériences positives réalisées à 1800 MHz n'est plus que de 19% (versus 30%), mais ce taux reste toujours plus élevé que celui des fréquences d'environ 900 MHz (Figure 46).

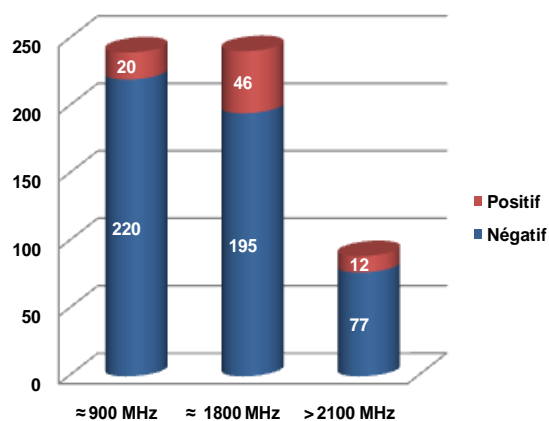


Figure 46. Total des expériences selon les différentes catégories de fréquences d'exposition sans les travaux de Diem *et al.* (2005) et Schwarz *et al.* (2008) ($n = 570$). Les barres indiquent le nombre d'expériences avec un effet génotoxique significatif ou positif (en rouge) et celui sans effet génotoxique ou négatif (en bleu) pour chacune des catégories de fréquences.

B. Fréquence autour de 900 MHz

Toutes nos expositions ont été réalisées avec des ondes d'une fréquence de 900 MHz présentant un signal pulsé et modulé selon le protocole GSM.

Les expériences réalisées aux alentours de 900 MHz (813 à 954 MHz) représentent environ 38% (240/626) des études de génotoxicité réalisées *in vitro* et évaluées à l'aide des méthodes classiques. Un quart des expériences (64/240, soit 26%) ont été réalisées avec des ondes modulées selon le protocole GSM (Maes *et al.*, 1995, 1996, 1997 et 2001 ; Zeni *et al.*, 2003 et 2005, Scarfi *et al.*, 2006 ; Stronati *et al.*, 2006 ; Luukkonen *et al.*, 2009 ; Sannino *et al.* 2009A et 2009B). Seulement 5% (12/240) des études ont été réalisées avec des ondes continues (Maes *et al.*, 2001 ; Zeni *et al.*, 2003 ; Luukkonen *et al.*, 2009). Toutes les autres études ont utilisé des ondes pulsées (PW) ou modulées selon des protocoles d'accès différents du système GSM (Antonopoulos *et al.*, 1997 ; Malayapa *et al.*, 1997B ; Phillips *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2001 ; Maes *et al.*, 2001 ; Vijayalaxmi *et al.*, 2001A et 2001C ; Bisht *et al.*, 2002 ; Tice *et al.*, 2002 ; Hook *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2008 ; Tiwari *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les études ayant utilisé des ondes d'environ 900 MHz (de 872 à 954 MHz) et de type GSM (GSM-900), elles ont été essentiellement réalisées à partir de cultures primaires de cellules sanguines et de fibroblastes dermiques prélevés chez des donneurs

Nos résultats négatifs sont en parfaite concordance avec les études réalisées à l'aide des ondes de type GSM-900 (Figure 47).

En ce qui concerne les études de génotoxicité menées avec des ondes d'environ 900 MHz (de 813 à 900 MHz), continues, pulsées ou modulées selon des protocoles différents du système GSM, elles représentent environ 73% (176/240) des études. Elles ont été réalisées soit sur des lignées cellulaires : lignée de fibroblastes murins C3H 10T1/2 (Malyapa *et al.*, 1997B ; Bisht *et al.*, 2002), lignée de glioblastome humain U87MG (Malyapa *et al.*, 1997B), lignée lymphoblastoïde humaine MOLT-4 (Phillips *et al.*, 1998 ; Hook *et al.*, 2004), lignée de lymphome murin L5178Y Tk+/- (Kim *et al.*, 2008) et lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y (Luukkonen *et al.*, 2009), soit sur leucocytes sanguins provenant de donneurs humains (Antonopoulos *et al.*, 1997 ; Maes *et al.*, 2001 ; Vijayalaxmi *et al.*, 2001A et 2001B ; Tice *et al.*, 2002 ; Zeni *et al.*, 2003 ; Tiwari *et al.*, 2008). Les expositions ont été réalisées à des niveaux de puissance (DAS) variant de 0,0024 W/kg (Phillips *et al.*, 1998 ; Hook *et al.*, 2004) à 10 W/kg (Maes *et al.*, 2001 ; Tice *et al.*, 2002). Les durées d'exposition ont varié de 1 heure (Luukkonen *et al.*, 2009 ; Tiwari *et al.*, 2008) à 56 heures (Antonopoulos *et al.*, 1997). La dosimétrie n'a pas été réalisée dans l'étude de Li *et al.*, (2001). L'effet co-génotoxique a été étudié en cumulant l'exposition aux radiofréquences avec des agents génotoxiques (Malyapa *et al.*, 1997 ; Maes *et al.*, 2001 ; Tiwari *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2008 ; Luukkonen *et al.*, 2009). Un effet génotoxique retardé a été étudié à 4 heures post-exposition (Malyapa *et al.*, 1997 ; Hook *et al.*, 2004) et à 18 heures post-exposition (Bisht *et al.*, 2002).

L'étude de la génotoxicité évaluée par les méthodes classiques (tests des comètes, des micronoyaux, des échanges de chromatides sœurs et des aberrations chromosomiques) a montré des résultats génotoxiques significatifs pour environ 8% (15/176 expériences) des conditions expérimentales publiées dans 5 articles (Phillips *et al.*, 1998 ; Tice *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2008 ; Tiwari *et al.*, 2008 ; Luukkonen *et al.*, 2009). Les conditions d'exposition de ces publications sont très hétérogènes. Aucun effet génotoxique retardé n'a été observé.

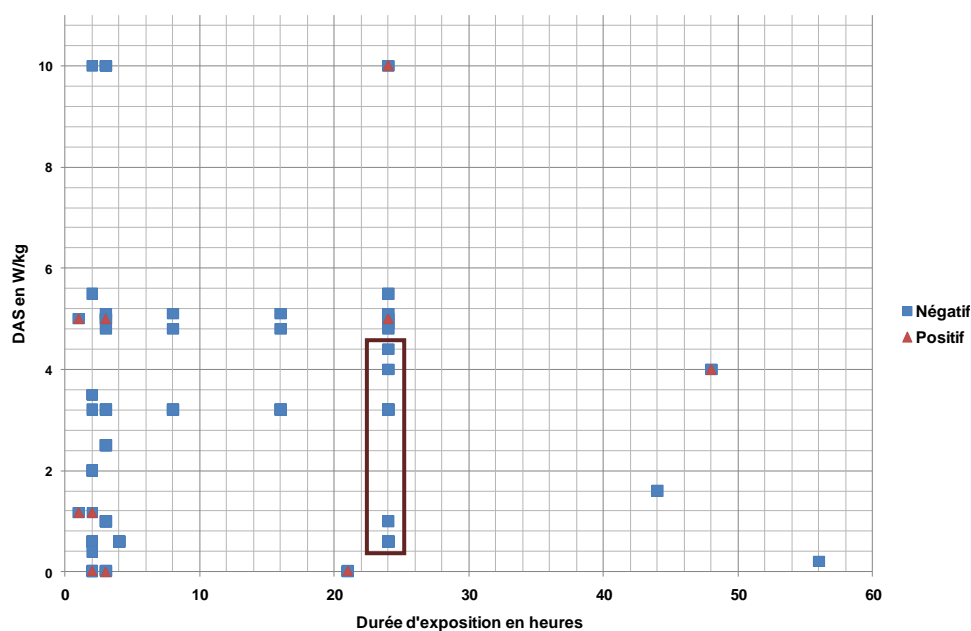


Figure 48. Répartition des études positives et négatives en fonction du DAS et de la durée d'exposition pour des ondes de fréquence 900 MHz continues ou modulées selon un protocole différent du GSM (n = 176).

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négatif (carré bleu).

Nos conditions expérimentales correspondent au rectangle rouge.

L'équipe de Phillips *et al.* (1998) a trouvé des effets génotoxiques significatifs par le test des comètes après exposition de lignées lymphoblastoïdes humaines (lignée MOLT-4) à des radiofréquences de 813 MHz de type iDEN[®] pour des expositions de (i) DAS de 0,0024 W/kg et durée d'exposition de 3 heures, (ii) DAS de 0,024 W/kg, pendant 2 heures et (iii) DAS de 0,024 W/kg pendant 21 heures. Le système iDEN[®] n'est utilisé que par cette équipe, la répétition des mêmes conditions expérimentales avec des ondes de 836 MHz présentant un protocole d'accès de type TDMA ne montre aucun effet génotoxique significatif. Par ailleurs, cette étude n'est plus référencée dans PubMed.

Les expérimentations de Tice *et al.* (2002) montrent des effets génotoxiques significatifs évalués par le test des micronoyaux après exposition de cellules sanguines pendant 24 heures à des ondes de 837 MHz, à des niveaux de puissance moyens de 5 et 10 W/kg. Ces expériences seront discutées dans le paragraphe suivant.

Les autres études montrent des effets co-génotoxiques avec des agents chimiques, mais ces effets positifs ne sont pas observés avec les radiofréquences seules dans les mêmes conditions d'exposition.

L'équipe de Tiwari *et al.* (2008) trouve des effets co-génotoxiques significatifs avec l'aphidicoline au cours d'une exposition durant 1 et 2 heures, à un DAS moyen de 1,17 W/kg. Ces effets génotoxiques significatifs ne sont pas retrouvés au cours d'une exposition aux

radiofréquences seules dans les mêmes conditions expérimentales (Tiwari *et al.*, 2008), voire contredits dans une autre étude similaire (Maes *et al.*, 2001). Par ailleurs, ces résultats sont à nuancer étant donné que le système d'exposition utilisé, ainsi que la dosimétrie, ne sont pas explicités.

L'équipe de Luukkonen *et al.* (2009) observe un effet co-génotoxique significatif avec la ménadione (agent générant des ROS) après exposition de la lignée cellulaire de neuroblastome (SH-SY5Y) pendant 1 heure à des ondes continues (CW-872) et à un DAS de 5 W/kg. Cet effet positif n'est pas observé avec les ondes de type GSM dans les mêmes conditions expérimentales ou au cours d'expositions aux radiofréquences seules. Cet article ne mentionne aucune dosimétrie.

L'équipe de Kim *et al.* (2008) montre un effet co-génotoxique avec le 4NQO par le test des comètes au cours d'une exposition de 48 heures à des radiofréquences à 4 W/kg. Cet effet positif n'est pas retrouvé pour des expositions seules ou avec d'autres agents génotoxiques (EMS et CPA) par les tests des comètes et des aberrations chromosomiques.

Nos résultats semblent en adéquation avec la majorité des résultats publiés dans la littérature pour des expositions aux radiofréquences de 900 MHz.

III. LA DUREE D'EXPOSITION

A. Données générales de la littérature

Les durées d'exposition *in vitro* ont varié de 15 minutes (Zotti-Martelli *et al.*, 2000 ; d'Ambrosio *et al.*, 2002) à 68 heures (Zeni *et al.*, 2008). Ces durées d'exposition ont été regroupées en 5 catégories (1) de 0,25 à 3 heures, (2) de 4 à 11 heures, durée correspondant généralement à une phase G1 du cycle cellulaire, (3) de 12 à 19 heures, (4) de 20 à 28 heures, durée correspondant généralement à un cycle cellulaire et (5) de 44 à 68 heures, durée correspondant 2 ou 3 cycles cellulaires. Le tableau 18 et la figure 49 représentent la proportion des expérimentations réalisées *in vitro* pour ces différentes durées d'exposition regroupées en 5 catégories.

Tableau 18. Total des expériences réalisées *in vitro* selon les différentes catégories de durée d'exposition

	0,25 h - 3 h	4 h - 11 h	12 h - 19 h	20 h - 28 h	44 h - 68 h	Total
Négatif	255	51	26	154	23	509
Positif	49	9	20	35	4	117
Total	304	60	46	189	27	626

Les expositions courtes (15 minutes à 3 heures) et les expositions équivalentes à un cycle cellulaire (20 à 28 heures) sont les conditions majoritairement étudiées, représentant respectivement 49% et 30% des expérimentations.

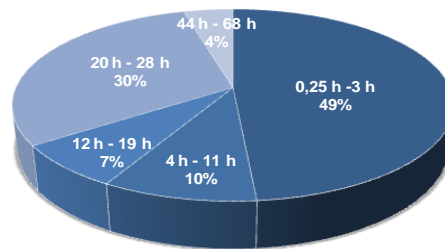


Figure 49. Parts des différentes durées d'exposition aux radiofréquences *in vitro* regroupées en 5 catégories ($n = 626$).

La figure 50 représente la proportion des expérimentations montrant un effet génotoxique significatif par rapport au total des expérimentations pour chaque catégorie de durées d'exposition.

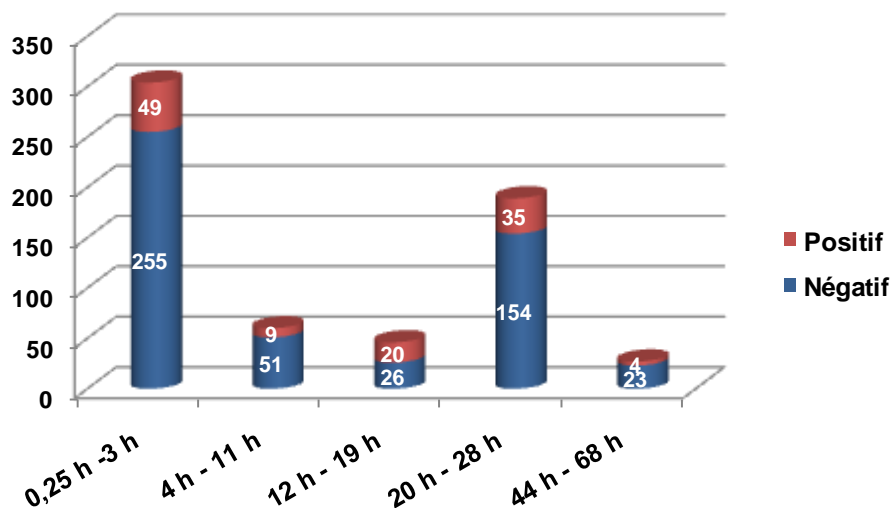


Figure 50. Total des expériences selon les durées d'exposition regroupées en 5 catégories ($n = 626$).

Les barres indiquent le nombre d'expériences avec un effet génotoxique significatif ou positif (en rouge) et celui sans effet génotoxique ou négatif (en bleu) pour chacune des catégories.

Le taux d'expériences positives est plus important (environ 35-40%) pour des durées d'exposition de 12 heures à 19 heures par rapport aux autres durées d'exposition (20 à 25%). Cependant, ce résultat est à nuancer étant donné que les expérimentations portant sur ces durées d'exposition ne représentent que 7% des expériences réalisées *in vitro*.

La figure 51 permet de montrer la répartition des études montrant un effet génotoxique significatif et celles dépourvues d'effet génotoxique en fonction de la fréquence et de la durée d'exposition.

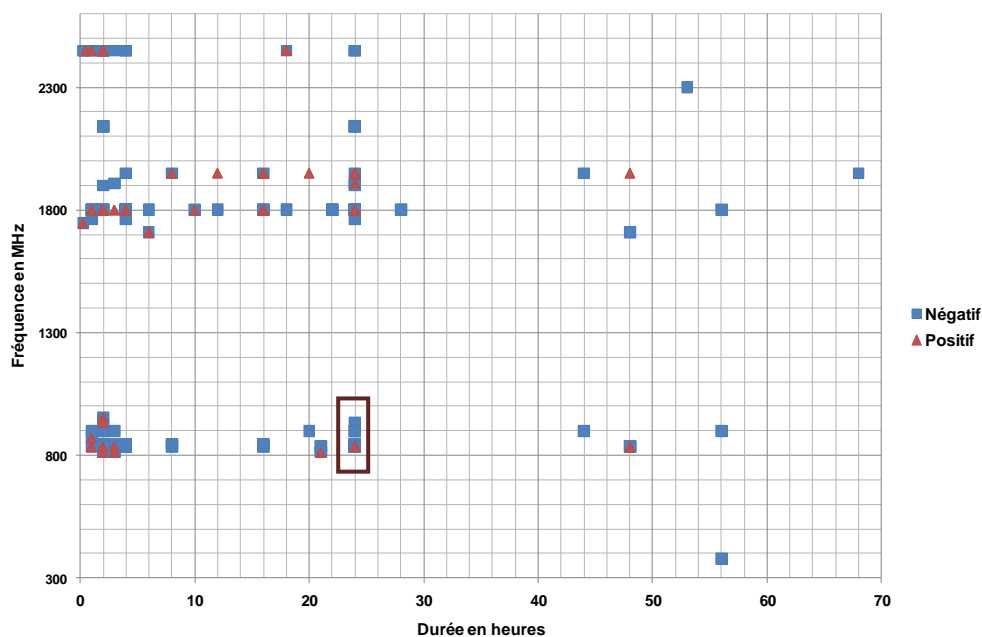


Figure 51. Répartition des études positives et négatives réalisées *in vitro* en fonction de la fréquence et de la durée d'exposition ($n = 626$)

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négatif (carré bleu).

Nos conditions expérimentales correspondent au rectangle rouge.

Il est intéressant de noter que (i) la majorité des expositions ont duré moins de 24 heures, (ii) la plupart des études positives sont observées pour des fréquences de 1800 MHz et (iii) les expériences utilisant des ondes de 900 MHz ont essentiellement été réalisées avec des durées d'exposition inférieures à 4 h et aux alentours de 20-24 heures (Figure 51). Cette dernière durée correspond à celle que nous avons utilisée.

B. Durée d'exposition de 24 heures

Toutes nos expositions ont duré 24 heures, correspondant à la durée d'un cycle cellulaire pour les amniocytes humains. Les expositions aux radiofréquences d'une durée d'environ 24 heures (20 à 28 heures d'exposition) représentent environ 30% (soit 189/626) des expérimentations réalisées *in vitro* et évaluées par les méthodes classiques. Ces expositions durant 24 heures ont été réalisées à différentes fréquences allant de 813 à 2450 MHz. Les études utilisant des fréquences d'environ 900 MHz représentent environ 44% (84/189) des expérimentations réalisées sur 24 heures. Des effets génotoxiques significatifs ont été observés dans un faible nombre d'expériences (7%, soit 6/84) en comparaison avec celui observé avec les radiofréquences d'une fréquence d'environ 1800 MHz (30%, soit 29/96) (Figure 52).

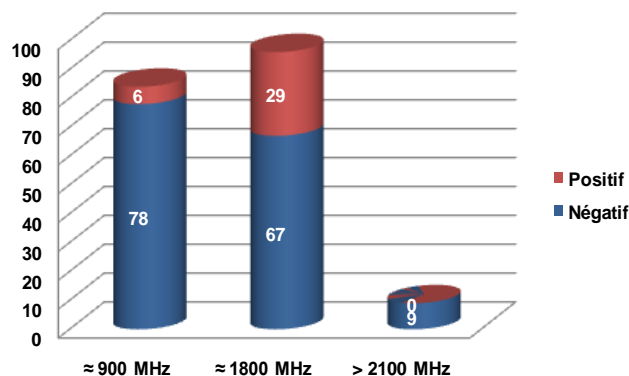


Figure 52. Total des expériences d'une durée d'exposition d'environ 24 heures selon les différentes catégories de fréquences (n = 189).

Les barres indiquent le nombre des expériences montrant un effet significativement génotoxique ou positif (en rouge) et le nombre des expériences négatives (en bleu).

La figure 53 montre la répartition des différentes expérimentations d'une durée d'exposition d'environ 24 heures en fonction de la fréquence et du DAS.

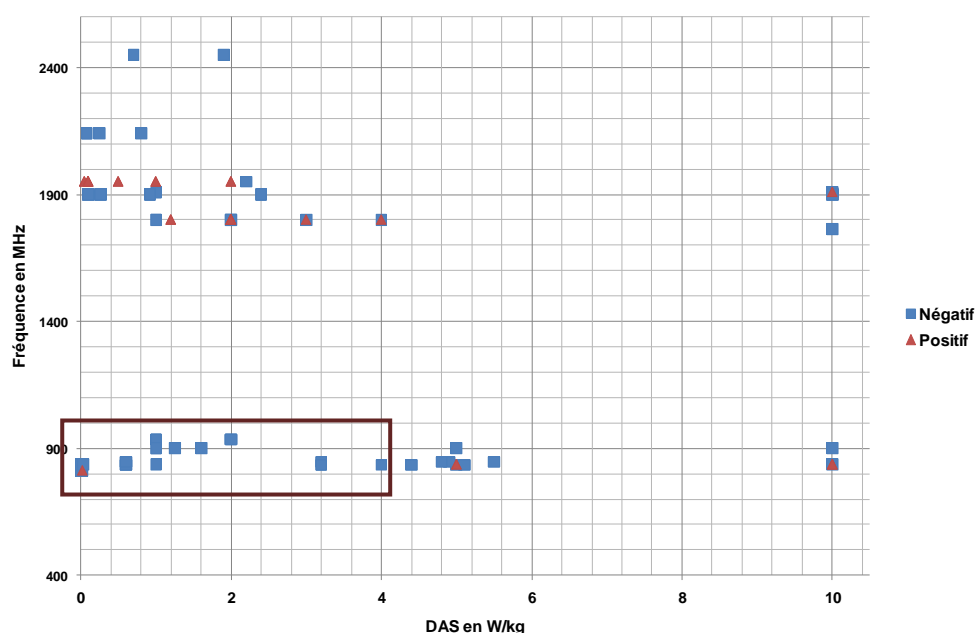


Figure 53. Répartition des études positives et négatives en fonction de la fréquence et du DAS pour une durée d'exposition d'environ 24 heures (20 à 28 heures (n = 189).

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négatif (carré bleu).

Nos conditions expérimentales correspondent au rectangle rouge.

Dans la littérature, une quinzaine de publications ont porté sur l'étude des effets génotoxiques des radiofréquences d'environ 900 MHz (813 à 935 MHz) d'une durée d'exposition d'environ 24 heures (20 à 28 heures) (Malyapa *et al.*, 1997B ; Phillips *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2001 ; Vijayalaxmi *et al.*, 2001A et 2001C ; Bisht *et al.*, 2002 ; Tice *et al.*, 2002 ; Zeni *et al.*, 2003 ; Hook *et al.*, 2004 ; Scarfi *et al.*, 2006 ; Stronati *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2008 ; Sannino *et al.*, 2009A et 2009B). La majorité des études réalisées avec des ondes d'une fréquence autour de 900 MHz et une durée d'exposition d'environ 24 heures ne montrent pas d'effet génotoxique

significatif quels que soient le niveau de puissance (de 0,0024 à 10 W/kg) ou le système biologique exposés (cultures primaires ou lignées cellulaires). Seules deux études montrent des effets génotoxiques significatifs pour une exposition de 24 heures à des ondes de 900 MHz (Phillips *et al.*, 1998 ; Tice *et al.*, 2002).

L'équipe de Phillips *et al.* (1998) a montré un effet génotoxique significatif après exposition pendant 21 heures à des ondes de 813 MHz (signal iDEN[®]) et à un niveau de puissance faible, DAS de 0,024 W/kg. Les résultats de cette équipe ont déjà été discutés dans le paragraphe concernant les fréquences.

L'équipe de Tice *et al.* (2002) a montré des effets génotoxiques significatifs par le test des micronoyaux après exposition pendant 24 heures à des radiofréquences de 837 MHz et à des DAS de 5 et 10 W/kg. Ces effets génotoxiques significatifs n'ont pas été retrouvés avec le test des comètes pour des expositions de 24 heures à un DAS de 10 W/kg. Par ailleurs, les résultats obtenus pour 24 heures d'exposition sont en contradiction avec les résultats de l'étude de Bisht *et al.* (2002), de Vijayalaxmi *et al.* (2001A et 2001C) et de Scarfi *et al.* (2006). L'équipe de Bisht *et al.* (2002) ne retrouve aucun effet génotoxique par le test des MN pour des expositions réalisées pendant 24 heures à des DAS de 4,8 et 5,1 W/kg, mais le modèle cellulaire diffère. En effet, l'équipe de Tice *et al.* (2002) a exposé des cellules sanguines humaines alors que celle de Bisht *et al.* (2002) a exposé des lignées fibroblastiques murines. Les travaux de Vijayalaxmi *et al.* (2001A et 2001C) et Scarfi *et al.* (2006) ne montrent aucun effet génotoxique par le test des micronoyaux réalisé sur cellules sanguines après exposition pendant 24 heures à des DAS d'environ 5 W/kg, mais le type d'onde diffère : ce sont des ondes de type TDMA-837 (Tice *et al.*, 2002), de type CDMA-847 et FDMA-835 (Vijayalaxmi *et al.*, 2001A et 2001C) et GSM-900 (Scarfi *et al.*, 2006).

Nos résultats sont en adéquation avec la majorité des résultats publiés dans la littérature en ce qui concerne nos conditions d'exposition à savoir une fréquence de 900 MHz et une durée d'exposition de 24 heures.

IV. LA PUISSANCE MOYENNE D'EXPOSITION (DAS)

A. Données générales de la littérature

Les puissances d'exposition exprimées par le débit d'absorption spécifique ou DAS représentent un paramètre important de l'exposition. En effet, des DAS élevés sont généralement associés, en plus de l'effet propre à l'onde électromagnétique, à des effets

thermiques. Au cours d'exposition à des puissances élevées, il paraît important de contrôler rigoureusement la température et de s'affranchir de cet effet thermique.

Une revue de la littérature montre que les DAS moyens testés *in vitro* s'étendent de 0,0024 W/kg (Phillips *et al.*, 1998) à 200 W/kg (Koyama *et al.*, 2004). Certaines études (soit 44 expériences) n'ont pas été prises en considération du fait de l'absence de DAS (Zotti-Martelli *et al.*, 2000 et 2005 ; Li *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Hansteen *et al.*, 2009).

Les différents DAS moyens utilisés ont été regroupés en cinq catégories : (1) DAS inférieur à 0,5 W/kg correspondant à des niveaux d'exposition faible, généralement rencontrés quotidiennement (2) DAS supérieur ou égal à 0,5 et inférieur à 2, correspondant aux limites d'exposition locale au niveau de la tête et du tronc (3) DAS supérieur ou égal à 2 et inférieur à 4, correspondant aux limites d'exposition locale au niveau des membres, (4) DAS supérieur ou égal à 4 et inférieur ou égal à 10 et (5) DAS supérieur à 10.

Tableau 19. Total des expériences réalisées *in vitro* selon les différentes catégories de DAS

	DAS < 0,5	0,5 ≤ DAS < 2	2 ≤ DAS < 4	4 ≤ DAS ≤ 10	DAS > 10	Total
Négatif	69	108	202	81	19	479
Positif	21	17	47	11	7	103
Total	90	125	249	92	26	582

La figure 54 représente la proportion des expérimentations réalisées *in vitro* en fonction des niveaux de puissance ou DAS regroupés en 5 catégories.

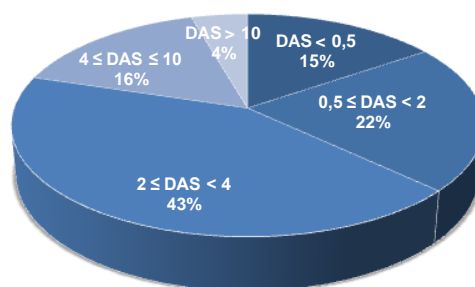


Figure 54. Parts des différents niveaux de puissance (DAS) regroupés en 5 catégories (n = 582).

La majorité des études ont été réalisées avec des puissances de DAS comprises entre 2 et 4 W/kg (Figure 54). Pour chacune de ces catégories de DAS, la part des expérimentations montrant des effets génotoxiques significatifs par rapport au total des expérimentations pour chaque catégorie est schématisée sur la figure 55.

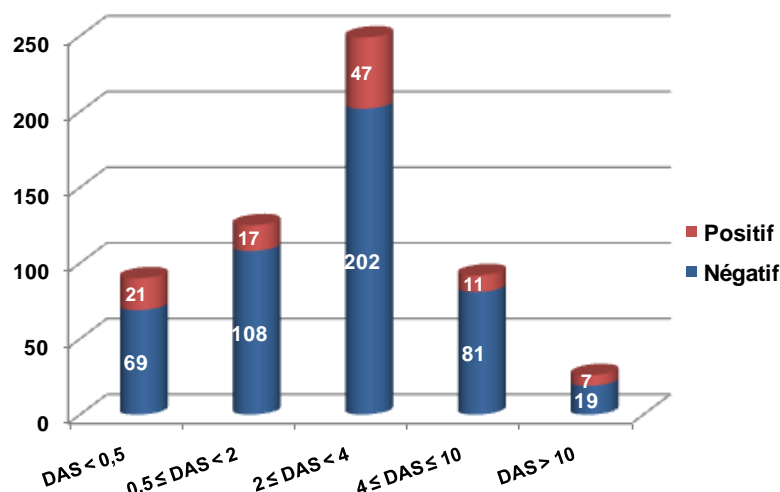


Figure 55. Total des expériences en fonction des niveaux de puissance d'exposition regroupés en 5 catégories (n = 582).

Les barres indiquent le nombre des expériences avec un effet génotoxique significatif ou positif (en rouge) et le nombre des expérimentations sans effet génotoxique ou négatif (en bleu) pour chacune des catégories.

Les puissances les plus faibles (< 0,25 W/kg) et les plus élevées (> 10 W/kg) montrent des effets génotoxiques significatifs plus importants (> 20%) que pour les autres catégories. Pour les puissances élevées, ce résultat est à interpréter avec précaution du fait du faible nombre d'expérimentations (n = 26).

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux études présentant des DAS inférieurs ou égaux à 10, qui représentent la majorité des expérimentations (96%, ou 556/582) (Figure 55).

B. DAS inférieurs à 10 W/kg

Toutes nos expérimentations ont consisté à exposer des amniocytes humains pendant 24 heures à des ondes de type GSM-900, en faisant varier les niveaux de puissance. Nous avons testé quatre DAS : 0,25 ; 1 ; 2 et 4 W/kg, sauf pour le caryotype en bandes R où les expositions ont seulement été réalisées à 0,25 W/kg. Ces DAS ont été choisis car ils correspondent aux limites autorisées des expositions humaines.

La figure 56 illustre l'ensemble des expériences réalisées à des DAS inférieurs ou égaux à 10 W/kg en fonction de la fréquence des ondes utilisées pour l'exposition.

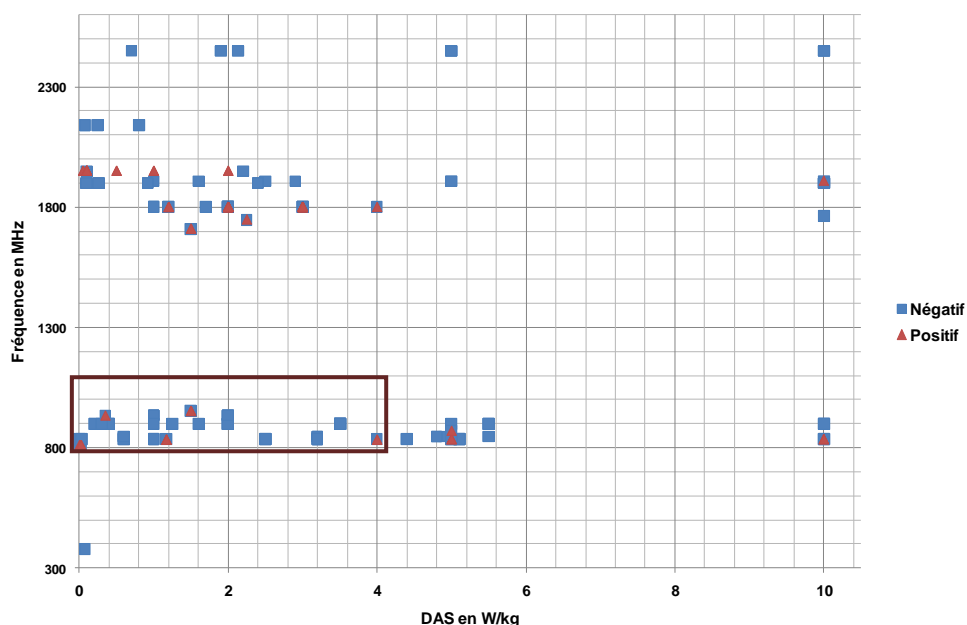


Figure 56. Répartition des études positives et négatives en fonction de la fréquence et des DAS inférieurs ou égaux à 10 W/kg (n = 556).

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négatif (carré bleu).

Nos conditions expérimentales correspondent au rectangle rouge.

Il apparaît que la majorité des expériences ont été réalisées entre 0,0024 et 5,5 W/kg et que les expériences montrant un effet génotoxique significatif sont majoritairement associées à des ondes d'une fréquence d'environ 1800 MHz comme cela a déjà été précisé (Figure 56). Cette tendance est confirmée par le tableau 20 et la figure 57. Les expérimentations montrant des effets génotoxiques significatifs représentent 26% des expositions à des ondes d'environ 1800 MHz alors qu'elles ne représentent que 8% des études effectuées avec des ondes d'environ 900 MHz.

Tableau 20. Total des expériences réalisées *in vitro* à des DAS ≤ 10 W/kg en fonction des différentes catégories de fréquences.

	≈ 900 MHz	≈ 1800 MHz	> 2100 MHz	Total
Négatif	211	212	36	459
Positif	20	76	0	96
Total	231	288	36	555

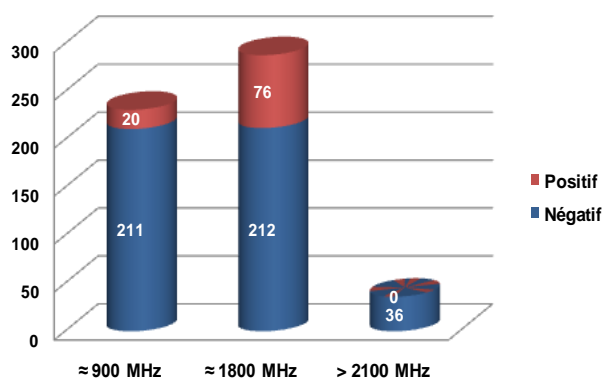


Figure 57. Total des expériences réalisées avec des DAS inférieurs ou égaux à 10 W/kg selon les catégories de fréquences ($n = 555$).

L'étude réalisée à 380 MHz n'a pas été prise en compte.

Les barres indiquent le taux des expériences montrant un effet significativement génotoxique ou positif (en rouge) et le taux des expériences négatives (en bleu).

La figure 58 montre la répartition des études positives et négatives réalisées avec des ondes aux alentours de 900 MHz en fonction du DAS et de la durée d'exposition.

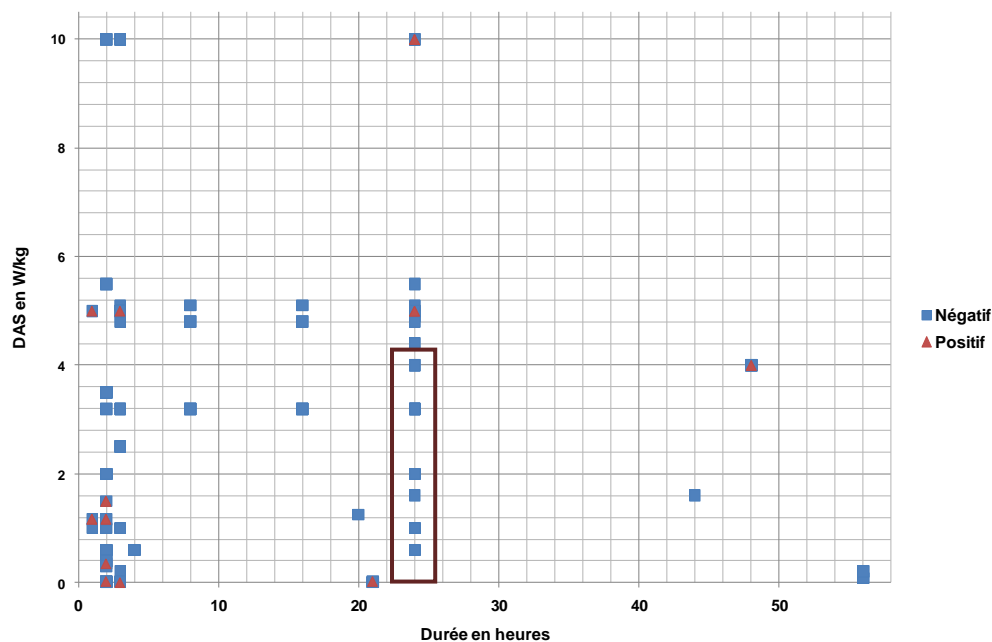


Figure 58. Répartition des études positives et négatives en fonction du DAS et de la durée d'exposition pour des ondes d'une fréquence d'environ 900 MHz ($n = 231$).

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négative (carré bleu).

Nos conditions expérimentales correspondent au rectangle rouge.

La figure 58 suggère que la majorité des expériences montrant des effets génotoxiques significatifs des radiofréquences de 900 MHz sont associées à des niveaux de puissance faibles (< 2 W/kg) et à des durées d'exposition courtes (< 5 heures). Ces expériences positives ont été publiées dans les études suivantes Maes *et al.* (1995, 1996 et 1997), Phillips *et al.* (1998) et Tiwari *et al.* (2008).

Les études de Maes *et al.* (1996 et 1997) et de Tiwari *et al.* (2008) montrent des effets génotoxiques significatifs pour des puissances s'étendant de 0,35 W/kg (Maes *et al.*, 1997) à 1,5 W/kg (Maes *et al.*, 1996) et en association avec un autre agent génotoxique, la mitomycine C pour Maes *et al.* (1996 et 1997) et l'aphidicoline pour Tiwari *et al.* (2008). Ces effets génotoxiques significatifs ne sont pas retrouvés au cours d'une exposition aux radiofréquences seules dans les mêmes conditions expérimentales (Maes *et al.*, 1996 et 1997 ; Tiwari *et al.*, 2008).

Les expériences de Phillips *et al.* (1998) montrent des effets génotoxiques significatifs pour des expositions à des ondes 813 MHz présentant un signal de type iDEN[®] à 0,0024 W/kg pendant 3 heures et à 0,024 W/kg pendant 2 heures, mais l'équipe trouve des résultats négatifs avec ce même type d'onde pour des puissances de 0,0024 W/kg pendant 2 heures et de 0,024 W/kg pendant 3 heures. Ces résultats restent très surprenants.

Quelques études ont montré des effets génotoxiques significatifs pour des DAS d'environ 5 W/kg et des durées d'exposition n'excédant pas 24 heures (Tice *et al.*, 2002 ; Luukkonen *et al.*, 2009). L'équipe de Tice *et al.* (2002) montre des effets positifs avec le test des MN pour des expositions de 3 et 24 heures à une puissance de 5 W/kg. Les effets observés après 3 heures d'exposition ne sont pas retrouvés par le test des comètes. L'étude de Luukkonen *et al.* (2009) montre des effets co-génotoxiques significatifs avec la ménadione après expositions à des ondes CW-872 pendant 1 heure à un DAS de 5 W/kg. Ces résultats ont déjà été discutés.

En ce qui concerne nos conditions d'expositions (GSM-900, 24 heures, DAS de 0,25, 1, 2 et 4 W/kg), aucune étude n'a montré d'effet génotoxique significatif. Nos résultats semblent concorder avec la majorité des résultats publiés dans la littérature pour des DAS similaires à ceux que nous avons utilisés.

V. LA CO-GENOTOXICITE

A. Données générales de la littérature

De nombreuses études ont évalué les effets co-génotoxiques des radiofréquences en cumulant l'exposition des RF avec des agents génotoxiques connus. Ces agents peuvent être (i) de nature physique comme les rayons gamma (Lagroye *et al.*, 2004), les rayons X (Maes *et al.*, 2001 ; Stronati *et al.*, 2006 ; Zhijian *et al.*, 2009), les rayonnements UVC (Baohong *et al.*, 2007) ou bien (ii) de nature chimique comme le BrdU (Malyapa *et al.*, 1997), la ménadione, agent générant des ROS (Luukkonen *et al.*, 2009), la mitomycine C, agent provoquant des

pontages (Maes *et al.*, 1996, 1997 et 2001 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Baohong *et al.*, 2005 ; Hansteen *et al.*, 2009 ; Sannino *et al.*, 2009A), le 4NQO ou 4 nitroquinoline-1-oxide, agent UV-mimétique (Baohong *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2008), le CPA ou cyclophosphamide monohydrate, l'EMS ou éthylméthane sulfonate, agents clastogènes (Kim *et al.*, 2008), l'APC ou aphidicoline, inhibiteur de la réparation d'ADN (Tiwari *et al.*, 2008), la bléomycine, agent radiomimétique (Koyama *et al.*, 2003 et 2004 ; Baohong *et al.*, 2005), le MMS ou méthyl méthane-sulfonate, agent alkylant (Baohong *et al.*, 2005), la doxorubicine ou DOX, inhibiteur de la topoisomérase II et agent générant des ROS (Zhijian *et al.*, 2010), le MX ou 3 chloro-4 (dichlorométhyl)5 hydroxy 2(5H) furanone, un agent génotoxique complexe (Verschaeve *et al.*, 2006 ; Sannino *et al.*, 2009B), la caféine et l'hydroxyurée (Hansteen *et al.*, 2009).

Tableau 21. Total des expositions *in vitro* aux radiofréquences seules ou en co-génotoxicité

	RF seule	Co-génotoxicité	Co-génotoxicité Agent chimique	Co-génotoxicité Agent physique	Total
Négatif	388	121	69	52	509
Positif	78	39	34	5	117
Total	466	160	103	57	626

Les expériences étudiant la co-génotoxicité des RF représentent un quart des expérimentations (26%, soit 160/626) (Tableau 21 et Figure 59).

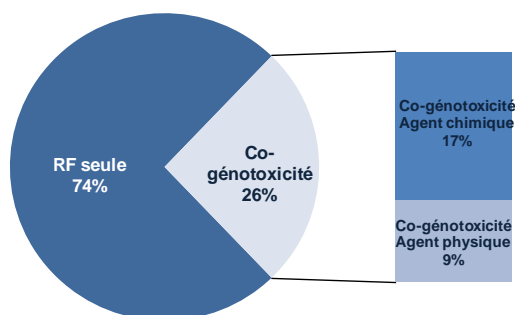


Figure 59. Parts des expositions réalisées avec les RF seules ou en co-génotoxicité avec des agents chimique et physique (n = 626).

Le taux d'expériences montrant des effets génotoxiques significatifs atteint 32% lors d'une co-exposition des RF avec des agents génotoxiques connus (Maes *et al.*, 1996 et 1997 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Koyama *et al.*, 2003 et 2004 ; Baohong *et al.*, 2005 et 2007 ; Kim *et al.*, 2008 ; Tiwari *et al.*, 2008 ; Luukkonen *et al.*, 2009 ; Zhijian *et al.*, 2010), alors que ce taux n'est que de 20% lors d'une exposition seule aux radiofréquences. La co-exposition des radiofréquences à des agents chimiques montrent des effets génotoxiques significatifs plus importants qu'avec des agents physiques (49% versus 10%) (Figure 60).

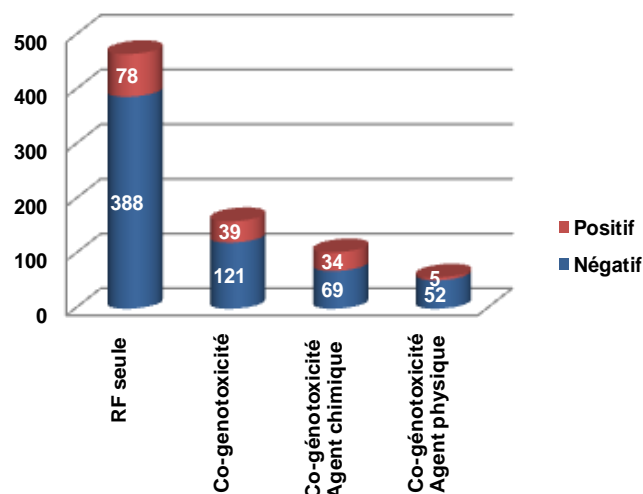


Figure 60. Total des expositions aux RF seules ou en co-génotoxicité avec des agents physique et chimique (n = 626).

Les barres indiquent le taux des expériences montrant un effet significativement génotoxique ou positif (en rouge) et le taux des expériences négatives (en bleu).

La plupart des études montrant des effets génotoxiques significatifs lors d'une co-exposition des RF avec des agents génotoxiques ne retrouvent pas cet effet lors d'une exposition seule aux radiofréquences dans les mêmes conditions expérimentales (Maes *et al.*, 1996 et 1997 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Koyama *et al.*, 2003 et 2004 ; Baohong *et al.*, 2005 et 2007 ; Kim *et al.*, 2008 ; Tiwari *et al.*, 2008 ; Luukkonen *et al.*, 2009 ; Zhijian *et al.*, 2010).

B. Exposition aux radiofréquences seules

Nous avons réalisé des expositions aux radiofréquences seules présentant une fréquence de 900 MHz et un signal GSM. Aucun agent chimique ou physique génotoxique n'a été utilisé en co-exposition.

La figure 61 montre la répartition des expériences positives et négatives correspondant à des expositions seules aux radiofréquences selon la fréquence et la durée d'exposition.

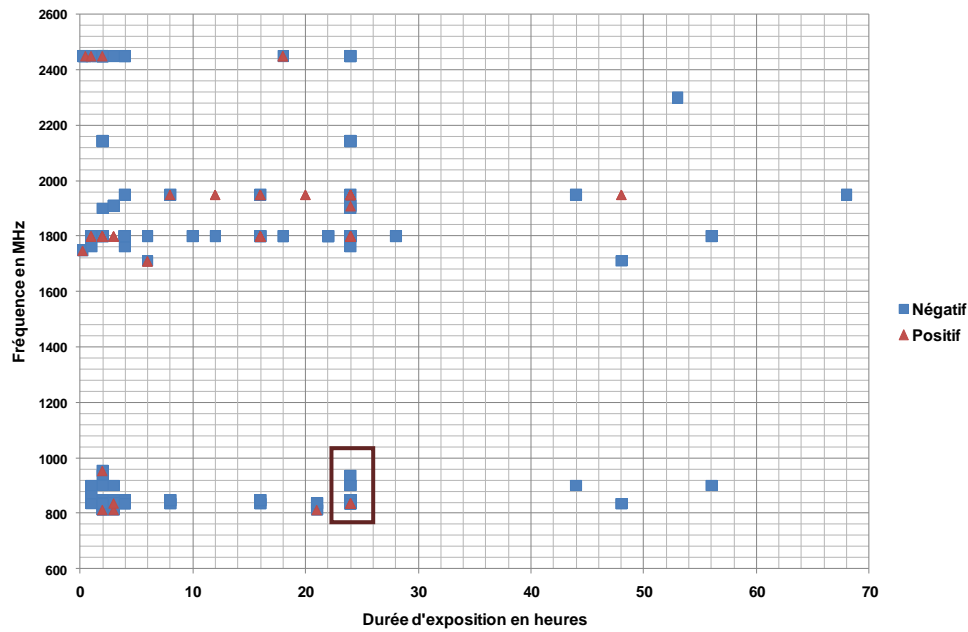


Figure 61. Répartition des études positives et négatives correspondant à des expositions seules aux radiofréquences (n = 466).

Etudes positives présentant un effet génotoxique significatif ou positif (triangle rouge).

Etudes négatives dépourvues d'effet génotoxique significatif ou négative (carré bleu).

Nos conditions expérimentales correspondent au rectangle rouge.

Cette figure semble assez similaire à la figure 51, représentant la répartition de la totalité des expériences réalisées *in vitro* (n = 626). Ceci est lié au fait que la co-exposition avec des agents génotoxiques représente une faible proportion des expérimentations et ne semble pas influencer la tendance observée.

Aux alentours d'une fréquence de 900 MHz et d'une durée d'exposition d'environ 24 heures, seules les études de Phillips *et al.* (1998) et Tice *et al.* (2002) montrent des effets génotoxiques significatifs. Ces deux études ont déjà été discutées.

CONCLUSION

L'usage croissant des téléphones mobiles s'est accompagné de nombreuses investigations portant sur les effets biologiques et sanitaires liés aux ondes électromagnétiques utilisées pour les radiocommunications.

Notre travail s'est inscrit dans cette recherche et les résultats de nos travaux montrent :

- (1) l'absence d'effet clastogène et aneuploïdogène significatif par la réalisation du caryotype en bandes R et la FISH,
- (2) l'absence d'augmentation significative de l'expression et l'activation par phosphorylation des protéines p53 et H2AX impliquées dans les voies de signalisation des lésions de l'ADN, et
- (3) l'absence de clivage de la caspase 3, protéine impliquée dans les voies caspases-dépendantes intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

Nos investigations ne révèlent donc pas d'effet génotoxique significatif des ondes utilisées par la téléphonie mobile d'une fréquence de 900 MHz et d'un signal modulé selon le protocole GSM sur des amniocytes humains exposés *in vitro* pendant 24 heures à des niveaux de puissance s'étalant de 0,25 à 4 W/kg. Ils ne montrent pas d'augmentation du clivage de la caspase 3 impliquée dans l'apoptose caspase-dépendante, une des voies de mort cellulaire pour les cellules dont l'ADN est trop endommagé.

La revue de la littérature effectuée indique que nos résultats sont en accord avec la majorité des résultats publiés dans des conditions expérimentales similaires à savoir une fréquence aux alentours de 900 MHz, une durée d'exposition entre 20 et 28 heures et des niveaux d'exposition (DAS) inférieurs à 5 W/kg.

En revanche, d'après cette revue de la littérature, plusieurs aspects méritent d'être soulignés en ce qui concerne les expériences montrant des effets génotoxiques significatifs :

- Les études positives semblent plus importantes aux fréquences de 1800 MHz qu'aux fréquences de 900 MHz.
- Les études positives sont plus nombreuses aux DAS très faibles, inférieurs à 0,5 W/kg et aux DAS élevés supérieurs à 10 W/kg. Il n'est pas surprenant d'observer une augmentation des études positives avec le niveau de puissance ou DAS de l'exposition, mais il est difficile d'expliquer l'augmentation des études positives pour les faibles DAS. Il serait intéressant de revoir la dosimétrie de ces études. D'ailleurs certaines études ne sont plus référencées dans PubMed (Phillips *et al.*, 1998).

- Les études positives semblent plus nombreuses pour une durée d'exposition allant de 12 à 19 heures. Ce résultat est à nuancer en raison du faible nombre d'études réalisées pour ces durées.
- Les tests des comètes et des micronoyaux sont des méthodes qui ont largement été utilisées pour évaluer les effets génotoxiques. Leur sensibilité est similaire, mais leurs résultats sont parfois contradictoires pour des conditions d'exposition similaires. Les tests des aberrations chromosomiques et les échanges de chromatides sœurs ne détectent que les cassures double brin ayant occasionné des aberrations chromosomiques ou chromatidiques.
- Un nombre non négligeable d'articles ne sont plus référencés dans PubMed, ou sont à l'heure actuelle contestés.

PERSPECTIVES

A l'avenir, il semble important de confirmer ou d'infirmer les résultats positifs de ces études publiées par de nouvelles investigations réalisées dans des conditions expérimentales similaires, mais dans des conditions parfaitement contrôlées, notamment concernant le niveau de DAS.

Les travaux de l'équipe de Belayev *et al.* montrent une augmentation de la compaction de la chromatine par la technique AVTD après exposition à des radiofréquences utilisées par la téléphonie mobile. Ces travaux suggèrent que les radiofréquences pourraient induire une modulation de la conformation de la chromatine. Or il est connu que la compaction de la chromatine est un phénomène important dans la régulation de l'expression génique. Elle est associée à des modifications épigénétiques qui sont définies comme des modifications de l'expression des gènes, sans modification de la séquence nucléotidique. Elles consistent principalement en une modification des histones, mais également en une méthylation de l'ADN.

- La modification des histones consiste en des phénomènes de phosphorylation, acétylation ou méthylation sur certains acides aminés situés au niveau de l'extrémité N-terminale (acétylation et méthylation des lysines). Ces modifications sont dynamiques et réversibles et sont responsables de l'état transcriptionnel de la chromatine. Le niveau d'acétylation des histones résulte de l'activité de deux familles d'enzymes antagonistes : les histone-désacétylases (HDAC) qui répriment la transcription alors que les histone-acétyltransférases ou HAT (CREB et p300) qui activent la transcription. La méthylation des histones par l'histone méthyltransférase (HMT) joue également un rôle dans la régulation de l'expression génique : la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 active la transcription alors que la méthylation de la lysine 9 la réprime.
- La méthylation de l'ADN consiste en une méthylation des dinucléotides CpG regroupés sous forme d'îlots CpG positionnés au niveau du promoteur ou du premier exon de plus de 60% des gènes humains. Elle se met en place très tôt au cours du développement par l'intervention d'ADN-méthyltransférases (DNMT1, DNMT3a et DNMT3b). Elle est stable et transmissible au cours de la mitose et/ou de la méiose.

Les modifications épigénétiques de certains gènes sont connues pour être impliquées en pathologie constitutionnelle, mais ces dernières années, il a été montré qu'elles pouvaient être impliquées dans les processus oncogéniques (revues de Deltour *et al.*, 2005 ; de Sharma *et al.*,

2010). Il a été montré que les gènes codant pour les histone-acétyltransférases comme CREB et p300, des co-activateurs transcriptionnels, sont la cible de nombreuses translocations chromosomiques associées à des leucémies. Par ailleurs, l'hyperméthylation des îlots CpG de certains gènes suppresseurs de tumeurs peut contribuer à l'émergence tumorale comme cela a été montré pour le gène HIC1 (hypermethylated in cancer 1) impliqué dans les médulloblastomes, les gliomes et les cancers du sein et de l'ovaire. Bien que certains îlots CpG soient hyperméthylés, le génome des cellules cancéreuses se caractérise par une hypométhylation génomique globale qui peut avoir plusieurs implications fonctionnelles : (i) la réactivation de certains gènes et (ii) des cassures et des remaniements chromosomiques lorsqu'elles concernent les régions satellites péricentromériques.

De l'importance de l'épigénétique dans la cancérogenèse, il semble important d'étudier les effets des radiofréquences sur les modifications épigénétiques. Deux approches peuvent être envisagées dans un premier temps :

- Etudier le niveau de méthylation globale du génome des cellules exposées aux RF par rapport à des cellules contrôles par cytométrie en flux après immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-5-méthylcytosine.
- Etudier le niveau d'acétylation des histones formant le nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4) de cellules exposées aux RF par rapport à des cellules contrôles par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes acétylées des histones.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 2001 Sep 1;15(17):2177-96. Review.
- Achanta G, Huang P. Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. *Cancer Res.* 2004 Sep 1;64(17):6233-9.
- Adda di Fagnana F d', Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003 Nov 13;426(6963):194-8.
- Adimoolam S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2003 Sep 18;2(9):947-54.
- Agence française de sécurité sanitaire environnementale (AFSSE). *Téléphonie mobile et santé.* Mars 2003; 103 pages.
- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET). *Radiofréquences. Edition scientifique, Agents physiques.* Octobre 2009; 467 pages.
- Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl.* 2005 Jun;28(3):171-9.
- Alipov YD, Belyaev IY. Difference in frequency spectrum of extremely-low-frequency effects on the genome conformational state of AB 1157 and EMG2 *E. coli* cells. *Bioelectromagnetics.* 1996;17(5):384-7.
- Ambrosio G d', Massa R, Scarfi MR, Zeni O. Cytogenetic damage in human lymphocytes following GSM phase modulated microwave exposure. *Bioelectromagnetics.* 2002 Jan;23(1):7-13.
- Amé JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Höger T, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18;274(25):17860-8.
- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Mar;70(3):782-6.
- Anderson ME, Woelker B, Reed M, Wang P, Tegtmeyer P. Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol.* 1997 Nov;17(11):6255-64.
- Antonopoulos A, Eisenbrandt H, Obe G. Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes *in vitro*. *Mutat Res* 1997; 395:209-214. Article non référencé dans PubMed.

-
- Aurer I, Canaani E, Gale RP. Hypothesis: additional cytogenetic abnormalities and progression to acute phase in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 1991 Nov;5(11):1012-3.
- Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*. 1997 Jun 27;89(7):1175-84.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003 Jan 30;421(6922):499-506.
- Baehrecke. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat rev Mol Cell Biol*. 2005 Jun;6(6):505-10.
- Baohong W, Jiliang H, Lifen J, Deqiang L, Wei Z, Jianlin L, Hongping D. Studying the synergistic damage effects induced by 1.8 GHz radiofrequency field radiation (RFR) with four chemical mutagens on human lymphocyte DNA using comet assay *in vitro*. *Mutat Res*. 2005 Oct 15;578(1-2):149-57.
- Baohong W, Lifen J, Lanjuan L, Jianlin L, Deqiang L, Wei Z, Jiliang H. Evaluating the combinative effects on human lymphocyte DNA damage induced by ultraviolet ray C plus 1.8 GHz microwaves using comet assay *in vitro*. *Toxicology*. 2007 Apr 11;232(3):311-6.
- Baan RA. Editorial: controversy related to two published papers. *Mutat Res*. 2009 Feb 19;673(1):1.
- Baan RA. Letter of concern. *Mutat Res*. 2010 Jan;695(1-2):1.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1674-7.
- Bean LJ, Stark GR. Phosphorylation of serines 15 and 37 is necessary for efficient accumulation of p53 following irradiation with UV. *Oncogene*. 2001 Mar 1;20(9):1076-84.
- Bean LJ, Stark GR. Regulation of the accumulation and function of p53 by phosphorylation of two residues within the domain that binds to Mdm2. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1864-71.
- Belmonkhtar CA, Hillion J, Dudognon C, Fiorentino S, Flexor M, Lanotte M *et al*. Apoptosome-independent pathway for apoptosis. Biochemical analysis of APAF-1 defects and biological outcomes. *J Biol Chem* 2003; 278 : 29571-80.
- Belyaev IY, Hillert L, Protopopova M, Tamm C, Malmgren LO, Persson BR, Selivanova G, Harms-Ringdahl M. 915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Bioelectromagnetics*. 2005 Apr;26(3):173-84.
- Belyaev IY, Koch CB, Terenius O, Roxström-Lindquist K, Malmgren LO, H Sommer W, Salford LG, Persson BR. Exposure of rat brain to 915 MHz GSM microwaves induces
-

-
- changes in gene expression but not double stranded DNA breaks or effects on chromatin conformation. *Bioelectromagnetics*. 2006 May;27(4):295-306.
- Belyaev IY, Markovà E, Hillert L, Malmgren LO, Persson BR. Microwaves from UMTS/GSM mobile phones induce long-lasting inhibition of 53BP1/gamma-H2AX DNA repair foci in human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 2009 Feb;30(2):129-41.
- Bernard Laurent. Caractérisation électrique des tissus biologiques et calcul des phénomènes induits dans le corps humain par des champs électromagnétiques de fréquence inférieure au GHz. Diplôme De Doctorat. Spécialité : Electronique, Electrotechnique, Automatique. Ecole centrale de Lyon. Soutenance le 20 septembre 2007. Pages: 1-129.
- Bisht KS, Moros EG, Straube WL, Baty JD, Roti Roti JL. 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*. 2002 May;157(5):506-15.
- Boix J, Llecha N, Yuste VJ, Comella JX. Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology*. 1997 Jun;36(6):811-21.
- Boyle JM, Mitchell EL, Greaves MJ, Roberts SA, Tricker K, Burt E, Varley JM, Birch JM, Scott D. Chromosome instability is a predominant trait of fibroblasts from Li-Fraumeni families. *Br J Cancer*. 1998 Jun;77(12):2181-92.
- Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S, Fried VA, Minamoto T, Alarcon-Vargas D, Pincus MR, Gaarde WA, Holbrook NJ, Shiloh Y, Ronai Z. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol*. 2001 Apr;21(8):2743-54.
- Busljeta I, Trosic I, Milkovic-Kraus S. Erythropoietic changes in rats after 2.45 GJz nonthermal irradiation. *Int J Hyg Environ Health*. 2004 Dec;207(6):549-54.
- Camhi SL, Lee P, Choi AM. The oxidative stress response. *New Horiz*. 1995 May;3(2):170-82.
- Caspari T. How to activate p53. *Curr Biol*. 2000 Apr 20;10(8):R315-7.
- Chang SK, Choi JS, Gil HW, Yang JO, Lee EY, Jeon YS, Lee ZW, Lee M, Hong MY, Ho Son T, Hong SY. Genotoxicity evaluation of electromagnetic fields generated by 835-MHz mobile phone frequency band. *Eur J Cancer Prev*. 2005 Apr;14(2):175-9.
- Chauhan V, Qutob SS, Lui S, Mariampillai A, Bellier PV, Yauk CL, Douglas GR, Williams A, McNamee JP. Analysis of gene expression in two human-derived cell lines exposed *in vitro* to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Proteomics*. 2007 Nov;7(21):3896-905.
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1713-6.
-

-
- Costa RM, Chiganças V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003 Nov;85(11):1083-99. Review.
- Craig AL, Blaydes JP, Burch LR, Thompson AM, Hupp TR. Dephosphorylation of p53 at Ser20 after cellular exposure to low levels of non-ionizing radiation. *Oncogene*. 1999 Nov 4;18(46):6305-12.
- Delacroix S, Wagner JM, Kobayashi M, Yamamoto K, Karnitz LM. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev*. 2007 Jun 15;21(12):1472-7.
- Deltour S, Chopin V, Leprince D. Modifications épigénétiques et cancer. *Médecine et sciences*. 2005, 21 : 405-11.
- Desai NR, Kesari KK, Agarwal A. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Oct 22;7:114.
- DiTullio RA Jr, Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J, Halazonetis TD. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol*. 2002 Dec;4(12):998-1002.
- Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, Jahn O, Rüdiger H. 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*. 2005 Jun 6;583(2):178-83.
- Drané P, Alvarez S, Meiller A, May E. L'activation de la protéine p53, un évènement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. *Médecine nucléaire, Imagerie fonctionnelle et métabolique*. 2002 ; 26(3) :139-147.
- Drexler H, Schaller KH. Expression of concern. *Int Arch Occup Environ Health*. 2009 Jan;82(2):143-4.
- Dumaz N, Meek DW. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J*. 1999 Dec 15;18(24):7002-10.
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death patterns: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009 Jul; 16(7):966-75.
- Emmert S, Kobayashi N, Khan SG, Kraemer KH. The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29;97(5):2151-6.
- Emmert S, Schneider TD, Khan SG, Kraemer KH. The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 2001 Apr 1;29(7):1443-52.
- Espinosa JM. Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene*. 2008 Jul 3;27(29):4013-23.
-

-
- Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):842-7.
- Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet*. 2002 Mar;30(3):290-4.
- Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 2005 Mar 31;434(7033):605-11. Epub 2005 Mar 2.
- Fearon ER. A genetic basis for the multi-step pathway of colorectal tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp*. 1991;22:37-48. Review.
- Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*. 1985 Feb-Apr;147(1-2):29-36.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8204-9.
- Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*. 2002 Dec;4(12):993-7.
- Ferreira AR, Knakievicz T, Pasquali MA, Gelain DP, Dal-Pizzol F, Fernández CE, de Salles AA, Ferreira HB, Moreira JC. Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring. *Life Sci*. 2006 Dec 3;80(1):43-50.
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol RW, Wilson SH, Dogliotti E. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*. 1998 Mar 17;37(11):3575-80.
- Franzellitti S, Valbonesi P, Ciancaglini N, Biondi C, Contin A, Bersani F, Fabbri E. Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay. *Mutat Res*. 2010 Jan 5;683(1-2):35-42.
- Frenkel K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther*. 1992; 53(1):127-66. Review
- Friedberg EC. Cockayne syndrome--a primary defect in DNA repair, transcription, both or neither? *Bioessays*. 1996 Sep;18(9):731-8. Review.
- Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1996 Apr 19;271(16):9573-8.
-

-
- Gadhia PK, Shah T, Mistry A, Pithawala M, Tamakuwala D. A preliminary study to assess possible chromosomal damage among users of digital mobile phones. *Electromagnetic Biol Med.* 2003; 22:149-159.
- Gandhi G et al. Cytogenetic damage in mobile phone users : Preliminary data. *Ind journal Hum genet.* 2005A; 5, 259-265.
- Gandhi G et al. Cytogenetic damage in mobile phone users : Some preliminary findings. *Ind journal Hum genet.* 2005B; 11, 99-104.
- Garaj-Vrhovac V. Micronucleus assay and lymphocyte mitotic activity in risk assessment of occupational exposure to microwave radiation. *Chemosphere.* 1999 Dec;39(13):2301-12.
- Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J, Jackson SP. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature.* 2003 Feb 27;421(6926):952-6.
- Görlitz BD, Müller M, Ebert S, Hecker H, Kuster N, Dasenbrock C. Effects of 1-week and 6-week exposure to GSM/DCS radiofrequency radiation on micronucleus formation in B6C3F1 mice. *Radiat Res.* 2005 Oct;164(4 Pt 1):431-9.
- Gos P, Eicher B, Kohli J, Heyer WD. No mutagenic or recombinogenic effects of mobile phone fields at 900 MHz detected in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics.* 2000 Oct;21(7):515-23.
- Gottifredi V, Prives C. Molecular biology. Getting p53 out of the nucleus. *Science.* 2001 Jun 8;292(5523):1851-2.
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 2002 Feb;1(1):19-30. Review.
- Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):595-606.
- Gurisik E, Warton K, Martin DK, Valenzuela SM. 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.* 2006 Oct;30(10):793-9.
- Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis.* 2007 Nov;28(11):2298-304.
- Hansteen IL, Clausen KO, Haugan V, Svendsen M, Svendsen MV, Eriksen JG, Skiaker R, Hauger E, Lågeide L, Vistnes AI, Kure EH. Cytogenetic effects of exposure to 2.3 GHz radiofrequency radiation on human lymphocytes *in vitro*. *Anticancer Res.* 2009 Nov;29(11):4323-30.
- Harms K, Nozell S, Chen X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Apr;61(7-8):822-42. Review.
-

-
- Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, Heinloth AN, Paules RS, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK. An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2002 Dec;22(24):8552-61.
- Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol.* 2006 Jun;16(3):183-92. Epub 2006 Apr 1. Review.
- Hirose H, Sakuma N, Kaji N, Suhara T, Sekijima M, Nojima T, Miyakoshi J. 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.* 2006 Sep;27(6):494-504.
- Hirose H, Sakuma N, Kaji N, Nakayama K, Inoue K, Sekijima M, Nojima T, Miyakoshi J. Mobile phone base station-emitted radiation does not induce phosphorylation of Hsp27. *Bioelectromagnetics.* 2007 Feb;28(2):99-108.
- Hook GJ, Zhang P, Lagroye I, Li L, Higashikubo R, Moros EG, Straube WL, Pickard WF, Baty JD, Roti Roti JL. Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after *in vitro* exposure to radiofrequency radiation. *Radiat Res.* 2004 Feb;161(2):193-200.
- Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med.* 2006 Jul-Sep;7(3):165-72.
- Huang TQ, Lee MS, Oh E, Zhang BT, Seo JS, Park WY. Molecular responses of Jurkat T-cells to 1763 MHz radiofrequency radiation. *Int J Radiat Biol.* 2008 Sep;84(9):734-41.
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell.* 1992 Nov 27;71(5):875-86.
- Hupp TR, Sparks A, Lane DP. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell.* 1995 Oct 20;83(2):237-45.
- Jabbur JR, Huang P, Zhang W. DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction *in vivo*. *Oncogene.* 2000 Dec 14;19(54):6203-8.
- Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005 Feb;4(2):139-63. Review.
- Joubert V, Leveque P, Rametti A, Collin A, Bourthoumieu S, Yardin C. Microwave exposure of neuronal cells *in vitro*: Study of apoptosis. *Int J Radiat Biol.* 2006 Apr;82(4):267-75.
- Joubert V, Leveque P, Cueille M, Bourthoumieu S, Yardin C. No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields. *Bioelectromagnetics.* 2007 Feb;28(2):115-21.
-

- Joubert V, Bourthoumieu S, Leveque P, Yardin C. Apoptosis is induced by radiofrequency fields through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons. *Radiat Res.* 2008 Jan;169(1):38-45.
- Jun SH, Kim TG, Ban C. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J.* 2006 Apr;273(8):1609-19. Review.
- Juutilainen J, Heikkinen P, Soikkeli H, Mäki-Paakkanen J. Micronucleus frequency in erythrocytes of mice after long-term exposure to radiofrequency radiation. *Int J Radiat Biol.* 2007 Apr;83(4):213-20.
- Kapoor M, Lozano G. Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):2834-7.
- Karimi-Busheri F, Daly G, Robins P, Canas B, Pappin DJ, Sgouros J, Miller GG, Fakhrai H, Davis EM, Le Beau MM, Weinfeld M. Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274(34):24187-94.
- Kim ST, Xu B, Kastan MB. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev.* 2002 Mar 1;16(5):560-70.
- Kim JY, Hong SY, Lee YM, Yu SA, Koh WS, Hong JR, Son T, Chang SK, Lee M. *In vitro* assessment of clastogenicity of mobile-phone radiation (835 MHz) using the alkaline comet assay and chromosomal aberration test. *Environ Toxicol.* 2008 Jun;23(3):319-27
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2008 Oct;36(17):5678-94.
- Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol.* 2002 Oct 29;12(21):1846-51.
- Komatsubara Y, Hirose H, Sakurai T, Koyama S, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J. Effect of high-frequency electromagnetic fields with a wide range of SARs on chromosomal aberrations in murine m5S cells. *Mutat Res.* 2005 Nov 10;587(1-2):114-9.
- Koyama S, Nakahara T, Wake K, Taki M, Isozumi Y, Miyakoshi J. Effects of high frequency electromagnetic fields on micronucleus formation in CHO-K1 cells. *Mutat Res.* 2003 Nov 10;541(1-2):81-9.
- Koyama S, Isozumi Y, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J. Effects of 2.45-GHz electromagnetic fields with a wide range of SARs on micronucleus formation in CHO-K1 cells. *ScientificWorldJournal.* 2004 Oct 20;4 Suppl 2:29-40.
- Koyama S, Takashima Y, Sakurai T, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J. Effects of 2.45 GHz electromagnetic fields with a wide range of SARs on bacterial and HPRT gene mutations. *J Radiat Res (Tokyo).* 2007 Jan;48(1):69-75.

-
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 1996 Nov 28;384(6607):368-72.
- Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*. 2006 Mar 10;124(5):943-55.
- Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:681-710. Review.
- Lagroye I, Hook GJ, Wettring BA, Baty JD, Moros EG, Straube WL, Roti Roti JL. Measurements of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low-dose gamma irradiation *in vitro*. *Radiat Res*. 2004A Feb;161(2):201-14.
- Lagroye I, Anane R, Wettring BA, Moros EG, Straube WL, Laregina M, Niehoff M, Pickard WF, Baty J, Roti Roti JL. 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*. 2004B Jan;80(1):11-20.
- Lai H, Singh NP. Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics*. 1995;16(3):207-10.
- Lai H, Singh NP. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int. J. Radiat. Biol*. 1996; 69(4):513-521. Article non référencé dans PubMed.
- Lai H, Singh NP. Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics*. 1997;18(6):446-54.
- Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, Shiekhattar R, Brady JN. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):33048-53.
- Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson SH, Yasui A. *In situ* analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 21;101(38):13738-43.
- Lange S, Richard D, Viergutz T, Kriehuber R, Weiss DG, Simkó M. Alterations in the cell cycle and in the protein level of cyclin D1, p21CIP1, and p16INK4a after exposure to 50 Hz MF in human cells. *Radiat Environ Biophys*. 2002 Jun;41(2):131-7.
- Lange S, Viergutz T, Simkó M. Modifications in cell cycle kinetics and in expression of G1 phase-regulating proteins in human amniotic cells after exposure to electromagnetic fields and ionizing radiation. *Cell Prolif*. 2004 Oct;37(5):337-49.
- Laval L, Leveque P, Jecko B. A new *in vitro* exposure device for the mobile frequency of 900 MHz. *Bioelectromagnetics*. 2000 May;21(4):255-63.
-

-
- Leblanc V, May P. Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. *Médecine et Sciences*. 2002; 18 : 577-84.
- Lee SH, Kim CH. DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint. *Mol Cells*. 2002 Apr 30;13(2):159-66. Review.
- Lee S, Johnson D, Dunbar K, Dong H, Ge X, Kim YC, Wing C, Jayathilaka N, Emmanuel N, Zhou CQ, Gerber HL, Tseng CC, Wang SM. 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. *FEBS Lett*. 2005 Aug 29;579(21):4829-36.
- Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J Biol Chem*. 2007 Sep 21;282(38):28036-44.
- Lees-Miller SP, Sakaguchi K, Ullrich SJ, Appella E, Anderson CW. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol*. 1992 Nov;12(11):5041-9.
- Lerchl A. Comments on "Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1,950 MHz) induce genotoxic effects *in vitro* in human fibroblasts but not in lymphocytes" by Schwarz *et al.* (*Int Arch Occup Environ Health* 2008; doi: 10.1007/s00420-008-0305-5). *Int Arch Occup Environ Health*. 2009 Jan;82(2):275-8.
- Lerchl A, Wilhelm AF. Critical comments on DNA breakage by mobile-phone electromagnetic fields [Diem *et al.*, *Mutat. Res.* 583 (2005) 178-183]. *Mutat Res*. 2010 Mar 29;697(1-2):60-5.
- Léveillard T, Andera L, Bissonnette N, Schaeffer L, Bracco L, Egly JM, Wasyluk B. Functional interactions between p53 and the TFIID complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO J*. 1996 Apr 1;15(7):1615-24.
- Li L, Bisht KS, LaGroye I, Zhang P, Straube WL, Moros EG, Roti Roti JL. Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed *in vitro* to radiofrequency fields at SARs of 3-5 W/kg. *Radiat Res*. 2001 Sep;156(3):328-32.
- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):613-7.
- Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, Xu Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*. 2005 Feb;7(2):165-71.
- Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1897-905. Review.
- Liu B, Cheng Y, Bian HJ, Bao JK. Molecular mechanisms of Polygonatum cyrtoneura lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. *Autophagy*. 2009 Feb;5(2):253-5.
- Lixia S, Yao K, Kaijun W, Deqiang L, Huajun H, Xiangwei G, Baohong W, Wei Z, Jianling L, Wei W. Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. *Mutat Res*. 2006 Dec 1;602(1-2):135-42.
-

-
- Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)*. 2004A Aug-Sep;3(8-9):997-1007. Review.
- Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J*. 2004B Jul 7;23(13):2674-83.
- Luukkonen J, Hakulinen P, Mäki-Paakkanen J, Juutilainen J, Naarala J. Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872 MHz radiofrequency radiation. *Mutat Res*. 2009 Mar 9;662(1-2):54-8.
- McGowan CH. Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *Bioessays*. 2002 Jun;24(6):502-11. Review
- McNamee JP, Bellier PV, Gajda GB, Miller SM, Lemay EP, Lavallée BF, Marro L, Thansandote A. DNA damage and micronucleus induction in human leukocytes after acute *in vitro* exposure to a 1.9 GHz continuous-wave radiofrequency field. *Radiat Res*. 2002A Oct;158(4):523-33.
- McNamee JP, Bellier PV, Gajda GB, Lavallée BF, Lemay EP, Marro L, Thansandote A. DNA damage in human leukocytes after acute *in vitro* exposure to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat Res*. 2002B Oct;158(4):534-7.
- McNamee JP, Bellier PV, Gajda GB, Lavallée BF, Marro L, Lemay E, Thansandote A. No evidence for genotoxic effects from 24 h exposure of human leukocytes to 1.9 GHz radiofrequency fields. *Radiat Res*. 2003 May;159(5):693-7.
- Maes A, Collier M, Slaets D, Verschaeve L. Cytogenetic effects of microwaves from mobile communication frequencies (954 MHz). *Electro- and magnetobiology*, 1998 14(2), 91-98. Article non référencé dans PubMed.
- Maes A, Collier M, Slaets D, Verschaeve L. 954 MHz microwaves enhance the mutagenic properties of mitomycin C. *Environ Mol Mutagen*. 1996;28(1):26-30.
- Maes A, Collier M, Van Gorp U, Vandoninck S, Verschaeve L. Cytogenetic effects of 935.2-MHz (GSM) microwaves alone and in combination with mitomycin C. *Mutat Res*. 1997 Sep 18;393(1-2):151-6.
- Maes A, Collier M, Verschaeve L. Cytogenetic effects of 900 MHz (GSM) microwaves on human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 2001 Feb;22(2):91-6.
- Maes A, Van Gorp U, Verschaeve L. Cytogenetic investigation of subjects professionally exposed to radiofrequency radiation. *Mutagenesis*. 2006 Mar;21(2):139-42.
- Malyapa RS, Ahern EW, Straube WL, Moros EG, Pickard WF, Roti Roti JL. Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation. *Radiat Res*. 1997A Dec;148(6):608-17.
-

-
- Malyapa RS, Ahern EW, Straube WL, Moros EG, Pickard WF, Roti Roti JL. Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz). *Radiat Res.* 1997B Dec;148(6):618-27.
- Malyapa RS, Ahern EW, Bi C, Straube WL, LaRegina M, Pickard WF, Roti Roti JL. DNA damage in rat brain cells after *in vivo* exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. *Radiat Res.* 1998 Jun;149(6):637-45.
- Manti L, Braselmann H, Calabrese ML, Massa R, Pugliese M, Scampoli P, Sicignano G, Grossi G. Effects of modulated microwave radiation at cellular telephone frequency (1.95 GHz) on X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes *in vitro*. *Radiat Res.* 2008 May;169(5):575-83.
- Markovà E, Hillert L, Malmgren L, Persson BR, Belyaev IY. Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and gamma-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Environ Health Perspect.* 2005 Sep;113(9):1172-7.
- Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 1997 Oct;17(10):6087-96.
- Mashevich M, Folkman D, Kesar A, Barbul A, Korenstein R, Jerby E, Avivi L. Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. *Bioelectromagnetics.* 2003 Feb;24(2):82-90.
- Mattson MP. Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms. *Brain Pathol.* 2000 Apr;10(2):300-12. Review.
- Mazor R, Korenstein-Ilan A, Barbul A, Eshet Y, Shahadi A, Jerby E, Korenstein R. Increased levels of numerical chromosome aberrations after *in vitro* exposure of human peripheral blood lymphocytes to radiofrequency electromagnetic fields for 72 hours. *Radiat Res.* 2008 Jan;169(1):28-37.
- May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7621-36. Review. Erratum in: *Oncogene* 2000 Mar 23;19(13):1734.
- Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 2001 May 1;15(9):1067-77.
- Merola P, Marino C, Lovisolo GA, Pinto R, Laconi C, Negroni A. Proliferation and apoptosis in a neuroblastoma cell line exposed to 900 MHz modulated radiofrequency field. *Bioelectromagnetics.* 2006 Apr;27(3):164-71.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003 Mar;11(3):577-90.
- Mitelman F. *Catalog of Chromosomes Aberrations in Cancer.* New York:Wiley-Liss,; 1995.
-

-
- Moquet J, Ainsbury E, Bouffler S, Lloyd D. Exposure to low level GSM 935 MHz radiofrequency fields does not induce apoptosis in proliferating or differentiated murine neuroblastoma cells. *Radiat Prot Dosimetry*. 2008;131(3):287-96.
- Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Sep;9(9):702-12.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, *et al*. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):37-43.
- Nikolova T, Czyz J, Rolletschek A, Blyszczuk P, Fuchs J, Jovtchev G, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB J*. 2005 Oct;19(12):1686-8.
- Nylund R, Leszczynski D. 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*. 2006 Sep;6(17):4769-80.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*. 2000 Sep 15;102(6):849-62.
- Oktem F, Ozguner F, Mollaoglu H, Koyu A, Uz E. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin. *Arch Med Res*. 2005 Jul-Aug;36(4):350-5.
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, *et al*. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*. 1995 Jun;15(6):3032-40.
- Ozguner F, Altinbas A, Ozaydin M, Dogan A, Vural H, Kisioglu AN, Cesur G, Yildirim NG. Mobile phone-induced myocardial oxidative stress: protection by a novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health*. 2005 Oct;21(9):223-30.
- Palumbo R, Brescia F, Capasso D, Sannino A, Sarti M, Capri M, Grassilli E, Scarfi MR. Exposure to 900 MHz radiofrequency radiation induces caspase 3 activation in proliferating human lymphocytes. *Radiat Res*. 2008 Sep;170(3):327-34.
- Paparini A, Rossi P, Gianfranceschi G, Brugaletta V, Falsaperla R, De Luca P, Romano Spica V. No evidence of major transcriptional changes in the brain of mice exposed to 1800 MHz GSM signal. *Bioelectromagnetics*. 2008 May;29(4):312-23.
- Paull TT, Gellert M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev*. 1999 May 15;13(10):1276-88.
-

-
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 2000 Jul 27-Aug 10;10(15):886-95.
- Paulraj R, Behari J. Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. *Mutat Res*. 2006 Apr 11;596(1-2):76-80.
- Phillips JL, Ivaschuk O, Ishida-Jones T, Jones RA, Campbell-Beachler M, Haggren W. DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields *in vitro*. *Bioelectrochemistry and bioenergetics* 1998; 45: 103-110. Article non référencé dans PubMed.
- Price BD, Hughes-Davies L, Park SJ. Cdk2 kinase phosphorylates serine 315 of human p53 *in vitro*. *Oncogene*. 1995 Jul 6;11(1):73-80.
- Qian XW, Luo WH, Zheng OX. Joint effects of microwave and chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Mar;7(3):221-7.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1809-20.
- Qutob SS, Chauhan V, Bellier PV, Yauk CL, Douglas GR, Berndt L, Williams A, Gajda GB, Lemay E, Thansandote A, McNamee JP. Microarray gene expression profiling of a human glioblastoma cell line exposed *in vitro* to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat Res*. 2006 Jun;165(6):636-44.
- Remondini D, Nylund R, Reivinen J, Poullietier de Gannes F, Veyret B, Lagroye I, Haro E, Trillo MA, Capri M, Franceschi C, Schlatterer K, Gminski R, Fitzner R, Tauber R, Schuderer J, Kuster N, Leszczynski D, Bersani F, Maercker C. Gene expression changes in human cells after exposure to mobile phone microwaves. *Proteomics*. 2006 Sep;6(17):4745-54.
- Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell*. 2004 Dec 3;16(5):715-24.
- Richard D, Lange S, Viergutz T, Kriehuber R, Weiss DG, Myrtill S. Influence of 50 Hz electromagnetic fields in combination with a tumour promoting phorbol ester on protein kinase C and cell cycle in human cells. *Mol Cell Biochem*. 2002 Mar;232(1-2):133-41.
- Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*. 1998 Mar 5;16(9):1113-23.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*. 2000 Nov;20(22):8458-67.
-

-
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998 Mar 6;273(10):5858-68.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol.* 1999 Sep 6;146(5):905-16.
- Rohaly G, Chemnitz J, Dehde S, Nunez AM, Heukeshoven J, Deppert W, Dornreiter I. A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell.* 2005 Jul 15;122(1):21-32.
- Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G. High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m⁻¹) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. *Planta.* 2008 Mar;227(4):883-91.
- Rüdiger HW. Answer to comments by A. Lerchl on "Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1,950 MHz) induce genotoxic effects *in vitro* in human fibroblasts but not in lymphocytes" published by C. Schwarz *et al.* 2008. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009A Jan;82(2):279-83.
- Rüdiger HW. Letter to the editor: doubts raised about the blinding process do not apply to the Diem *et al.* paper. *Mutat Res.* 2009B Feb 19;673(1):2.
- Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, Xie D. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry.* 1997A Aug 19;36(33):10117-24.
- Sakaguchi K, Sakamoto H, Xie D, Erickson JW, Lewis MS, Anderson CW, Appella E. Effect of phosphorylation on tetramerization of the tumor suppressor protein p53. *J Protein Chem.* 1997B Jul;16(5):553-6.
- Sakamuro S, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* 1997 Aug 18;15(8):887-98.
- Sakuma N, Komatsubara Y, Takeda H, Hirose H, Sekijima M, Nojima T, Miyakoshi J. DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations. *Bioelectromagnetics.* 2006 Jan;27(1):51-7.
- Sannino A, Sarti M, Reddy SB, Prihoda TJ, Vijayalaxmi, Scarfi MR. Induction of adaptive response in human blood lymphocytes exposed to radiofrequency radiation. *Radiat Res.* 2009A Jun;171(6):735-42.
- Sannino A, Di Costanzo G, Brescia F, Sarti M, Zeni O, Juutilainen J, Scarfi MR. Human fibroblasts and 900 MHz radiofrequency radiation: evaluation of DNA damage after exposure and co-exposure to 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5h)-furanone (MX). *Radiat Res.* 2009B Jun;171(6):743-51.
- Scarfi MR, Fresegna AM, Villani P, Pinto R, Marino C, Sarti M, Altavista P, Sannino A, Lovisolò GA. 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.* 2006 Jun;165(6):655-63.
- Schlissel MS. Does artemis end the hunt for the hairpin-opening activity in V(D)J recombination? *Cell.* 2002 Apr 5;109(1):1-4.
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell.* 2002 May 3;109(3):335-46.
- Schwarz C, Kratochvil E, Pilger A, Kuster N, Adlkofer F, Rüdiger HW. Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1,950 MHz) induce genotoxic effects *in vitro* in human fibroblasts but not in lymphocytes. *Int Arch Occup Environ Health.* 2008 May;81(6):755-67.
- Sekijima M, Takeda H, Yasunaga K, Sakuma N, Hirose H, Nojima T, Miyakoshi J. 2-GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields have no significant effect on cell proliferation and gene expression profile in human cells. *J Radiat Res (Tokyo).* 2010;51(3):277-84.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Jan;31(1):27-36.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A, Rotter V. Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):8982-6.
- Shechter D, Costanzo V, Gautier J. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst).* 2004 Aug-Sep;3(8-9):901-8. Review.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.
- Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 2000 Feb 1;14(3):289-300.
- Shimodaira H, Yoshioka-Yamashita A, Kolodner RD, Wang JY. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2420-5.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988 Mar;175(1):184-91.
- Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 1999 Apr 15;13(8):916-34. Review.
- Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science.* 1991 Nov 22;254(5035):1153-60. Review.

-
- Speit G, Schütz P, Hoffmann H. Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat Res.* 2007 Jan 10;626(1-2):42-7.
- Stavridi ES, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. Substitutions that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the ability of p53 to induce cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7030-3.
- Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature.* 2003 Feb 27;421(6926):961-6.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2004 Apr 1;64(7):2390-6.
- Stronati L, Testa A, Moquet J, Edwards A, Cordelli E, Villani P, Marino C, Fresegna AM, Appolloni M, Lloyd D. 935 MHz cellular phone radiation. An *in vitro* study of genotoxicity in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 2006 May;82(5):339-46.
- Stucki M, Pascucci B, Parlanti E, Fortini P, Wilson SH, Hübscher U, Dogliotti E. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene.* 1998 Aug 20;17(7):835-43.
- Sykes PJ, McCallum BD, Bangay MJ, Hooker AM, Morley AA. Effect of exposure to 900 MHz radiofrequency radiation on intrachromosomal recombination in pKZ1 mice. *Radiat Res.* 2001 Nov;156(5 Pt 1):495-502.
- Teyssier JR, Bartram CR, Deville J, Potron G, Pigeon F. c-abl Oncogene and chromosome 22 "bcr" juxtaposition in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 1985 May 23;312(21):1393-4.
- Tice RR, Hook GG, Donner M, McRee DI, Guy AW. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics.* 2002 Feb;23(2):113-26.
- Tiwari R, Lakshmi NK, Surender V, Rajesh AD, Bhargava SC, Ahuja YR. Combinative exposure effect of radio frequency signals from CDMA mobile phones and aphidicolin on DNA integrity. *Electromagn Biol Med.* 2008;27(4):418-25.
- Trosic I, Busljeta I, Kasuba V, Rozgaj R. Micronucleus induction after whole-body microwave irradiation of rats. *Mutat Res.* 2002 Nov 26;521(1-2):73-9.
- Trosic I, Busljeta I, Modlic B. Investigation of the genotoxic effect of microwave irradiation in rat bone marrow cells: *in vivo* exposure. *Mutagenesis.* 2004 Sep;19(5):361-4.
- Valbonesi P, Franzellitti S, Piano A, Contin A, Biondi C, Fabbri E. Evaluation of HSP70 expression and DNA damage in cells of a human trophoblast cell line exposed to 1.8 GHz amplitude-modulated radiofrequency fields. *Radiat Res.* 2008 Mar;169(3):270-9.
- Verschaeve L, Heikkinen P, Verheyen G, Van Gorp U, Boonen F, Vander Plaetse F, Maes A, Kumlin T, Mäki-Paakkanen J, Puranen L, Juutilainen J. Investigation of co-genotoxic
-

-
- effects of radiofrequency electromagnetic fields *in vivo*. Radiat Res. 2006 May;165(5):598-607.
- Vijayalaxmi, Frei MR, Dusch SJ, Guel V, Meltz ML, Jauchem JR. Frequency of micronuclei in the peripheral blood and bone marrow of cancer-prone mice chronically exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. Radiat Res. 1997A; 147:495-500. Article non référencé dans PubMed.
- Vijayalaxmi, Mohan N, Meltz ML, Wittler MA. Proliferation and cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to 2450 MHz radiofrequency radiation. Int J Radiat Biol. 1997B Dec;72(6):751-7.
- Vijayalaxmi, Seaman RL, Belt ML, Doyle JM, Mathur SP, Prihoda TJ. Frequency of micronuclei in the blood and bone marrow cells of mice exposed to ultra-wideband electromagnetic radiation. Int J Radiat Biol. 1999 Jan;75(1):115-20.
- Vijayalaxmi, Leal BZ, Szilagyi M, Prihoda TJ, Meltz ML. Primary DNA damage in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to 2450 MHz radiofrequency radiation. Radiat Res. 2000 Apr;153(4):479-86.
- Vijayalaxmi, Pickard WF, Bisht KS, Leal BZ, Meltz ML, Roti Roti JL, Straube WL, Moros EG. (Ordre des auteurs dans PubMed : Vijayalaxmi, Leal BZ, Meltz ML, Pickard WF, Bisht KS, Roti Roti JL, Straube WL, Moros EG.). Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835.62 MHz, FDMA). Radiat Res. 2001A Jan;155(1 Pt 1):113-21.
- Vijayalaxmi, Pickard WF, Bisht KS, Prihoda TJ, Meltz ML, LaRegina MC, Roti Roti JL, Straube WL, Moros EG. Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells of rats exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. Int J Radiat Biol. 2001B Nov;77(11):1109-15.
- Vijayalaxmi, Bisht KS, Pickard WF, Meltz ML, Roti Roti JL, Moros EG. Chromosome damage and micronucleus formation in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (847.74 MHz, CDMA). Radiat Res. 2001C Oct;156(4):430-2.
- Vijayalaxmi, Sasser LB, Morris JE, Wilson BW, Anderson LE. Genotoxic potential of 1.6 GHz wireless communication signal: *in vivo* two-year bioassay. Radiat Res. 2003 Apr;159(4):558-64.
- Vijayalaxmi, McNamee JP, Scarfi MR. 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. 2006 Jan 31;603(1):104-6; author reply 107-9.
- Vijayalaxmi. Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to 2.45 GHz or 8.2 GHz radiofrequency radiation. Radiat Res. 2006 Sep;166(3):532-8.
- Wahl GM, Carr AM. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. Nat Cell Biol. 2001 Dec;3(12):E277-86. Review. Erratum in: Nat Cell Biol 2002 Apr;4(4):328.
-

-
- Wahrman J, Voss R, Shapiro T, Ashkenazi A. The Philadelphia chromosome in two children with chronic myeloid leukemia. *Isr J Med Sci.* 1967 May-Jun;3(3):380-91.
- Ward IM, Minn K, Jorda KG, Chen J. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):19579-82.
- Whitehead TD, Moros EG, Brownstein BH, Roti Roti JL. Gene expression does not change significantly in C3H 10T(1/2) cells after exposure to 847.74 CDMA or 835.62 FDMA radiofrequency radiation. *Radiat Res.* 2006 Jun;165(6):626-35.
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 1998 Mar 15;12(6):806-19.
- Xu B, O'Donnell AH, Kim ST, Kastan MB. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4588-91.
- Yadav AS, Sharma MK. Increased frequency of micronucleated exfoliated cells among humans exposed *in vivo* to mobile telephone radiations. *Mutat Res.* 2008 Feb 29;650(2):175-80.
- Yao K, Wu W, Wang K, Ni S, Ye P, Yu Y, Ye J, Sun L. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. *Mol Vis.* 2008 May 19;14:964-9.
- Yao K, Wu W, Yu Y, Zeng Q, He J, Lu D, Wang K. Effect of superposed electromagnetic noise on DNA damage of lens epithelial cells induced by microwave radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 May;49(5):2009-15. Retraction in: *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Oct;50(10):4530.
- Zeng Q, Chen G, Weng Y, Wang L, Chiang H, Lu D, Xu Z. Effects of global system for mobile communications 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on gene and protein expression in MCF-7 cells. *Proteomics.* 2006 Sep;6(17):4732-8.
- Zeni O, Chiavoni AS, Sannino A, Antolini A, Forigo D, Bersani F, Scarfi MR. Lack of genotoxic effects (micronucleus induction) in human lymphocytes exposed *in vitro* to 900 MHz electromagnetic fields. *Radiat Res.* 2003 Aug;160(2):152-8.
- Zeni O, Romanò M, Perrotta A, Lioi MB, Barbieri R, d'Ambrosio G, Massa R, Scarfi MR. Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute *in vitro* exposure to 900 MHz radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics.* 2005 May;26(4):258-65.
- Zeni O, Schiavoni A, Perrotta A, Forigo D, Deplano M, Scarfi MR. Evaluation of genotoxic effects in human leukocytes after *in vitro* exposure to 1950 MHz UMTS radiofrequency field. *Bioelectromagnetics.* 2008 Apr;29(3):177-84.
-

-
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*. 1999 May 6;18(18):2892-900.
- Zhang Y, Xiong Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*. 2001 Jun 8;292(5523):1910-5.
- Zhang MB, He JL, Jin LF, Lu DQ. Study of low-intensity 2450-MHz microwave exposure enhancing the genotoxic effects of mitomycin C using micronucleus test and comet assay *in vitro*. *Biomed Environ Sci*. 2002 Dec;15(4):283-90.
- Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001 Jul;21(13):4129-39.
- Zhao TY, Zou SP, Knapp PE. Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. *Neurosci Lett*. 2007A Jan 22;412(1):34-8.
- Zhao R, Zhang S, Xu Z, Ju L, Lu D, Yao G. Studying gene expression profile of rat neuron exposed to 1800MHz radiofrequency electromagnetic fields with cDNA microassay. *Toxicology*. 2007B Jun 25;235(3):167-75.
- Zhijian C, Xiaoxue L, Yezhen L, Deqiang L, Shijie C, Lifen J, Jianlin L, Jiliang H. Influence of 1.8-GHz (GSM) radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by X-rays in human leukocytes *in vitro*. *Mutat Res*. 2009 Jun-Jul;677(1-2):100-4.
- Zhijian C, Xiaoxue L, Yezhen L, Shijie C, Lifen J, Jianlin L, Deqiang L, Jiliang H. Impact of 1.8-GHz radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by doxorubicin in human B-cell lymphoblastoid cells. *Mutat Res*. 2010 Jan;695(1-2):16-21.
- Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J*. 2001 Feb 15;20(4):914-23.
- Zotti-Martelli L, Peccatori M, Scarpato R, Migliore L. Induction of micronuclei in human lymphocytes exposed *in vitro* to microwave radiation. *Mutat Res*. 2000 Dec 20;472(1-2):51-8.
- Zotti-Martelli L, Peccatori M, Maggini V, Ballardini M, Barale R. Individual responsiveness to induction of micronuclei in human lymphocytes after exposure *in vitro* to 1800-MHz microwave radiation. *Mutat Res*. 2005 Apr 4;582(1-2):42-52.

ANNEXE 1 – SYNTHÈSE GENETOXICITÉ DES RF - 1995/2010

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm ²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse classique	Autres méthodes d'analyse	Effets génotoxiques significatifs
Lai et Singh	1995	Rats	8 rats	<i>In vivo</i>	2450	PW - CW	0,6 - 1,2		2			0 - 4	Cellules nerveuses : hippocampe + cerveau ou tout le cerveau	Comet		OUI - NON
Maes, Collier, Slaetz (NR)	1995	Sang	8 donneurs humains	<i>In vitro</i>	954	GSM	1,5		2				Lymphocytes	CA		OUI
Lai et Singh (NR)	1996	cerveaux de rats	8 rats	<i>In vivo</i>	2450	CW - PW	1,2	2	2			4	Cellules nerveuses (cortex)	Comet		OUI
Maes, Collier, Slaets	1996	Sang	8 donneurs humains	<i>In vitro</i>	954	GSM	1,5		2		Mitomycine C		Lymphocytes	SCE		OUI
Antonopoulos, Eisenbrandt et Obe (NR)	1997	Sang	15 donneurs humains	<i>In vitro</i>	380 - 900 - 1800	PW - DCS GSM	0,08 - 0,208 - 1,7		56				Lymphocytes	SCE		NON
Lai and Singh	1997	Rats	Sprague-Dawley rats	<i>In vivo</i>	2450	PW	1,2	2	2		Mélatonine - PBN	4	Cellules nerveuses cerveau	Comet		OUI - NON
Maes, Collier, Van Gorp	1997	Sang	4 à 6 donneurs humains	<i>In vitro</i>	935	GSM	0,3 à 0,4		2		Mitomycine C		Lymphocytes Leucocytes	CA - SCE - comet		OUI - NON
Malyapa, Ahern, Straube	1997A	U87MG C3H 10T1/2	LC - Glioblastome humain Fibroblastes de souris	<i>In vitro</i>	2450	CW	0,7 - 1,9		2 - 4 - 24			0 - 4	U87MG C3H 10T1/2	comet		NON
Malyapa, Ahern, Straube	1997B	U87MG C3H 10T1/2	LC - Glioblastome humain Fibroblastes de souris	<i>In vitro</i>	835 - 847	FMCW - CDMA	0,6		2 - 4 - 24		BrDU 10µM - 24h avant expo	0 - 4	U87MG C3H 10T1/2	Comet		NON
Vijayalaxmi, Frei, Dusch (NR)	1997A	Souris	62 Souris C3H/HeJ dont 12 souris avec tumeurs mammaires	<i>In vivo</i>	2450	CW	1			20 h / jour 7 J / sem 18 mois			Erythrocytes médullaires (fémur) et érythrocytes	MN		NON
Vijayalaxmi, Mohan, Meltz	1997B	Sang	2 donneurs humains	<i>In vitro</i>	2450	CW	12,46	5	1,5 - 3	Continue Intermittente : 30 min ON / 30 min OFF 3 cycles			Lymphocytes	CA/SCE - MN		NON
Malyapa, Ahern, Chen	1998	Rats	8 Rats Sprague-Dawley	<i>In vivo</i>	2450	CW	1,2	2	2			0 - 4	Cellules nerveuses (cortex cérébral et hippocame)	Comet		NON
Phillips, Ivaschuk, Ishida-Jones (NR)	1998	MOLT-4	LC - Cellules lymphoblastoïdes humaines	<i>In vitro</i>	813 - 836	iDEN TDMA	0,0024 - 0,024 - 0,0026 - 0,026		2 - 3 - 21				MOLT-4	Comet		OUI - NON
Vijayalaxmi, Seaman, Belt	1999	Souris	10 Souris CF1	<i>In vivo</i>	2000	PW (UWBR)	0,037		0,25			18 - 24	Erythrocytes médullaires (fémur) et sanguins	MN		NON

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse classique	Autres méthodes d'analyse	Effets génotoxiques significatifs
Gos, Eicher, Kohli	2000	Saccharomyces cerevisiae	Procaroyotes : S. cerevisiae	In vitro	900	PW	0,13 - 1,3		1 - 36		MMS : Méthylméthane sulfonate		Saccharomyces cerevisiae		Mutagénèse	NON
Vijayalaxmi, Leal, Szilagyi	2000	Sang	3 donneurs humains	In vitro	2450	PW	2,135	5	2			0 - 4	Leucocytes	Comet		OUI - NON
Zotti-Martelli, Peccatori, Scarpato	2000	Sang	2 donneurs humains	In vitro	2450	CW		10 - 20 - 30	0,25 - 0,5 - 1				Lymphocytes	MN		OUI - NON
Li, Bisht, Lagroye	2001	C3H 10T1/2	LC- Fibroblastes de souris	In vitro	847 - 835	CDMA FDMA		3,2 - 4,9 - 5,1	2 - 4 - 24			0 - 4	C3H 10T1/2	Comet		NON
Maes, Collier, Verschaeve	2001	Sang	4 donneurs humains	In vitro	900	CW - GSM - PW	0,4 - 2 - 3,5 - 5,5 - 10		2	Continuous - GSM - Stand by	Rayon X 1Gy Mitomycine C		Lymphocytes	CA - SCE		NON
Sykes, McCallum, Bangay	2001	Souris	10 à 20 souris transgéniques pKZ1	In vivo	900	PW	4			0,5/j 0,5x5/j 0,5/jpdt 5 sem			Rates des souris pKZ1		Recombinaisons intra-chromosomiques	NON
Vijayalaxmi, Pickard, Bisht	2001A	Sang	4 donneurs humains	In vitro	835	FDMA	4,4 - 5		24				Lymphocytes	CA - MN		NON
Vijayalaxmi, Pickard, Bisht	2001B	Rats	8 Rats Sprague-Dawley	In vivo	2450	CW	12	20	24				Erythrocytes sanguins et médullaires (fémur)	MN		NON
Vijayalaxmi, Bisht, Pickard	2001C	Sang	5 donneurs humains	In vitro	847	CDMA	4,9 - 5,5		24				Lymphocytes	CA - MN		NON
d'Ambrosio, Massa, Scarfi	2002	Sang	9 donneurs humains	In vitro	1748	CW - GMSK	2,25		0,25				Lymphocytes	MN		OUI - NON
Bisht, Moros, Straube	2002	C3H 10T1/2	LC- Fibroblastes de souris	In vitro	835 - 847	FDMA CDMA	3,2 - 4,8 - 5,1		3 - 8 - 16 - 24			0 - 18	C3H 10T1/2	MN		NON
McNamee, Bellier, Gajda, Miller	2002A	Sang	5 donneurs humains	In vitro	1900	CW	0,1 - 0,26 - 0,92 - 2,4 - 10		2				Leucocytes Lymphocytes	Comet - MN		NON
McNamee, Bellier, Gajda, Lavallée	2002B	Sang	5 donneurs humains	In vitro	1900	PW	0,1 - 0,26 - 0,92 - 2,4 - 10		2				Leucocytes Lymphocytes	Comet - MN		NON
Tice, Hook, Donner	2002	Sang	2 donneurs humains	In vitro	837 - 1909	analog - CDMA - TDMA - GSM	1 - 2,5 - 5 - 10 - 1,6 - 2,9		3 - 24				Leucocytes Lymphocytes	Comet - MN		OUI - NON
Trosic, Busljeta, Kasuba	2002	Rats	10 Rats Wistar	In vivo	2450	CW	1 à 2	5 à 10		2h x 2j - 8j - 15j - 30j			Erythrocytes sanguins	MN		OUI - NON
Zhang, He, Jin	2002	Sang	2 donneurs humains	In vitro	2450	CW?		5	2		Mitomycine C		Leucocytes Lymphocytes	Comet - MN		OUI - NON
Koyama, Nakahara, Wake	2003	CHO-K1	LC- Cellules ovariennes d'hamster chinois	In vitro	2450	CW	13 - 25 - 39 - 50 - 78 - 100		18		Bléomycine 1h		CHO-K1	MN		OUI - NON
McNamee, Bellier, Gajda	2003	Sang	5 donneurs humains	In vitro	1900	CW - PW	0,1 - 0,26 - 0,92 - 2,4 - 10		24				Leucocytes Lymphocytes	Comet - MN		NON

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm ²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse classique	Autres méthodes d'analyse	Effets génotoxiques significatifs
Mashevich, Folkman, Kesar	2003	Sang	5 donneurs humains	<i>In vitro</i>	830	CW	2 - 2,9 - 4,3 - 8,2		72				Lymphocytes		FISH (CEP)	OUI - NON
Vijayalaxmi, Sasser, Morris	2003	Rattes gestantes et nouveaux nés	Rats Fisher	<i>In vivo</i>	1600	Iridium wireless	0,16 - 1,6			Gestation : 2h/j et 7 j/sem Nx Nés : 2h/j, 5j/sem pdt 2 ans			Erythrocytes médullaires	MN		NON
Zeni, Chiavoni, Sannino	2003	Sang	6 à 7 donneurs humains	<i>In vitro</i>	900	CW - GSM	0,2 - 1,6		3 - 24 - 44	Intermittentes : 8 ou 14 cycles de 6 min ON / 3 h OFF 1 h x 3j			Lymphocytes	MN		NON
Bulsjeta, Trosic, Milkovic -kraus	2004	Rats	40 Rats Wistar	<i>In vivo</i>	2450	CW	1 à 2	5 à 10		2 h / jour 2j - 8j -15j -30j			Erythrocytes médullaires (fémur)	MN		OUI - NON
Hook, Zhang, Lagroye	2004	MOLT-4	LC - Cellules lymphoblastoïdes T humaines	<i>In vitro</i>	813 - 835 - 836 - 847	iDEN - FDMA - TDMA - CDMA	3,2 - 0,0024 - 0,024 - 0,0026 - 0,026		2 - 3 - 21 - 24				MOLT-4	Comet		NON
Koyama, Isozumi, Suzuki	2004	CHO-K1	LC- Cellules ovariennes d'hamster chinois	<i>In vitro</i>	2450	CW?	5 - 10 - 20 - 50 - 100 - 200		2		Bléomycine		CHO-K1	MN		OUI - NON
Lagroye, Hook, Wettring	2004A	C3H 10T1/2	LC- Fibroblastes de souris	<i>In vitro</i>	2450	CW	1,9		2		Rayons gamma (4Gy)		C3H 10T1/2	Comet		NON
Lagroye, Anane, Wettring	2004B	Rats	11 rats Sprague-Dawley	<i>In vivo</i>	2450	PW	1,2	2	2			4	Cellules nerveuses (cerveau)	Comet		NON
Trosic, Busljeta, Modlic	2004	Rats	40 rats Wistars	<i>In vivo</i>	2450	CW	1,25	5 à 10		2 h / jour 2j - 8j -15j -30j			Erythrocytes médullaires (fémur)	MN		OUI - NON
Aitken, Bennetts, Sawyer	2005	Souris	5 souris males CD1 Swiss	<i>In vivo</i>	900	GSM	0,09			12h/J 7 jours			Spermatozoïdes		PFGE AGE QPCR	OUI - NON
Baohong, Jiliang, Lifen	2005	Sang	1 donneur humain	<i>In vitro</i>	1800	DCS	3		2		Mitomycine 4NQO Bléomycine méthyl méthane-sulfonate	0 - 21	Leucocytes	Comet		OUI - NON
Belyaev, Hillert, Protopopova	2005	Sang	7 donneurs humains 7 sujets hypersensibles	<i>In vitro</i>	905 915	GSM	0,037		2			0 - 2	Lymphocytes (Ficoll)		AVDT 53BP1 (IF)	OUI - NON
Chang, Choi, Gil	2005	Salmonella typhimurium Escherichia coli	Procaryotes - S. typhimurium et E. coli	<i>In vitro</i>	835	CDMA	4		48		4NQO Cumén hydroxyde sodium azide 9 amino acridine		Salmonella typhimurium Escherichia coli		Mutagenèse (test d'Ames)	OUI - NON

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm ²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse classique	Autres méthodes d'analyse	Effets génotoxiques significatifs
Diem, Schwarz, Adlkofer	2005	ES1 GFSH-R17	Cl - Fibroblastes humains primaires 6 donneurs Cellules transformées de la granulosa de rats	<i>In vitro</i>	1800	CW - GSM	1,2 - 2		4 - 16 - 24	Continue Intermittente : 5 min ON / 10 min OFF			ES1 GFSH-R17	Comet		OUI - NON
Gorlitz, Muller, Ebert	2005	Souris	65 Souris B6C3F1	<i>In vivo</i>	902 - 1747	GSM (MW) DCS	3,7 - 11 - 33,2 - 2,7 - 8,2 - 24,9			2 h / jour 5 J / sem 1 sem ou 6 sem			Erythrocytes médullaires (fémur) Kératinocytes Lymphocytes spléniques	MN		NON
Komatsubara, Hirose, Sakurai	2005	m5S	LC - Cellules de peau d'embryon de souris	<i>In vitro</i>	2450	CW - PW	5 - 10 - 20 - 50 - 100		2			24	m5S	CA		NON
Markova, Hillert, Malmgren	2005	Sang	5 donneurs humains 5 sujets hypersensibles	<i>In vitro</i>	905 915	GSM	0,037		1				Lymphocytes (Ficoll)		AVDT 53BP1 (IF) H2AX (IF)	OUI - NON
Nikolova, Czyz, Rolletschek	2005	ES R1	Cl - Progéniteurs de cellules nerveuses de souris (dérivés de cellules souches)	<i>In vitro</i>	1710	GSM	1,5		6 - 48	Intermittente : 5 min ON / 30 min OFF		0 - 18	ES R1	Comet - CA - SCE		OUI - NON
Zeni, Romano, Perrotta	2005	Sang	5 donneurs humains	<i>In vitro</i>	900	GSM	0,3 - 1		2				Leucocytes Lymphocytes	Comet - CA - SCE		NON
Zotti-Martelli, Peccatori, Maggini	2005	Sang	9 donneurs humains	<i>In vitro</i>	1800	CW		5 - 10 - 20	1 - 2 - 3				Lymphocytes	MN		OUI
Belyaev, Koch, Terenius	2006	Rats	8 rats Fisher (males)	<i>In vivo</i>	915	GSM	0,4		2				Cerveaux de rats (substances blanches et grises) Rates et thymus		AVDT PFGE	NON
Ferreira, Knakievicz, Pasquali	2006	Rats	10 rattes gestantes	<i>In vivo</i>	834	UHF-EMF	0,55 à 1,23	0,2 à 0,4		8,5h / J pendant la grossesse			Erythrocytes sanguins (nouveaux nés)	MN		OUI
Lixia, Yao, Kaijun	2006	hLEC (SRA 01/04)	LC - cellules épithéliales oculaires humaines	<i>In vitro</i>	1800	GSM	1 - 2 - 3		2			0 - 0,5 - 1 - 2 - 4	hLEC (SRA 01/04)	Comet		OUI - NON
Paulraj et Behari	2006	Cerveaux de rats	6 Rats Wistar (males)	<i>In vivo</i>	2450	CW - FM	1 - 2,01	0,344 - 1		2 h / jour 35 jours			Cerveaux de rats	Comet		OUI
Sakuma, Komatsubara, Takeda	2006	A172 IMR-90	LC - Cellules de glioblastome humain Fibroblastes de poumon foetal humain	<i>In vitro</i>	2142	CW CDMA	0,08 - 0,25 - 0,8		2 - 24				A172 IMR-90	Comet		NON
Scarfi, Fresegna, Villani	2006	Sang	10 donneurs humains	<i>In vitro</i>	900	GSM	1 - 5 - 10		24				Lymphocytes	MN		NON
Stronati, Testa, Moquet	2006	Sang	14 donneurs humains	<i>In vitro</i>	935	GSM	1 - 2		24		Rayons X 1Gy		Leucocytes Lymphocytes	Comet CA - SCE - MN		NON

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm ²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse classique	Autres méthodes d'analyse	Effets génotoxiques significatifs
Verschaeve, Heikkinen, Verheyen	2006	Rats	Rats Wistar	<i>In vivo</i>	900	GSM	0,3 - 0,9			2 h / jour 5 J / sem 3, 6 ou 24 mois	MX : 3 chloro-4 (dichlorométhyl)5 hydroxy 2(5H) furanone		Leucocytes sanguins Erythrocytes sanguins Hépatocytes Cellules nerveuses	comet - MN		NON
Vijayalaxmi	2006	Sang	2 donneurs humains	<i>In vitro</i>	2450	PW	2,13	5	2				Lymphocytes	SCE / CA - MN		NON
Baohong, Lifen, Lanjuan	2007	Sang	3 donneurs humains	<i>In vitro</i>	1800	DCS	3		1,5 - 4		UVC		Leucocytes	comet		OUI - NON
Juutilainen, Heikkinen, Soikkeli	2007	Souris	20 Souris CBA/S 10 souris transgéniques ODC	<i>In vivo</i>	902,5 849	CW PW (DAMPS) GSM	0,35 - 0,5 - 1,5			1,5 h / jour 5 J / sem 52 ou 78 sem	Rayons X UV		Erythrocytes sanguins	MN		NON
Kim, Hong, Lee	2008	L5178Y Tk ^{+/+}	LC - Cellules de lymphome murin (souris)	<i>In vitro</i>	835	CDMA	4		24 - 48		CPA - 4NQO - EMS		L5178Y Tk ^{+/+}	Comet - CA		OUI - NON
Koyama, Takashima, Sakurai	2007	Salmonella typhimurium Escherichia coli CHO-K1	Procaroyotes - S. typhimurium et E. coli LC - Cellules ovariennes d'hamster chinois	<i>In vitro</i>	2450	CW	5 - 50 - 100 - 200		0,5 - 2		Bléomycine		Procaroyotes - S. typhimurium et E. coli LC - Cellules ovariennes d'hamster chinois	Mutagénèse (test d'Ames et HPRT)		OUI - NON
Speit, Schütz, Hoffman	2007	ES1 V79	Fibroblastes humains LC - Cellules d'hamster chinois	<i>In vitro</i>	1800	CW	1 - 2		1 - 4 - 18 - 22 - 24	Intermittente : 5 min ON / 10 min OFF		0 - 18	ES1 V79	Comet - MN		NON
Huang, Lee, Oh	2008	Cellules T Jurkat	LC - Cellules T Jurkat humaines	<i>In vitro</i>	1763	CDMA	10		1 - 4 - 24				Cellules T Jurkat	Comet		NON
Manti, Braselmann, Calabrese	2008	Sang	4 donneurs humains	<i>In vitro</i>	1950	UMTS	0,5 - 2		24		Rayons X 4Gy		Lymphocytes		FISH (WCP)	NON
Mazor, Korenstein-Ilan, Barbul	2008	Sang	14 donneurs humains	<i>In vitro</i>	800	CW	2,9 - 4,1		72				Lymphocytes		FISH (CEP)	OUI - NON
Schwarz, Kratochvil, Pilger	2008	Fibroblastes Sang	3 donneurs humains (ES-1, IH-9, HW-2)	<i>In vitro</i>	1950	UMTS	0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 2		4 - 8 - 12 - 16 - 20 - 24 - 48	Continue Intermittente : 5 min ON / 10 ou 20 min OFF			Fibroblastes ES-1	Comet - MN		OUI - NON
Tiwari, Lakshmi, Surender	2008	Sang	6 donneurs humains	<i>In vitro</i>	835	CDMA	1,17		1 - 2		APC		Leucocytes	Comet		OUI - NON
Valbonesi, Franzellitti, Piano	2008	HTR-8/Svneo	LC - Trophoblaste humain	<i>In vitro</i>	1800	GSM	2		1				HTR-8/Svneo	Comet		NON
Yao, Wu, Yu Yao, Wu, Wang	2008	hLEC (SRA01/04)	LC - cellules épithéliales oculaires humaines	<i>In vitro</i>	1800	GSM	1 - 2 - 3 - 4		24	Intermittente : 5 min ON / 10 min OFF	Champ magnétique		hLEC (SRA01/04)	Comet	H2AX	OUI - NON
Zeni, Schiavoni, Perrotta	2008	Sang	6 donneurs humains	<i>In vitro</i>	1950	UMTS	2,2		24 - 44 - 68	Intermittente : 6 min ON / 120 min OFF			Lymphocytes Leucocytes	MN - comet		NON
Luukkonen, Hakulinen, Mäki-Paakkanen	2009	SH-SY5Y	LC - Neuroblastome humain	<i>In vitro</i>	872	CW - GSM	5		1		Ménadione		SH-SY5Y	Comet		OUI - NON

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS moy (W/Kg)	Densité de puissance (mW/cm ²)	Durée d'exposition (heures)	Modalités d'exposition	Co-génotoxicité	Durée post-exposition (heures)	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse classique	Autres méthodes d'analyse	Effets génotoxiques significatifs
Hansteen, Clausen, Haugan	2009	Sang	4 à 6 donneurs	<i>In vitro</i>	2300	CW - PW		1	53		Mitomycine - Caféine - Hydroxyurée		Lymphocytes	CA		NON
Belyaev, Markova, Hillart	2009	Sang	5 donneurs humains 4 sujets hypersensibles	<i>In vitro</i>	905 915 1947	GSM GSM UMTS	0,037 0,037 0,04		1			0 - 24 - 72	Lymphocytes (Ficoll)		AVDT 53BP1 (IF) H2AX (IF)	OUI - NON
Sannino, Sarti, Reddy	2009A	Sang	5 donneurs humains	<i>In vitro</i>	900	GSM	1,25		20		Mitomycine C		Lymphocytes	MN		NON
Sannino, Costanzo, Brescia	2009B	Fibroblastes dermiques	1 donneur : foetus humain Sd Turner 1 donneur sain humain	<i>In vitro</i>	900	GSM	1		1 - 24		MX : 3-chloro-4-(dichlorométhyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone		Fibroblastes dermiques	MN - comet		NON
Zhijian, Xiaoxue, Yezhen	2009	Sang	4 donneurs humains	<i>In vitro</i>	1800	GSM	2		24	Intermittente : 5 min ON / 10 min OFF	Rayons X	0,25 - 0,75 - 1,5 - 2,5 - 4	Leucocytes	Comet		NON
Franzellitti, Valbonesi, Ciancaglioni	2010	HTR-8/Svneo	LC - Trophoblaste humain	<i>In vitro</i>	1800	CW - GSM	2		4 - 16 - 24	Continue Intermittente : 5 min ON / 10 min OFF		0 - 0,5 - 2	HTR-8/Svneo	Comet		OUI - NON
Zhijian, Xiaoxue, Yezhen	2010	HMy2.CIR	LC - Cellules lymphoblastoïdes B humaines	<i>In vitro</i>	1800	GSM	2		2 - 4 - 6 - 10 - 12 - 16 - 18 - 22 - 24 - 28	Intermittente : 5 min ON / 10 min OFF	Doxorubicine	0 - 2 - 6 - 8 - 12 - 14 - 18 - 20 - 24 - 26	HTR-8/Svneo	Comet		OUI - NON

ANNEXE 2 – SYNTHÈSE EXPRESSION GÉNÉRIQUE - 2005/2010

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS (W/Kg)	Durée d'exposition (heure)	Modalités d'exposition	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse expression génétique	Effets génotoxiques significatifs (OUI / NON)
Lee, Jonhson, Dunbar	2005	HL-60	Cellules humaines	<i>In vitro</i>	2450	PW	10	2 - 6		HL-60	SAGE	OUI
Belyaev, Koch, Terenius	2006	Rats	Rats	<i>In vivo</i>	915	GSM	0,4	2		Cervelet de rats	Affymetrix U34 GeneChips	OUI - NON
Guristik, Warton, Martin	2006	SK-N-SH	LC - SK-N-SH : neuroblastome	<i>In vitro</i>	900	GSM	0,2	2		U937 SK-N-SH	Affymetrix Human Focus gene array	OUI - NON
Hirose, Sakuma, Kaji	2006	A172 IMR-90	LC- A172 : lignées de glioblastome humain IMR-90 : lignée de fibroblastes humains	<i>In vitro</i>	2142	CW CDMA	0,08 0,25 0,8	24 - 28 - 48		ARN de LC A172 IMR-90	Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip	NON
Nylund et Leszczynski	2006	EA.hy926 EA.hy926v1	LC - Cellules endothéliales humaines	<i>In vitro</i>	900	GSM	2,8	1		cDNA EA.hy926 EA.hy926v1	Atlas human v1.2 cDNA array RT-PCR	OUI - NON
Qutob, Chauhan, Bellier	2006	U87MG	Glioblastome humain	<i>In vitro</i>	1900	PW	0,1 - 1 - 10	4		U87MG	Agilent Human 1A array 22K RT-PCR	NON
Remondini, Nylund, Reivinen	2006	HL60 - NB69 - Lymphocytes T - U937 - EA.hy926 - CHME5 - Lymphocytes	HL60 - LC leucémie humaine NB69 - LC neuroblastome hum Lymphocytes T sanguins U937 - monocytes huma EA.hy926 - cellules endothéliales CHME5 - microglie	<i>In vitro</i>	900 1800	GSM	2 - 1 - 1,3 - 1,4 - 2 - 1,8 - 2,5	1 - 24 - 44	Intermittente 5 min ON/ 5 min OFF ou 5 min ON/ 10 min OFF ou 10 min ON/ 20 min OFF	HL60 - NB69 - Lymphocytes T - U937 - EA.hy926 - CHME5 - Lymphocytes	Human Unigene RZPD-2 cDNA array	OUI - NON
Whitehead, Moros, Brownstein	2006	C3H10T1/2	LC - Fibroblastes de souris	<i>In vitro</i>	847 835	CDMA FDMA	5	24		C3H10T1/2	Affymetrix U74AV2 GeneChips	NON
Zeng, Chen, Weng	2006	MCF-7	LC - Tumeur mammaire humaine	<i>In vitro</i>	1800	GSM	2 - 3,5	24	Intermittente 5 min ON / 10 min OFF	MCF-7	Affymetrix HG-U133A GeneChip array	NON

Auteurs (3 premiers)	Année	Modèle biologique exposé	Origine	Type d'étude	Fréquence (MHz)	Signal	DAS (W/Kg)	Durée d'exposition (heure)	Modalités d'exposition	Modèle biologique analysé	Méthode d'analyse expression génique	Effets génotoxiques significatifs (OUI / NON)	Résultats / Commentaires
Chauhan, Qutob, Lui	2007	U87MG MM6	LC - U87MG : glioblastome humain MM6 : LC monocyte humain	<i>In vitro</i>	1900	PW	0,1 - 1 - 10	24 6 - 24	Intermittente 5 min ON / 10 min OFF	U87MG MM6	Agilent Human 1Av2 array 22K	NON	Pangénomique + Etude des Hsp
Hirose, Sakuma, Kaji	2007	A172 IMR-90	LC- A172 : lignées de glioblastome humain IMR-90 : lignée de fibroblastes humains	<i>In vitro</i>	2142	CW CDMA	0,08 0,8	2 - 28 - 48		ARN de LC A172 IMR-90	Affymetrix HG- U133 Plus 2.0 GeneChip	NON	Etude de Hsp27, Hsp40, Hsp 70 et Hsp105/110
Zhao, Zou et Knapp	2007A	Neurones et astrocytes de souris	Cultures primaires de neurones et astrocytes de souris	<i>In vitro</i>	1900	GSM		2		Neurones et astrocytes de souris	GEArray Q series mouse apoptosis array RT-PCR	OUI	Absence de dosimétrie Etude de l'apoptose 3 gènes différemment exprimés : casp 2, casp 6 et asc Confirmés en RT-PCR
Zhao, Zhang, Xu	2007B	Neurones de rats	Cultures primaires de neurones de rats	<i>In vitro</i>	1800	GSM	2	24	Intermittente 5 min ON / 10 min OFF	Neurones de rats	Affymetrix Rat Neurobiology U34 array	OUI - NON	34 gènes différemment exprimés Confirmés par RT-PCR
Huang, Lee, Oh	2008	Jurkat T	LC - Cellules de lymphome T Jhumain	<i>In vitro</i>	1763	CDMA	10	24		Jurkat T	Applied Biosystem 1700 full genome expression human microarray	OUI - NON	10 gènes différemment exprimés
Paparini, Rossi, Gianfranceschi	2008	Souris		<i>In vivo</i>	1800	GSM	1,1	1		Cerveaux de souris	Affymetrix MOE 430A arrays	NON	
Sekijima, Takeda, Yasunaga	2010	A172 H4 IMR-90	Glioblastome humain Gliome Fibroblastes de poumon fœtal	<i>In vitro</i>	2142	W-CDMA	0,8	96		A172 H4 IMR-90	Affymetrix HG- U133A et B GeneChip	OUI - NON	3 gènes différemment exprimés

ANNEXE 4 – ARTICLE ACCEPTE POUR PUBLICATION
dans Radiation Research

ANNEXE 5 – ARTICLE SOUMIS