

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale n° 258 Science – Technologie – Santé

FACULTE de MEDECINE

EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies – Unité de neurobiologie

Thèse N° []

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : Biologie – Sciences – Santé

Présentée et soutenue par

Vanessa JOUBERT

Le 26 septembre 2006

**Exposition *in vitro* de cellules neuronales aux radiofréquences :
étude de l'apoptose.**

Thèse dirigée par Mme le Professeur Catherine YARDIN

JURY

Rapporteurs

Mr Lluis MIR Directeur de recherche CNRS, IGR, Paris XI

Mr Bernard VEYRET Directeur de recherche CNRS, Bordeaux I

Examineurs

Mr Sébastien CHAUVIN Responsable radiofréquences & santé, Bouygues Telecom

Mr Patrick LEPRAT Professeur des universités, Limoges

Mr Philippe LEVEQUE Chargé de recherche CNRS, Limoges

Mme Catherine YARDIN Professeur des universités - Praticien hospitalier, Limoges

A mes parents,

A ma sœur Sèverine,

Pour votre soutien sans faille.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Pierre Guillon (Directeur d'XLIM) qui a rendu possible la réalisation de cette thèse. Ce travail a été effectué à la faculté de Médecine, au sein de l'EA3842, dirigée par le Professeur Marie-Odile Jauberteau, à qui j'adresse mes remerciements pour m'avoir accueillie et donné les moyens nécessaires à sa bonne réalisation.

Je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, le Professeur Catherine Yardin, pour avoir dirigé ce travail tout au long de ces trois années. Cathy, merci pour tes conseils, ton soutien permanent, ton écoute dans les épreuves difficiles et les bons moments passés à Dublin. Merci de m'avoir encouragée et fais confiance.

J'exprime ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à Monsieur Lluís Mir et Monsieur Bernard Veyret, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie également Monsieur Patrick Leprat, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail. C'est grâce à vous (ou par votre faute) que j'ai découvert le petit monde de la pluridisciplinarité et sa grande richesse.

Je remercie très chaleureusement Monsieur Sébastien Chauvin d'avoir accepter de faire partie du jury, malgré la demande un peu tardive. Merci beaucoup.

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur Philippe Lévêque pour son aide et son implication durant ces trois années. Philippe, merci pour votre bonne humeur, vos conseils, votre écoute et les nombreuses discussions que nous avons eues. Je sais maintenant qu'un deadline est fait pour être dépassé !!! Merci pour tout.

Je remercie également le personnel du laboratoire : Irène et Marie-Line pour leur gentillesse, leur soutien et leur écoute ; Christiane, Delphine, Isabelle, Malvina, Nathalie, Patricia, Sandrine pour leur bonne humeur ; Faraj et Françoise E. pour leur accueil ; Sylvie pour sa gentillesse et les nombreux moments à bavarder ensemble ; Monsieur Rondelaud pour sa présence rassurante les week-ends. Enfin, une mention spéciale pour Françoise F. Merci pour ton aide et tout ce que tu fais pour nous faciliter les choses.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Madame Chantal Jayat-Vignoles pour les longues après-midi passées devant le cytomètre, dans la bonne humeur.

J'adresse mes remerciements aux animaliers (Florence, Jacques, Sylvie et Yvon) qui ont pris soin des animaux pour la bonne conduite des expérimentations.

Mes remerciements s'adressent également à mes amis Armelle, Carine, Gaël, Laurent, Martine, Nico, Sandrine M....pour tous les bons moments passés en votre compagnie, au travail ou en dehors. Armelle, merci pour ton aide et ton soutien dans les moments difficiles, que ce soit au labo ou en dehors, ainsi que pour les longues discussions qui continuent jusqu'à une heure avancée de la nuit. Je te souhaite le meilleur dans ta vie professionnelle ainsi que dans ta vie personnelle. Gaël, que dire..., si ce n'est merci pour ta bonne humeur... et les nombreuses pauses café que tu nous as obligé à prendre! Bonne route à toi. Carine, merci pour ta bonne humeur qui transparaît même dans les e-mails. Je te souhaite le meilleur dans ta vie. Mention spéciale à Sandrine et Nico pour votre soutien, malgré la distance. Notre amitié m'est précieuse et, promis, je viens vous voir dès que possible.

Je remercie également mes collègues : Barbara, Christophe, Elodie, Fabrice, Gaëlle, Julian, Linda, Marie-Hélène, Marie-Odile, Mireille, Serge, Stéphanie. Merci aussi à Alice et Marylène pour leur aide dans ce travail. Bonne chance à vous pour la suite. Je remercie également Nadine pour sa bonne humeur et son sourire, qui s'entend même au téléphone, ainsi que pour toutes les formalités que tu as faites pour moi. Je remercie également toutes les personnes, qui de près ou de loin, ont participé à ce travail et m'ont soutenue. Pardon de ne pas citer tout le monde.

J'ai également une pensée pour Elsa, Emma, Rémy, Sandrine S. et Sébastien. Grâce à vous, les déplacements en Italie et en Irlande m'ont laissé de bons souvenirs (la fameuse « marsala room » et les nombreux pubs irlandais) et de nombreuses photos. A bientôt j'espère.

Enfin, je remercie ma famille, ma sœur et mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre soutien toutes ces années et vos encouragements. Merci d'être là.

Abréviations

| | |
|---------|--|
| A | ampère |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| AIF | apoptosis-inducing factor |
| AMC | 7-amino-4-methylcoumarin |
| Apaf-1 | apoptosis-protease activating factor 1 |
| ATP | acide tri-phosphate |
| Bcl-2 | B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins |
| BH | Bcl-2 homology |
| BHE | barrière hémato-encéphalique |
| BIR | baculoviral IAP repeat |
| CARD | caspase recruitment domain |
| caspase | cysteine aspartate-specific protease |
| CEP | champ électrique pulsé |
| CHOP | C/EBP homologous protein |
| CW | continuous wave |
| Cyt-c | cytochrome c |
| Da | dalton (kDa : kilodalton) |
| DAPI | 4',6-diamino-2-phenylindole |
| DAS | débit d'absorption spécifique (en W/kg) |
| DCS | digital communication system |
| DD | death domain |
| DED | death effector domain |
| 2-dRib | 2-deoxyribose |
| DIABLO | direct IAP binding protein with low pI |
| DISC | death-inducing signaling complex |
| DMSO | dimethylsulphoxide |
| DTT | dithiothreitol |
| E | champ électrique ou amplitude du champ électrique (en V/m) |
| EDTA | acide éthylène-diamine-tétraacétique |
| ELF | extremely low frequency |

| | |
|----------------|---|
| EMF | electromagnetic field |
| Endo G | endonucléase G |
| f | fréquence (en Hz) |
| FasL | fibroblast-associated ligand |
| FDTD | finite differences in time domain |
| FLIP | FLICE-inhibitory proteins |
| GSM | global system for mobile communications |
| H | champ magnétique ou amplitude du champ électromagnétique (en A/m) |
| h | constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ Joules seconde) |
| Hsp | heat shock protein |
| HtrA2 | high temperature requirement protein A2 |
| Hz | hertz (MHz : megahertz ; GHz : gigahertz) |
| IAP | inhibitor apoptosis protein |
| ICE | interleukin-1 β converting enzyme |
| iDEN | integrated digital enhanced network |
| IR | infrarouge |
| K ⁺ | ion potassium |
| MLS | mitochondrial localisation signal |
| MW | microwave |
| NCRP | national council on radiation protection and measurements |
| NGF | neurotrophic growth factor |
| NS | nervous system |
| PAF | paraformaldehyde |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PI | propidium iodide |
| RF | radiofrequency (radiofréquence) |
| RPMI | roswell park memorial institute |
| S | siemens |
| SAR | specific absorption rate (en W/kg) |
| Smac | second mitochondrial activator of caspases |
| TDMA | time division multiple access |
| TEM | transverse electromagnetic mode |

| | |
|----------------|---|
| TNF | tumor necrosis factor |
| TNFR | tumor necrosis factor receptor |
| TRAIL | TNF-related apoptosis-inducing ligand |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP nick-end labelling |
| UMTS | universal mobile telecommunications system |
| UV | ultraviolet |
| V | volt |
| v | vitesse de propagation dans le milieu (m/s) |
| W | watt |
| WPC | wire-patch cell |
| ϵ_r | permittivité relative |
| λ | longueur d'onde (m) |
| ρ | masse volumique (kg/m^3) |
| σ | conductivité (S/m) |
| ω | pulsation (rad/s) |
| Cp | capacité calorifique |
| $\Delta\psi_m$ | potentiel transmembranaire mitochondriale |

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Introduction générale | 12 |
| Exposé bibliographique | 15 |
| Chapitre A : Les ondes électromagnétiques | 16 |
| I. Les ondes électromagnétiques | 16 |
| I.1. Généralités | 16 |
| I.2. Interactions entre onde et matière | 18 |
| II. Les micro-ondes | 18 |
| II.1. Généralités | 18 |
| II.2. Les paramètres importants | 20 |
| II.2.1. Le débit d'absorption spécifique (DAS) | 20 |
| II.2.2. Puissance et mode d'exposition | 21 |
| III. Mécanismes d'interaction ondes/système biologique | 24 |
| III.1. Effets sur la physiologie cellulaire impliquant la membrane | 24 |
| III.1.1. Effets sur les liposomes | 24 |
| III.1.2. Effets sur l'endocytose | 24 |
| III.1.3. Effets sur la barrière hémato-encéphalique | 25 |
| III.2. Modification de la conformation des protéines | 27 |
| III.2.1. Modification de la liaison ligand/ récepteur | 27 |
| III.2.2. Modification des protéines intracellulaires | 27 |
| III.3. Interaction avec les radicaux libres | 28 |
| III.4. Autres mécanismes | 28 |
| Chapitre B : L'apoptose | 29 |
| I. Généralités | 29 |
| I.1. Rôles physiologiques de l'apoptose | 30 |
| I.2. Aspects pathologiques de l'apoptose | 31 |
| II. Les différentes voies de l'apoptose | 32 |
| II.1. La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) | 32 |
| II.2. La voie mitochondriale (voie intrinsèque) | 34 |

| | |
|---|-----------|
| II.2.1. La voie mitochondriale dépendante des caspases _____ | 35 |
| II.2.2. La voie mitochondriale indépendante des caspases _____ | 38 |
| II.3. La voie du réticulum endoplasmique _____ | 40 |
| III. Acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose _____ | 42 |
| III.1. Les caspases _____ | 42 |
| III.1.1. Structure et nomenclature _____ | 42 |
| III.1.2. Classification des caspases _____ | 43 |
| III.2. Les membres de la famille Bcl-2 _____ | 43 |
| III.3. Les protéines de choc thermique (Hsp) _____ | 45 |
| III.3.1. Généralités _____ | 45 |
| III.3.2. Hsp70 _____ | 45 |
| III.3.3. Hsp27 _____ | 46 |
| IV. Les techniques de détection de l'apoptose _____ | 47 |
| IV.1. Evolution chronologique des techniques de détection _____ | 47 |
| IV.2. Quelques techniques de détection _____ | 48 |
| IV.2.1. Altérations membranaires _____ | 48 |
| IV.2.2. Activation des caspases _____ | 49 |
| IV.2.3. Modifications mitochondriales _____ | 49 |
| IV.2.4. Marquage de l'ADN _____ | 49 |
| IV.2.5. Fragmentation de l'ADN _____ | 50 |
| IV.2.6. Détection des protéines liées à l'apoptose : _____ | 50 |
| IV.3. Techniques utilisées dans l'étude _____ | 50 |
| IV.3.1. Marquage DAPI _____ | 50 |
| IV.3.2. Double marquage TUNEL + iodure de propidium _____ | 50 |
| IV.3.3. Dosage de l'activité caspase-3 _____ | 51 |
| IV.3.4. Marquage de l'AIF _____ | 51 |
| Chapitre C : Objectif et mise au point du protocole d'exposition _____ | 52 |
| I. Objectif de l'étude _____ | 52 |
| II. Mise au point du protocole d'exposition _____ | 52 |
| Résultats expérimentaux _____ | 54 |
| Publication 1 _____ | 55 |
| Publication 2 _____ | 57 |

| | |
|---|-----------|
| Publication 3 | 59 |
| Discussion générale | 61 |
| I. Radiofréquences, apoptose et lignées cellulaires | 62 |
| II. Radiofréquences, hsp et conformation des protéines | 65 |
| III. Radiofréquences, lésions de l'ADN et apoptose | 67 |
| IV. Potentialisation par les radiofréquences de l'apoptose induite par un autre agent | 70 |
| V. Radiofréquences, apoptose et cultures primaires | 71 |
| VI. AIF, apoptose neuronale et radiofréquences | 73 |
| Conclusion – Perspectives | 76 |
| Références bibliographiques | 79 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Représentation des champs constitutifs d'une onde électromagnétique. _____ | 16 |
| Figure 2: Spectre électromagnétique. _____ | 17 |
| Figure 3: Spectre électromagnétique. _____ | 19 |
| Figure 4: Schématisation de l'interception d'une onde par un système biologique. _____ | 20 |
| Figure 5: Représentation schématique de la forme des signaux. _____ | 22 |
| Figure 6: Représentation schématique de modulations. _____ | 23 |
| Figure 7: Comportement électrique d'une membrane. _____ | 24 |
| Figure 8: Voie apoptotique des récepteurs de mort. _____ | 34 |
| Figure 9: Les phases de l'apoptose mitochondriale. _____ | 35 |
| Figure 10: Représentation des voies apoptotiques mitochondriales. _____ | 40 |
| Figure 11: Action des HSP27 et HSP70 sur les protéines clé de l'apoptose. _____ | 47 |
| Figure 12 : Outils pour la détection de l'apoptose. _____ | 48 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Exemple de fréquences. _____ | 19 |
| Tableau 2: Récapitulatif des études sur la barrière hémato-encéphalique. _____ | 26 |
| Tableau 3: Quelques exemples de pathologies associées à un dérèglement du processus apoptotique. _____ | 31 |
| Tableau 4: Radiofréquences, apoptose et lignée cellulaire. _____ | 64 |
| Tableau 5: Radiofréquences, Hsp et conformation des protéines. _____ | 66 |
| Tableau 6: Radiofréquences et lésions de l'ADN. _____ | 69 |
| Tableau 7: Récapitulatif des études sur l'apoptose. _____ | 72 |

Introduction générale

Dans notre société actuelle, de plus en plus d'applications font appel aux ondes électromagnétiques (lignes électriques, chauffage, systèmes de communication...). L'exposition aux sources artificielles est devenue supérieure à l'exposition aux champs naturels. La multiplication et le développement des systèmes de communication sans fil ne se font pas sans provoquer de nombreuses questions quant à leurs éventuels effets sur la santé, notamment sur le cerveau. La proximité de la tête avec l'antenne lors des communications, fait des cellules neuronales une cible potentielle pour les radiofréquences émises par les téléphones.

Les premières études concernant les effets des radiofréquences sur le cerveau ont porté sur la prolifération cellulaire, que ce soit *in vivo* et *in vitro*. En effet, une prolifération cellulaire excessive conduit à la formation de tumeurs. Ainsi, les études épidémiologiques ont principalement porté sur l'incidence des tumeurs cérébrales depuis l'augmentation de l'utilisation de la téléphonie mobile. En revanche, peu (ou pas) d'études épidémiologiques se sont intéressées à la survenue de troubles cognitifs et à l'incidence des pathologies neurodégénératives. De la même façon, *in vitro*, peu d'études ont été réalisées sur l'interaction des radiofréquences avec la mort neuronale par apoptose.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un phénomène biologique indispensable à l'organisme. C'est un mécanisme de protection contre les agressions de l'organisme, hautement régulé. Toutefois, une dérégulation de l'apoptose peut être à l'origine de nombreuses pathologies comme les maladies neurodégénératives en cas d'excès d'apoptose ou les cancers, en cas de défaut d'apoptose.

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier l'effet des radiofréquences sur l'apoptose neuronale *in vitro*. Pour cela, deux types de cellules neuronales ont été exposés aux radiofréquences : des cellules de la lignée SH-SY5Y, issues d'un neuroblastome humain, et des neurones primaires corticaux de rat.

Ce manuscrit est composé de trois parties. La première partie est un rappel sur les ondes électromagnétiques et sur l'apoptose, suivie de la description de l'objectif de l'étude et de la mise au point du protocole d'exposition. La seconde partie présente les résultats expérimentaux sous la forme de trois articles: le premier publié dans *International Journal of*

Radiation Biology, le second publié dans *Bioelectromagnetics*, et le troisième soumis. Enfin, la troisième partie consiste en une discussion générale des résultats obtenus.

Exposé bibliographique

Chapitre A : Les ondes électromagnétiques

I. Les ondes électromagnétiques

I.1. Généralités

Une onde électromagnétique est l'association d'un champ électrique et d'un champ magnétique. Ces deux champs varient dans le temps et se propagent dans l'espace à la vitesse de la lumière (**Figure 1**).

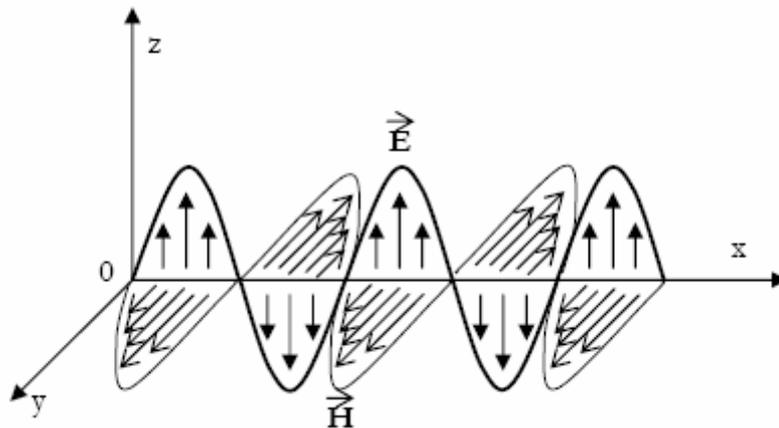


Figure 1: Représentation des champs constitutifs d'une onde électromagnétique (cas d'une onde plane). E: variation spatiale du champ électrique à un instant donné. H: variation spatiale du champ magnétique à un instant donné. L'axe OX représente la direction de propagation de l'onde.

Les ondes électromagnétiques s'étendent sur un ensemble continu de fréquence appelé spectre électromagnétique (**Figure 2**) et sont caractérisées par :

- leur longueur d'onde (λ , exprimée en mètre) : distance qui sépare les deux points correspondants d'oscillation qui se suivent. Elle caractérise en particulier la distance entre deux nœuds ou deux ventres d'une onde.
- leur fréquence (f , exprimée en Hertz) : définit le nombre d'oscillations en un point donné au cours d'une seconde.

La fréquence et la longueur d'onde sont reliées par la relation :

$$\lambda = v/f$$

avec λ = longueur d'onde (m), v = vitesse de propagation dans le milieu (m/s) et f = fréquence (Hz).

Suivant cette relation, plus la fréquence est élevée et plus la longueur d'onde est courte. Par exemple pour un four micro-ondes fonctionnant à 2,45 GHz, $\lambda_{\text{onde électromagnétique}} = 12,2 \text{ cm}$.

A toute onde électromagnétique est associée une particule, appelée photon, dont l'énergie est liée à la longueur d'onde par la relation :

$$E = h f = h c/\lambda$$

avec h = constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ Joules seconde).

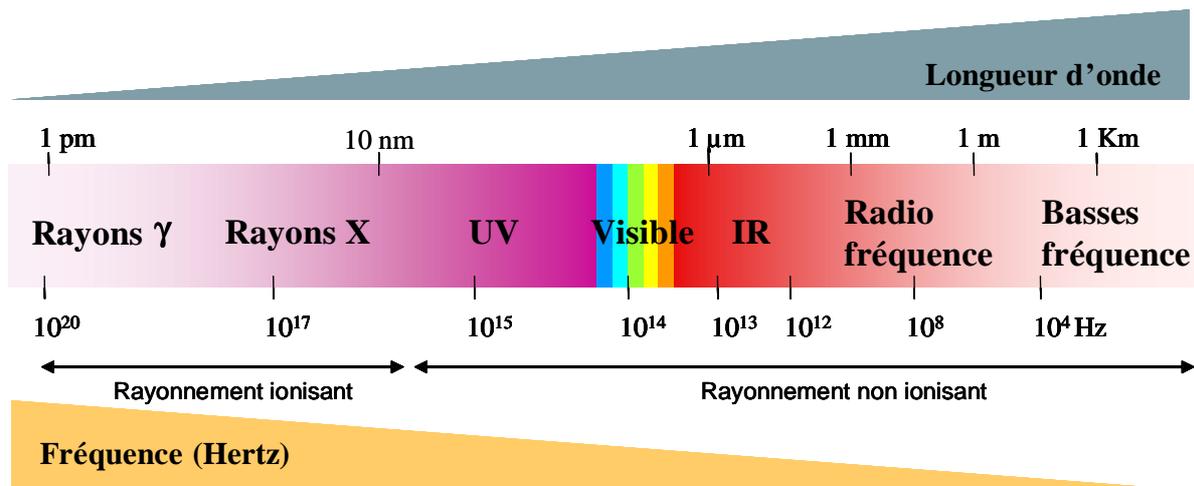


Figure 2: Spectre électromagnétique. (UV : ultraviolets ; IR : infrarouges).

Les ondes électromagnétiques sont classées en deux catégories, en fonction de leur énergie et de leur fréquence : les rayonnements ionisants (rayons X, rayons γ , qui peuvent rompre les liaisons moléculaires) et les rayonnements non ionisants (ultraviolets ou UV, infrarouges ou IR, radiofréquences, basses fréquences). La limite entre ces deux rayonnements est $\lambda = 10 \text{ nm}$ (quand $\lambda < 10 \text{ nm}$, les rayonnements sont dits ionisants).

I.2. Interactions entre onde et matière

En se propageant, une onde peut rencontrer différents obstacles. En fonction de sa longueur d'onde et des caractéristiques de la matière rencontrée, différents types d'interactions peuvent se produire :

- la réflexion (ou réfraction), qui se produit quand les milieux sont séparés par une surface très grande dont les irrégularités sont très petites par rapport à la longueur d'onde ;
- la diffraction, si les irrégularités ou les dimensions de la surface sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde ;
- la diffusion, si l'onde rencontre plusieurs obstacles dont les dimensions sont du même ordre de grandeur ou plus petites que la longueur d'onde ;
- l'absorption, quand il y a perte d'énergie dans le milieu traversé.

Les interactions entre les ondes et la matière dépendent des caractéristiques électromagnétiques du milieu, comme la permittivité. La permittivité relative ϵ_r caractérisant un milieu, traduit les phénomènes se passant au niveau microscopique, à l'échelle macroscopique. Elle dépend de nombreux paramètres tels que la fréquence ou la température.

II. Les micro-ondes

II.1. Généralités

Les radiofréquences sont des rayonnements non ionisants compris entre 30 kHz et 300 GHz ($1\text{mm} \leq \lambda \leq 10\text{ km}$). Elles comprennent notamment les micro-ondes (ou hyperfréquences) qui peuvent être divisées en trois catégories : les ondes décimétriques (300 MHz à 3 GHz), les ondes centimétriques (3 GHz à 30 GHz) et les ondes millimétriques (30 GHz à 300 GHz) (**Figure 3**).

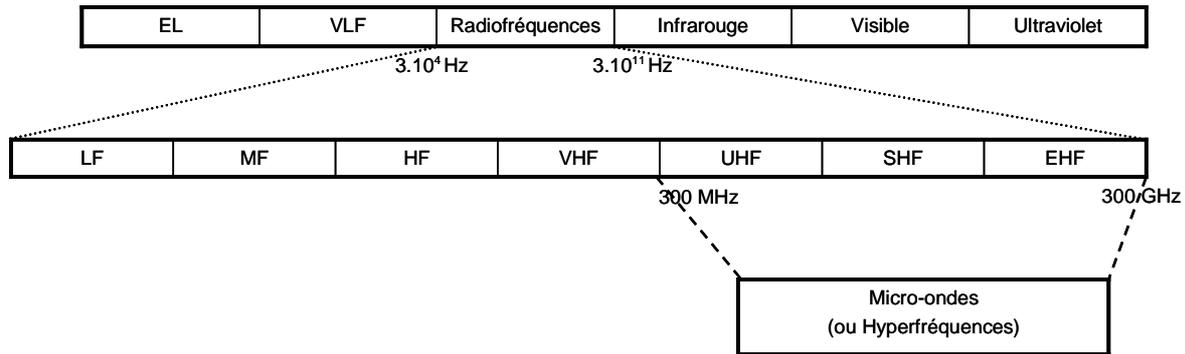


Figure 3: Spectre électromagnétique. (F = frequency, L = low, E = extremely, V = very, M = medium, H = high, U = ultra, S = super).

Les micro-ondes sont utilisées pour de nombreuses applications (fours à micro-ondes, systèmes de chauffage industriels, téléphones portables, émetteurs de télévision, radars, équipement de diathermie médicale,...). Chacune de ces applications utilisent des bandes de fréquences bien précises (**Tableau 1**).

Tableau 1: Exemple de fréquences. (GSM : global system for mobile communication ; DCS : digital communication system ; UMTS : universal mobile telecommunications system).

| Applications | Fréquence (MHz) |
|----------------------|-----------------|
| GSM-900 | de 890 à 960 |
| DCS-1800 | de 1710 à 1880 |
| UMTS | de 1900 à 2025 |
| Chauffage industriel | 900, 2450, 5800 |

L'utilisation des micro-ondes dans le chauffage industriel (dans l'industrie agro-alimentaire ou les équipements de diathermie) est due à leur capacité d'induire une rapide augmentation de température, provoquée par des « frictions » intermoléculaires. Cette propriété est également utilisée dans le traitement de déchets, comme les déchets hospitaliers, en tant qu'alternative à l'incinération.

Outre leur utilisation en tant que vecteur d'énergie, les micro-ondes peuvent également être utilisées comme ondes porteuses d'informations dans le cas des télécommunications. Dans la téléphonie mobile, la bande de fréquence s'étend de 850 à 2025 MHz. En France, deux

bandes de fréquences sont utilisées par le système GSM : une bande aux environs de 900 MHz et une bande aux environs de 1800 MHz ; le système UMTS s'étend de 1900 à 2025 MHz.

II.2. Les paramètres importants

II.2.1. Le débit d'absorption spécifique (DAS)

D'une manière générale, toutes les ondes électromagnétiques sont susceptibles d'interagir avec la matière. Lorsqu'une onde électromagnétique est interceptée par un tissu biologique, une partie de l'énergie est renvoyée sous forme d'onde réfléchie et l'autre partie est transmise et absorbée (**Figure 4**). Cette dernière est à l'origine des interactions rayonnement/tissu. Selon leur densité d'énergie (J/m^2) et leur densité de puissance (W/m^2), les ondes électromagnétiques peuvent être inoffensives pour les objets et les tissus vivants ou au contraire destructrices et mortelles. Néanmoins, il est très difficile d'établir une relation significative entre une simple mesure et les effets biologiques observés. La quantité d'énergie absorbée par les tissus semble être le paramètre le plus significatif pour étudier l'interaction de l'onde avec les tissus.

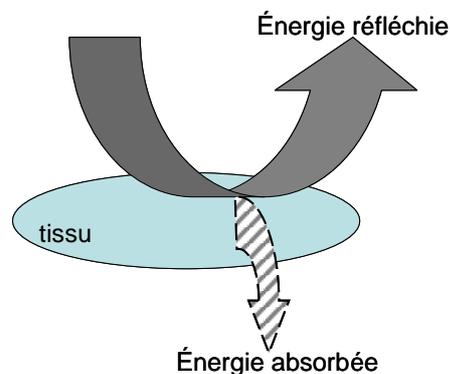


Figure 4: Schématisation de l'interception d'une onde par un système biologique.

Pour pouvoir quantifier la dissipation d'énergie dans la matière, le débit d'absorption spécifique (DAS, ou, pour les anglo-saxons, SAR « specific absorption rate ») a été officiellement désigné comme paramètre dosimétrique de référence en 1981 par le « National Council on Radiation Protection and Measurements » (NCRP). Le DAS est défini comme la

quantité de puissance absorbée par unité de masse et s'exprime en watt par kilogramme (W/kg).

$$\mathbf{DAS = dW/dm}$$

$$\mathbf{DAS = \sigma E^2/\rho}$$

$$\mathbf{DAS = C_p \partial T/\partial t}$$

avec W = puissance absorbée (W) ; m = masse (kg) ; σ = conductivité (S/m) ; E = intensité du champ électrique (V/m) ; ρ = masse volumique (kg/m^3) ; C_p = capacité calorifique du matériau biologique et $\partial T/\partial t$ = variation de température ($^{\circ}\text{K}$) au cours du temps (s).

Le DAS permet de comparer les niveaux d'exposition et donc les effets biologiques obtenus dans des conditions différentes. Il permet également de définir les normes d'exposition pour la santé publique ainsi que dans les applications thérapeutiques comme l'hyperthermie.

Les normes d'exposition sont basées sur le seuil thermique : une valeur de $\text{DAS} = 4 \text{ W/kg}$ entraîne une élévation de température de 1°C , chez des petits animaux. Ce seuil de DAS est atténué d'un facteur 10 pour les travailleurs (soit une limite d'exposition fixée à $0,4 \text{ W/kg}$ corps entier) et d'un facteur 50 pour le grand public (soit une limite d'exposition fixée à $0,08 \text{ W/kg}$ corps entier).

II.2.2. Puissance et mode d'exposition

Les effets des micro-ondes sur les systèmes biologiques dépendent non seulement des caractéristiques de l'onde (fréquence, longueur d'onde,...), mais également du mode d'exposition.

En effet, le mode d'exposition peut influencer les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. Les micro-ondes peuvent être appliquées en mode continu ou en mode pulsé (**Figure 5**).

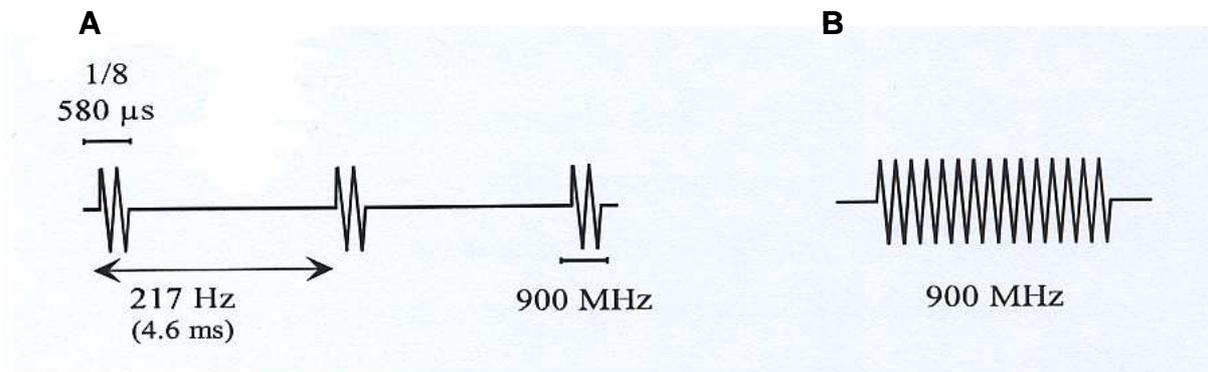


Figure 5: Représentation schématique de la forme des signaux. (A) Signal émis en mode pulsé de type GSM. (B) Signal émis en mode continu (CW) (d'après Mahrouf *et al.*, 2005).

Les effets des micro-ondes sur les systèmes biologiques peuvent également dépendre de la puissance (quantité d'énergie échangée par unité de temps, s'exprimant en watt).

Un rayonnement continu est émis avec une puissance constante P . L'énergie délivrée pendant le temps d'utilisation est égale à :

$$E = P \Delta t$$

avec E = énergie (J), P = puissance (W) et Δt = durée d'exposition (s).

Si l'émission est pulsée, le rayonnement est émis par des impulsions de durée τ . Ces impulsions sont, la plupart du temps, émises de façon répétées avec une fréquence de répétitions f_r (Hz). Dans ce cas, on distingue la puissance crête (P_c) et la puissance moyenne (P_m).

La puissance crête correspond à la puissance maximale d'une impulsion, l'énergie délivrée pendant cette impulsion est alors égale à:

$$E = P_c \tau$$

La puissance moyenne représente, quant à elle, la puissance délivrée moyennée dans le temps et est égale à :

$$P_m = P_c \tau f_r$$

L'énergie délivrée est alors:

$$E = P_m t$$

L'émission peut également être modulée, de manière à ce qu'un seul de ses paramètres physiques varie (**Figure 6**). Par exemple pour la téléphonie mobile, le champ électromagnétique de 900 MHz est modulé à 217 Hz (mode TDMA : « time division multiple access »). Il existe principalement deux types de modulation :

- la modulation d'amplitude, représentée dans les **figures 6b** et **6c**,
- la modulation de fréquence (cas de la téléphonie mobile), représentée dans la **figure 6d**.

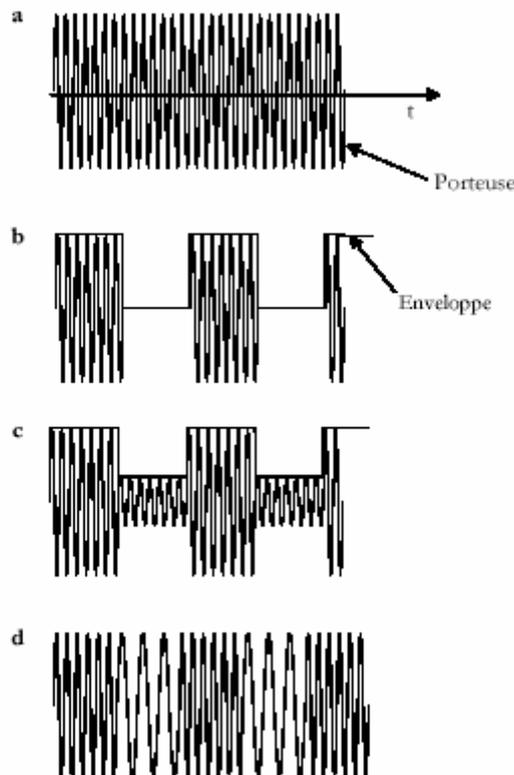


Figure 6: Représentation schématique de modulations. (a) Signal non modulé, (b) Signal modulé en amplitude avec un taux de modulation de 100%, (c) Signal modulé en amplitude avec un taux de modulation de 50%, (d) Signal modulé en fréquence (d'après Rougier, 2003).

III. Mécanismes d'interaction ondes/système biologique

L'interaction des radiofréquences avec les tissus biologiques met en jeu de nombreux mécanismes. Les mécanismes thermiques résultent d'une élévation de la température provoquée par les radiofréquences alors que les mécanismes non thermiques sont provoqués par les ondes électromagnétiques en dehors de l'augmentation de température. Ce sont ces mécanismes qui sont les plus intéressants à étudier, car susceptibles d'entraîner des effets inconnus au niveau biologique, alors que les effets thermiques sont à l'heure actuelle beaucoup mieux définis.

III.1. Effets sur la physiologie cellulaire impliquant la membrane

La membrane cellulaire semble être la cible la plus intéressante pour les champs électromagnétiques. Elle est constituée d'une bicouche lipidique, et elle se comporte électriquement comme un diélectrique (**Figure 7**).

Milieu extracellulaire



Cytoplasme

Figure 7: Comportement électrique d'une membrane.

III.1.1. Effets sur les liposomes

Les effets des radiofréquences sur la membrane cellulaire ont été étudiés sur des liposomes qui sont des modèles de membranes biologiques. Certaines études ont montré une augmentation de la perméabilité des liposomes après exposition aux radiofréquences (Saalman *et al.*, 1991 ; Bergqvist *et al.*, 1994 ; Ramundo-Orlando *et al.*, 2004)

III.1.2. Effets sur l'endocytose

Mahrour *et al.* (2005) ont étudié les effets des champs électromagnétiques sur l'endocytose chez trois types cellulaires différents (cellules de mélanome murin B16-F1, fibroblastes de

hamster chinois DC-3F et cellules de carcinome humain A253). Les cellules ont été exposées à 900 MHz en GSM ou en CW et à des champs électriques pulsés (CEP) de basse fréquence (217 Hz, avec des fréquences et des durées de pulses différentes). Plusieurs mécanismes d'endocytose existent mais le seul qui paraît altéré par les micro-ondes ou par des champs électriques est celui qui met en jeu une invagination de la membrane cellulaire sans l'implication de récepteurs membranaires. Une augmentation du taux d'endocytose (environ 1,5 fois) est observée après exposition en GSM et CEP, quel que soit le type cellulaire. Les variations de fréquence et de durée des pulses électriques n'ont pas d'effet sur la stimulation de l'endocytose en phase fluide. Cette étude conclue que le champ électrique serait à l'origine des effets sur la membrane. Ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus sur la barrière hémato-encéphalique (BHE).

En effet, la membrane est soumise à des phénomènes d'endocytose et d'exocytose qui permettent l'entrée et la libération de molécules.

III.1.3. Effets sur la barrière hémato-encéphalique

La BHE régule le passage des molécules vers le cerveau, en empêchant le passage de molécules, qui pourraient induire des phénomènes neurotoxiques, et en laissant passer les molécules nécessaires au métabolisme. Elle peut être altérée par différents facteurs tels que les traumatismes, l'hypertension ou les radiations ionisantes.

Certaines études *in vivo* montrent une augmentation de la perméabilité de la BHE après exposition aux radiofréquences (Salford *et al.*, 1994, 2003), alors que la plupart ne montrent aucun effet (Tsurita *et al.*, 2000 ; Finnie *et al.*, 2001, 2002 ; Kuribayashi *et al.*, 2005 ; Cosquer *et al.*, 2005). Deux études ont été réalisées sur des cellules endothéliales de capillaires de cerveau de porc (Schirmacher *et al.*, 2000 ; Franke *et al.*, 2005) et ont donné des résultats contradictoires : la première étude a montré une augmentation de la perméabilité au sucrose, qui n'a pas été confirmée par la seconde étude. Le récapitulatif des différentes études réalisées a été effectué dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: Récapitulatif des études sur la barrière hémato-encéphalique.

| Auteurs | Conditions d'exposition | Modèles | Résultats |
|----------------------------------|---|--|---|
| Salford <i>et al.</i> (1994) | 915 MHz ; CW et pulsé ; 0,016 à 5 W/kg ; 2 h | Rats | Augmentation de la perméabilité à l'albumine |
| Schirmacher <i>et al.</i> (2000) | 1800 MHz ; GSM ; 0.3 W/kg | Cellules endothéliales de capillaires de cerveau de porc | Augmentation de la perméabilité au sucrose |
| Tsurita <i>et al.</i> (2000) | 1439 MHz ; TDMA ; 2 W/kg (cerveau) ; 1 h/jour ; 5 j/semaine ; 2 ou 4 semaines | Rats | Pas d'effet |
| Finnie <i>et al.</i> (2001) | 900 MHz ; GSM ; 4 W/kg corps entier ; 1 h | Souris | Pas d'effet |
| Finnie <i>et al.</i> (2002) | 900 MHz ; GSM ; 1 h/jour ; 5 j/semaine ; 2 ans ; 0.25, 1, 2 et 4 W/kg | Souris | Pas d'effet |
| Salford <i>et al.</i> (2003) | 915 MHz GSM ; 2 h ; 2, 20 et 200 mW/kg | Rats | Augmentation de la perméabilité et des neurones sombres |
| Cosquer <i>et al.</i> (2005) | 2450 MHz ; 45 min ; 2 W/kg corps entier | Rats | Pas d'effet |
| Franke <i>et al.</i> (2005) | 1800 MHz ; GSM ; 0.3 W/kg | Cellules endothéliales de capillaires de cerveau de porc | Pas d'effet |
| Kuribayashi <i>et al.</i> (2005) | 1439 MHz ; 2 et 6 W/kg ; 90 min/jour ; 1 ou 2 semaines | Rats | Pas d'effet |

III.2. Modification de la conformation des protéines

Les protéines sont composées d'une chaîne d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Les acides aminés sont chargés électriquement, ce qui favorise la formation d'hélices et de boucles, donnant à la protéine sa conformation et donc sa fonction. Si les protéines sont dénaturées (par un stress tel que le choc thermique), elles s'agrègent et deviennent incapables de jouer leur rôle.

III.2.1. Modification de la liaison ligand/ récepteur

L'influence des radiofréquences sur la liaison ligand/récepteur membranaires fait également partie des mécanismes d'interaction possibles.

La liaison de petits ligands comme le Ca^{2+} sur une protéine modifie la conformation de celle-ci et contrôle ainsi sa fonction de récepteur. Chiabrera *et al.* (2000) ont proposé que la probabilité de liaison pourrait être modifiée par la composante électrique des radiofréquences.

III.2.2. Modification des protéines intracellulaires

La possibilité que les radiofréquences provoquent des modifications de conformation a été considérée par plusieurs groupes. Laurence *et al.* (2000) ont étudié les effets des micro-ondes pulsés sur la conformation des protéines. Ils montrent que l'exposition à des ondes pulsées, même en conditions athermiques, peut conduire à une augmentation transitoire et localisée de la température, provoquant un changement de conformation des protéines. De Pomerai *et al.* (2003) ont exposé de l'albumine de sérum bovin à 1 GHz pendant 3 ou 48 heures, avec un DAS de 15 et 20 mW/kg. Les résultats montrent que l'exposition aux micro-ondes augmente l'agrégation de l'albumine. Cette étude est confirmée par celle de Mancinelli *et al.* (2004). Les auteurs ont étudié la cinétique de repliement de la myoglobine soumise à une exposition aux micro-ondes à 1.95 GHz, pendant 3 heures avec un DAS de 51 mW/g. Ils ont constaté un ralentissement de ce repliement dans les échantillons exposés, qui pourrait favoriser l'agrégation des protéines. Cette agrégation est irréversible et les protéines perdent leur fonction.

III.3. Interaction avec les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules avec un électron non apparié. Leur rôle dans certaines pathologies, comme le cancer, est bien établi. Il est donc important d'étudier ce point. Une étude a montré que les champs électromagnétiques (à une fréquence inférieure à 80 MHz) provoquent l'augmentation de la concentration en radicaux libres (Woodward *et al.*, 2001). Ces résultats s'opposent à ceux de Zmyslony *et al.* (2004) et Lantow *et al.* (2006).

III.4. Autres mécanismes

Il existe d'autres hypothèses pour expliquer les interactions onde électromagnétique/système biologique, résumées dans une revue récente de la littérature (Challis, 2005) : effets du champ électrique provoqué par la démodulation, augmentation de l'attraction entre les cellules, ou effets sur la magnétite (Fe_3O_4).

Jusqu'à aujourd'hui, aucun mécanisme n'est réellement avéré et tous restent à l'état d'hypothèse.

Chapitre B : L'apoptose

I. Généralités

Il existe deux types principaux de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose.

- L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, correspondant à une réaction de l'organisme à différents stimuli (physiologiques ou pathologiques). Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui va induire la destruction d'une cellule, tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante. Ce phénomène a été décrit par Kerr *et al.* (1972) et appelé « apoptose » pour décrire une mort cellulaire différente de la nécrose.
- La nécrose, autre type de mort cellulaire, est le résultat d'une agression environnementale des cellules (exposition à un produit toxique, une coupure, une infection virale ou bactérienne). Elle concerne généralement un groupe de cellules, qui, incapables de s'adapter à un stress trop violent, vont éclater. Elle est considérée comme une mort cellulaire désordonnée. La rupture de la membrane cytoplasmique libère le contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire et déclenche une réaction inflammatoire.

L'apoptose est caractérisée par un certain nombre de modifications :

- morphologiques: diminution du volume cellulaire, maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, relocalisation des organites cytoplasmiques, condensation de la chromatine puis fragmentation du noyau et du cytoplasme.
- biochimiques: chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, externalisation des résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique, activation des caspases et fragmentation de l'ADN.

Des marqueurs de surface (comme les résidus phosphatidylsérines), permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages environnants, dans lesquels elles subissent une dégradation rapide.

I.1. Rôles physiologiques de l'apoptose

L'apoptose a plusieurs rôles essentiels pour l'organisme. Elle assure le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui les constituent (Evan et Littlewood, 1998). Elle sculpte la forme interne et externe de l'embryon, puis la forme des bras, des jambes et elle élimine les tissus qui séparent les doigts, permettant leur individualisation (Meier *et al.*, 2000). Elle participe également à la construction du système immunitaire et du cerveau.

La neurogénèse produit environ deux fois plus de neurones que nécessaires dans le système nerveux. Pour cette raison, les activités de mort et de naissance cellulaire sont complémentaires au cours de la mise en place du système nerveux. La mort cellulaire représente donc un processus indispensable qui permet l'adaptation de certains mécanismes, comme par exemple l'élimination des neurones en surnombre ou des cellules ayant un phénotype anormal, de même que la correction des erreurs (Oppenheim, 1991). Ce phénomène de mort neuronale massive est conservé à travers les espèces et le processus de mort cellulaire programmée est retrouvé dans la plupart des régions et des populations cellulaires du système nerveux.

Un des facteurs déterminant l'apoptose neuronale est la cible des neurones. En effet, les variations de taille de la cible des neurones modifient le nombre de neurones survivants. Réduire la taille de la cible revient à diminuer le nombre des neurones survivants alors que l'augmenter accroît le nombre de neurones survivants (Oppenheim, 1996). La découverte du NGF («neurotrophic growth factor») a permis d'élucider ce phénomène (Levi-Montalcini et Hamburger, 1951). Il semble qu'en plus des facteurs neurotrophiques produits par la cible, d'autres facteurs provenant des apports afférents, de la glie ou des hormones systémiques jouent également un rôle important (Oppenheim, 1991 ; Korsching, 1993).

Le processus apoptotique neuronal s'il n'est pas respecté durant le développement embryonnaire, peut conduire à des anomalies létales. Ceci a été démontré chez des souris déficientes en caspase-3 qui ont un développement cérébral anormal consistant en des hyperplasies variées associées à une anarchie cellulaire. Ces souris meurent au cours des trois

premières semaines de vie (Kuida *et al.*, 1996).

Ce sont des mécanismes semblables qui permettent la sculpture et la complexité de notre système immunitaire. En effet, l'apoptose permet l'adaptation du système immunitaire au soi, sélectionnant à partir de l'immense diversité initiale de lymphocytes, les 1 à 5 % qui ont fait la preuve de leur capacité à défendre l'organisme sans l'agresser et qui seront par la suite capables de combattre un microorganisme ayant pénétré dans le corps humain. La mort cellulaire programmée est aussi essentielle à la régulation de la réponse immunitaire. Les cellules immunitaires prolifèrent suite à la présence d'un agent étranger. Une fois éliminé, un grand nombre de cellules est détruit pour ralentir la réponse immunitaire qui pourrait causer de graves dommages à l'organisme (Ekert et Vaux, 1997 ; Goldrath et Bevan, 1999).

I.2. Aspects pathologiques de l'apoptose

Le dérèglement de la mort cellulaire par apoptose est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies (**Tableau 3**).

Tableau 3: Quelques exemples de pathologies associées à un dérèglement du processus apoptotique.

| Déficit de l'apoptose | Excès d'apoptose |
|---|---|
| <i>Cancers</i> | <i>Maladies neurodégénératives</i> |
| Mélanomes, Syndrome lymphoprolifératif, Leucémies | Alzheimer, Parkinson, Huntington, Sclérose latérale amyotrophique |
| <i>Infections virales</i> | <i>Infections virales</i> |
| Epstein Barr, VIH, Hépatite C | Hépatite B, Influenza virus |
| <i>Maladies auto-immunes</i> | |
| Lupus érythémateux disséminé | |
| <i>Divers</i> | <i>Divers</i> |
| Ostéoporose | Alopécie, Athérosclérose, Ischémie |

Le déclenchement anormal ou excessif de l'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement de certaines pathologies. C'est notamment le cas des maladies neurodégénératives chroniques (l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson) et d'autres atteintes

comme les accidents vasculaires cérébraux, les complications immunologiques ou neurologiques dues à l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), les hépatites fulminantes ou alcooliques et enfin les lésions causées par des méningites (Thompson, 1995).

Si l'apoptose est déficitaire, il y a une augmentation anormale du nombre de certaines cellules aboutissant à un cancer. Le blocage anormal de l'apoptose est important dans le développement des métastases, permettant à des cellules cancéreuses de se propager dans le corps sans s'autodétruire et de survivre dans un organe qui n'est pas le leur (Thompson, 1995 ; Evan et Littlewood, 1998). Il existerait aussi un lien entre le vieillissement, la sénescence et le processus apoptotique.

Le vieillissement se caractérise par une altération progressive des capacités fonctionnelles de notre corps et par l'apparition de trois catégories de maladies graves : les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et les cancers, tous liés à un excès ou un défaut d'apoptose (Johnson *et al.*, 1999).

II. Les différentes voies de l'apoptose

Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à l'apoptose. La première est la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque). La deuxième voie est la voie mitochondriale (voie intrinsèque) mettant en jeu la mitochondrie. Ces deux voies aboutissent à l'activation des caspases. Toutefois, il existe également une voie indépendante des caspases qui met en jeu la protéine mitochondriale AIF (« apoptosis-inducing factor »), ainsi qu'une voie passant par le réticulum endoplasmique.

II.1. La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque)

Elle est initiée par des ligands de mort extracellulaires de la famille du TNF (« tumor necrosis factor ») tels que TNF α , FasL/CD95L (« fibroblast-associated ligand »), et TRAIL (« TNF-related apoptosis-inducing ligand »). Ces ligands se lient à des récepteurs de mort situés à la surface membranaire. Les récepteurs les plus décrits appartiennent à la famille du TNFR

(« tumor necrosis factor receptor ») (Borner, 2003).

La fixation du ligand sur les récepteurs entraîne leur trimérisation (**Figure 8**). Grâce à un domaine d'environ 80 acides aminés (le domaine de mort ou DD pour « death domain »), les récepteurs trimérisés recrutent, dans le cytoplasme, une protéine adaptatrice telle que TRADD ou FADD. Ces protéines adaptatrices se lient à la caspase-8 (caspase initiateuse) pour former le DISC (« death-inducing signaling complex ») ou casposome, *via* un domaine DED (« death effector domain »). La proximité de TRADD ou FADD stimule l'autoprotéolyse/activation de la pro-caspase-8. La caspase-8 activée est libérée du DISC et active alors les caspases effectrices -3, -6 et -7 pour amplifier le signal de mort. Cette voie peut être bloquée par : (i) des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), (ii) par des inhibiteurs de caspases, (iii) par des FLIP (« FLICE-inhibitory proteins »), protéines homologues de la caspase-8 qui contiennent un domaine DED pour se lier à FADD sans pouvoir servir d'intermédiaire entre le signal apoptotique et les caspases effectrices. Ces FLIP ne sont pas des caspases initiateuses (Medema *et al.*, 1997 ; Thome *et al.*, 1997).

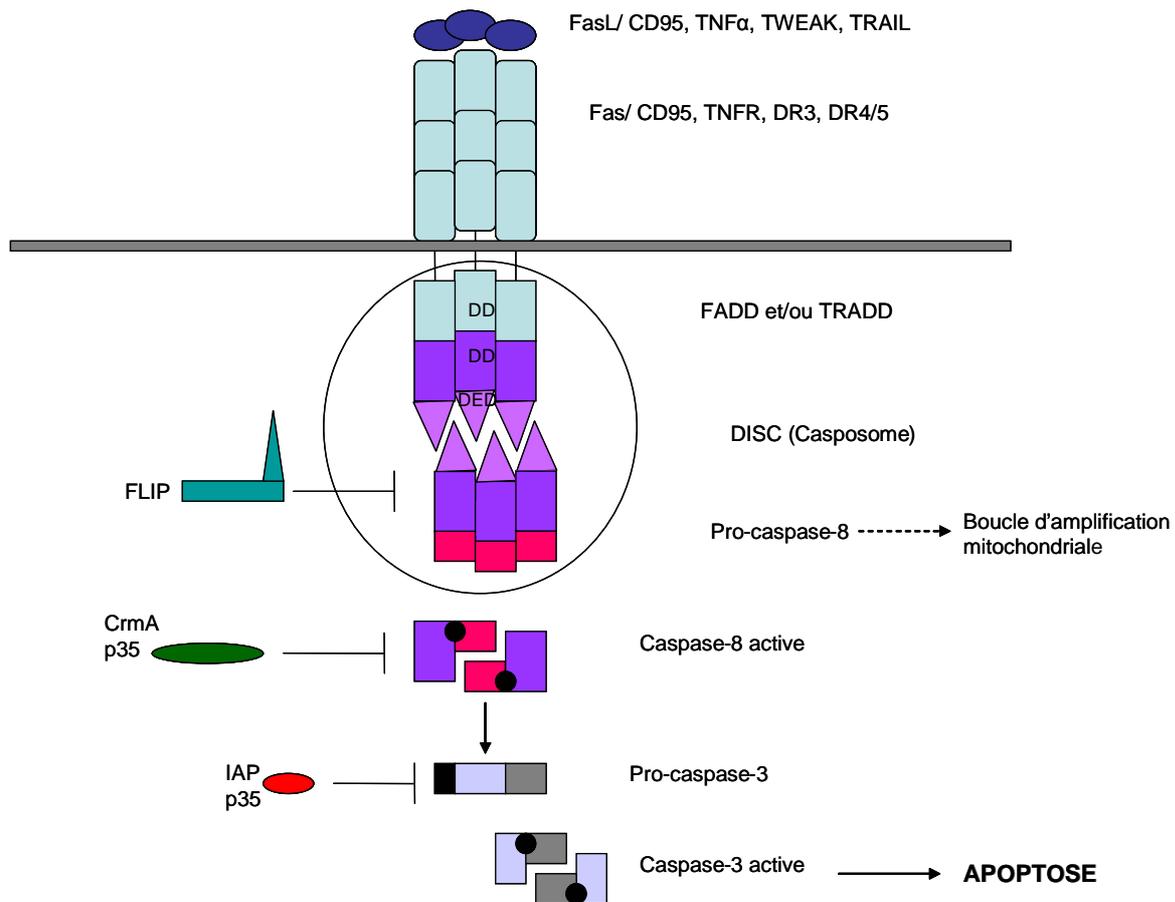


Figure 8: Voie apoptotique des récepteurs de mort (d'après Borner, 2003).

II.2. La voie mitochondriale (voie intrinsèque)

La mitochondrie est un organe présent dans la majorité des cellules eucaryotes. Elle possède une double membrane, un génome circulaire et des systèmes propres de transcription/traduction. Elle a trois fonctions principales : la production d'énergie, la génération d'espèces réactives oxygénées et la régulation de l'apoptose. Il est clairement décrit que la mitochondrie est un des acteurs principaux de l'apoptose (Green et Kroemer, 1998).

La mitochondrie est décrite comme le centre des phénomènes apoptotiques (Kroemer *et al.*, 1998) se déroulant en trois phases : (i) une phase d'initiation où les signaux inducteurs d'apoptose convergent vers la mitochondrie, (ii) une phase de décision (ou de régulation) qui entraîne la perméabilisation des membranes mitochondriales et la libération de facteurs

apoptogènes, et (iii) une phase de dégradation (ou d'exécution) mettant en jeu les caspases et DNases (Green et Kroemer, 1998) (**Figure 9**).

La première perturbation cellulaire est la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Psi\Delta m$), suivie par la libération des facteurs apoptogènes tels que le cytochrome c, les pro-caspases-2, -3, -8 et -9, Smac/DIABLO (« second mitochondrial activator of caspases »/ « direct IAP binding protein with low pI »), l'AIF (« apoptosis-inducing factor »), et l'endonucléase G (Parone *et al.*, 2002).

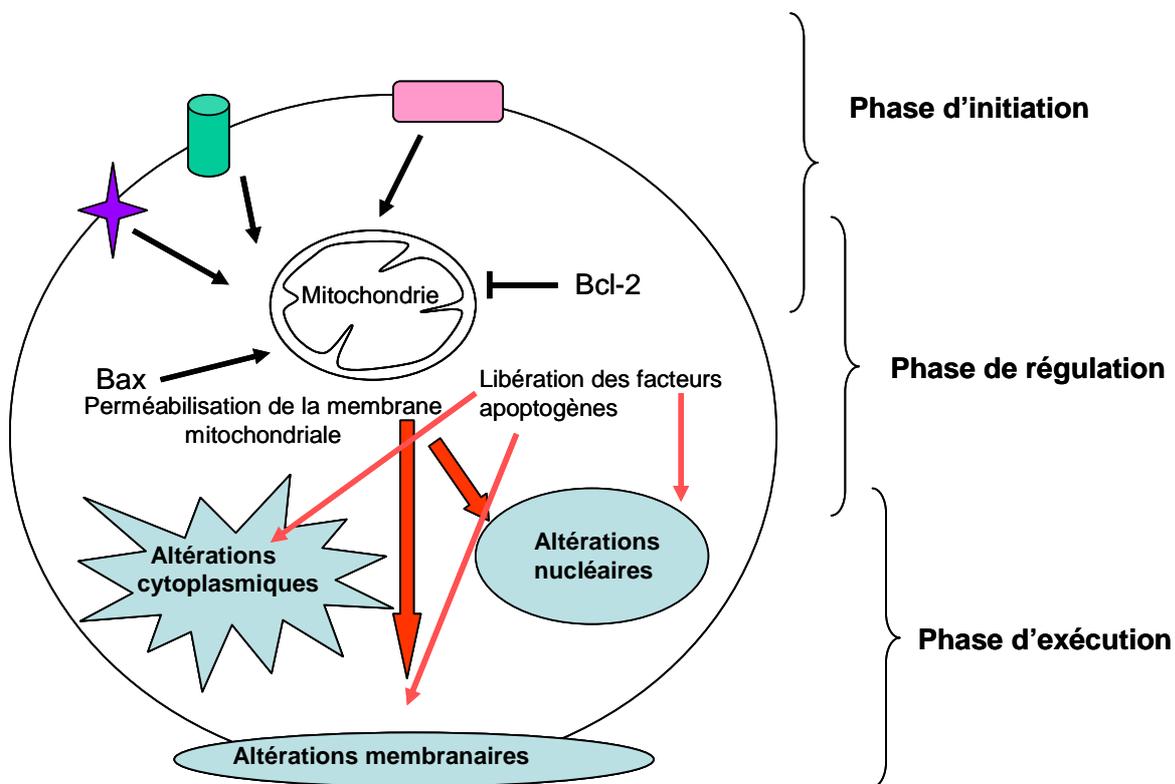


Figure 9: Les phases de l'apoptose mitochondriale (d'après Harmand, 2003).

II.2.1. La voie mitochondriale dépendante des caspases

La voie mitochondriale dépendante des caspases met en jeu de nombreuses protéines (**Figure 10**) comme le cytochrome c, Apaf-1 ou la caspase-9.

- Le cytochrome c (Cyt-c)

Le cytochrome c est codé par un gène nucléaire, transcrit puis traduit dans le cytoplasme en

un précurseur, l'apo-cytochrome c. Ce précurseur est ensuite transporté dans la mitochondrie, où il est transformé en une protéine globulaire appelée holo-cytochrome c qui permet le transport d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ravagnan *et al.*, 2002). Après un stimulus, le Cyt-c peut être transloqué de la mitochondrie vers le cytoplasme de la cellule.

Dans la majorité des cas, la libération du Cyt-c est dépendante de l'activité des caspases (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998) mais son mécanisme de libération suscite des controverses. Heiskanen *et al.* (1999) ont montré que la libération du Cyt-c et la chute du $\Delta\Psi_m$ avaient lieu en même temps. Une deuxième étude (Goldstein *et al.*, 2000) a montré quant à elle, que la libération du Cyt-c avait lieu avant la chute du $\Delta\Psi_m$.

- L'Apaf-1

Apaf-1 (« apoptosis-protease activating factor 1 ») comprend un domaine CARD dans la partie N-terminale, et un domaine C-terminal contenant plusieurs répétitions WD-40 impliquées dans les interactions protéines/ protéines (Cain *et al.*, 2002). Ces répétitions sont nécessaires à sa liaison au Cyt-c et joue également un rôle important dans le recrutement de la pro-caspase-3. Dans des conditions normales, le domaine CARD (« caspase recruitment domain ») n'est pas exposé et ne peut donc pas interagir avec la caspase-9. En présence d'ATP et de Cyt-c, Apaf-1 change de conformation et peut donc interagir avec la caspase-9 grâce à l'exposition de CARD (Li *et al.*, 1997). La partie centrale possède un domaine ATPase et l'hydrolyse de l'ATP semble être nécessaire à la formation de l'apoptosome (Hu *et al.*, 1999).

- La formation de l'apoptosome

L'apoptosome est constitué d'Apaf-1, de deux Cyt-c et de la pro-caspase-9 (Cain *et al.*, 2001). La concentration de K^+ intracellulaire inhibe la formation de l'apoptosome en réduisant l'activation des caspases. Cette inhibition peut être supprimée en présence d'une grande quantité de Cyt-c. Le Cyt-c facilite la liaison de l'ATP à Apaf-1 en favorisant l'exposition du domaine de liaison par changement de la conformation de Apaf-1. Rodriguez et Lazebnik (1999) ont montré que la caspase-9 clivée était présente dans l'apoptosome et dans le

cytoplasme, mais elle n'est réellement active que quand elle est liée à l'apoptosome.

- Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP)

Les IAPs sont des protéines qui empêchent le clivage des caspases et donc leur activité (Fesik et Shi, 2001). Elles sont constituées d'un ou plusieurs domaines BIR (« baculoviral IAP repeat ») indispensables à leur activité anti-apoptotique puisqu'ils permettent la liaison aux caspases. Chaque domaine BIR possède des fonctions distinctes et une spécificité de liaison aux caspases (Verhagen et *al.*, 2001): le domaine BIR2 inhibe les caspases-3 et -7 alors que le domaine BIR3 inhibe l'activité de la caspase-9 (Ekert et *al.*, 2001).

- Les inhibiteurs des IAPs

Smac et son homologue DIABLO bloquent l'activité anti-apoptotique des IAPs (Du et *al.*, 2000 ; Verhagen et *al.*, 2000). Smac est synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur puis est exportée dans la mitochondrie où le signal de localisation est clivé. La protéine acquiert son activité pro-apoptotique en s'homodimérisant (Chai et *al.*, 2000). Sa libération de la mitochondrie est induite par de nombreux stimuli et est contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 (Adrain et *al.*, 2001). Smac/DIABLO est la première protéine identifiée inhibant les fonctions des IAP. Elle est également liée à la voie des récepteurs de mort (Srinivasula et *al.*, 2000).

Omi/HtrA2 (« high temperature requirement protein A2 ») est également une IAP (Verhagen et *al.*, 2001 ; Martins et *al.*, 2002). Elle est synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur puis est exportée dans la mitochondrie où le signal de localisation est clivé. Dans des conditions normales, HtrA2 est séquestrée dans l'espace intermembranaire mitochondrial puis elle est libérée dans le cytosol après un stimulus (staurosporine ou irradiations UV). Dans le cytosol, HtrA2 se lie aux IAP et facilite ainsi l'activation des caspases. HtrA2 induit l'apoptose par deux mécanismes différents : d'une part, par l'inhibition des IAPs, permettant l'activation des caspases, et, d'autre part, grâce à l'activité sérine protéase indépendante de l'activité caspase (Suzuki et *al.*, 2001 ; Hegde et *al.*, 2002).

II.2.2. La voie mitochondriale indépendante des caspases

Plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases. C'est le cas de l'AIF et de l'endonucléase G (endo G) qui sont libérés de la mitochondrie puis transloqués dans le noyau provoquant la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (**Figure 10**).

- La protéine AIF

L'AIF a été identifié par Susin *et al.* (1996). Son gène est situé sur le chromosome X et code pour une protéine de 57 kDa. L'AIF est une flavoprotéine constituée de trois domaines: la séquence de signalisation de localisation mitochondriale (MLS) située sur la partie N-terminal, une séquence centrale et un domaine à activité oxydoréductase C-terminal (Lorenzo *et al.*, 1999). Le précurseur de l'AIF est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie (Susin *et al.*, 1999). Une fois dans l'espace intermembranaire, la séquence MLS est clivée, puis la protéine change de conformation. C'est une protéine bifonctionnelle ayant probablement une activité oxydoréductase et un rôle pro-apoptotique (Ye *et al.*, 2002). Après exposition de la cellule à un stimulus, l'AIF est transloqué de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Ce phénomène précède généralement la libération du cytochrome c. Le mécanisme par lequel l'AIF est transloqué vers le cytosol est encore inconnu. Le transport vers le noyau pourrait se faire grâce à une séquence de localisation nucléaire.

L'AIF induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN par interaction directe avec l'ADN (Ye *et al.*, 2002). Cette interaction se fait surtout par son domaine C-terminal. De plus, l'AIF provoque une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et donc la libération du cytochrome c et de la pro-caspase-9, grâce à un co-facteur cytosolique (Susin *et al.*, 1999). Les effets de l'AIF sont abolis par la surexpression de Bcl-2 et sont les mêmes dans des cellules ayant ou non des activités caspases: l'AIF agit donc indépendamment des caspases.

L'AIF est inhibé par Hsp70 (Ravagnan *et al.*, 2001). Ceci a été montré *in vitro* sur la condensation chromatinienne et *in vivo* au niveau nucléaire et mitochondrial par surexpression

de Hsp70. L'action d'Hsp70 sur l'apoptose s'explique premièrement par l'inhibition de la formation de l'apoptosome puisque Hsp70 se lie à Apaf-1. Mais une surexpression de Hsp70 dans des cellules n'exprimant pas de caspases prévient également de la mort cellulaire ; ceci suggère donc que Hsp70 peut se lier à d'autres protéines comme l'AIF. La liaison de Hsp70 à Apaf-1 ou à AIF semble se faire par le domaine de liaison à l'ATP présent sur Hsp70, sans intervention de l'activité chaperonne de Hsp70.

Beaucoup d'évènements concernant l'AIF sont encore inconnus, notamment son mode d'action sur l'ADN, son activité d'oxydoréductase et la transduction du signal permettant sa libération. La condensation de l'ADN observée lors de l'apoptose pourrait être expliquée par l'interaction directe de l'AIF sur l'ADN. En effet, cette interaction pourrait modifier la structure de la chromatine et favoriser l'action des nucléases.

- L'endonucléase G

L'endo G est une nucléase mitochondriale non-spécifique très conservée chez les eucaryotes (Li et *al.*, 2001). Elle est codée par un gène nucléaire et probablement impliquée dans la réplication du génome mitochondrial. Pendant l'apoptose, l'endo G est relarguée de la mitochondrie puis est transloquée dans le noyau. Elle digère l'ADN en absence d'activité caspase (van Loo et *al.*, 2001). L'endo G pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire (Widlak et *al.*, 2001) mais elle peut également générer des fragments oligonucléosomiques (Samejima et *al.*, 2001).

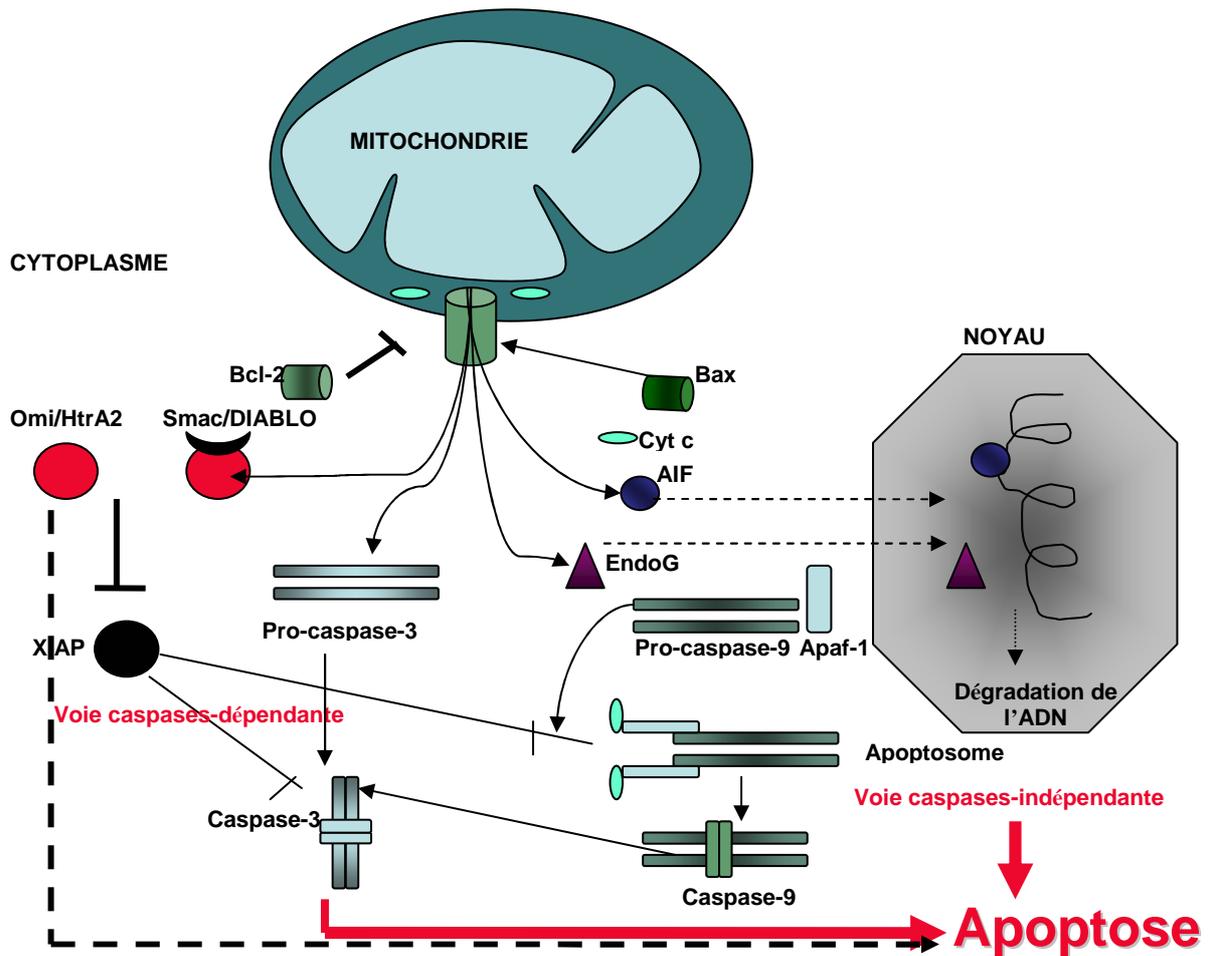


Figure 10: Représentation des voies apoptotiques mitochondriales (d'après Bellet, 2003).

II.3. La voie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique régule la synthèse et le repliement des protéines, et a un rôle de maintien de l'homéostasie calcique. Il est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit l'apoptose. Les facteurs capables de perturber son fonctionnement sont rassemblés sous le terme « ER stress ». Ces stress incluent l'inhibition de la glycosylation des protéines, la modification de l'homéostasie calcique, le blocage du transport des protéines à l'appareil de Golgi ou l'accumulation de protéines mal repliées ou dénaturées. Un stress prolongé du réticulum endoplasmique semble lié à la pathogenèse de certaines maladies neurodégénératives. Une accumulation de protéines mal repliées et

agrégées est ainsi retrouvée dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington, tout comme dans la sclérose latérale amyotrophique. Les neurones sont en effet très sensibles à l'accumulation des protéines mal repliées (Martin, 1999 ; Sherman et Goldberg, 2001 ; Taylor *et al.*, 2002).

Comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique contient des molécules pro-apoptotiques (caspase-12, p28Bap31 et GADD153) (Ng *et al.*, 1997 ; Kaufman, 1999 ; Rao *et al.*, 2001) et anti-apoptotiques (GRP78, calreticuline et DAD1) (Liu *et al.*, 1997 ; Brewster *et al.*, 2000). De plus, des études ont montré que des membres de la famille Bcl-2 (Bcl-X_L, Bax, Bak et Bik) étaient associés avec le réticulum endoplasmique pour réguler l'homéostasie calcique et la mort cellulaire (Germain et Shore, 2003 ; Scorrano *et al.*, 2003).

Un stress prolongé du réticulum endoplasmique conduit à l'apoptose par plusieurs voies. La première voie implique le facteur de transcription CHOP (« C/EBP homologous protein »)/GADD153. Il n'est pas ou peu exprimé dans les conditions physiologiques, mais suite à un stress, sa surexpression provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Barone *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1996). McCullough *et al.* (2001) ont montré que CHOP sous-régule Bcl-2 et augmente la production des espèces oxygénées réactives.

La deuxième voie passe par l'activation de la kinase c-JUN NH₂-terminale (JNK). JNK est une protéine qui régule l'expression des gènes et qui est décisionnelle entre survie ou la mort cellulaire (Oyadomari *et al.*, 2002).

La troisième voie met en jeu la caspase-12 localisée sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Cette caspase est activée après un stress au niveau du réticulum endoplasmique et non par la voie des récepteurs de mort ou par la voie mitochondriale. La caspase-12 serait activée par la m-calpaïne (« cytosolic calcium-activated neutral cysteine endopeptidase »), par IRE1 α /TRAF2 et par la caspase-7 (Nakagawa et Yuan, 2000 ; Yoneda *et al.*, 2001 ; Rao *et al.*, 2001). La m-calpaïne activée serait responsable du clivage de la pro-caspase-12 et de Bcl-X_L. Une augmentation de calcium cytosolique activerait alors la caspase-12. La protéine TRAF2 pourrait recruter et activer la caspase-12 (Yoneda *et al.*, 2001). Rao *et al.* (2001) a également décrit la translocation de la caspase-7 au niveau du réticulum

endoplasmique après un stress. Elle pourrait donc activer, par clivage, la caspase-12.

L'apoptose induite par le calcium est régulée par les membres de la famille Bcl-2. Ils agissent sur la perméabilité des membranes du réticulum endoplasmique. Une surexpression de Bcl-2 empêche la libération trop importante de calcium, alors qu'une surexpression de Bak ou de Bax induit la libération de calcium. Il pourrait donc exister une redistribution précoce de Bax et de Bak au niveau des membranes du réticulum endoplasmique lors de l'apoptose (Hajnoczky *et al.*, 2003).

III. Acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose

III.1. Les caspases

Les caspases (« cysteine aspartate-specific proteases ») sont une famille de protéines intracellulaires intervenant dans le processus de mort cellulaire après stimulus (rayons UV ou γ , molécules chimiques,...). Elles ont un rôle essentiel dans les phases d'initiation et d'exécution de l'apoptose. Le terme de caspase a été proposé par Alnemri *et al.* (1996) : le « C » représente la cystéine du site actif et « aspase » définit la spécificité du clivage après un acide aspartique. Il existe une autre protéase ayant la même spécificité : le granzyme B (sérine protéase) contenu dans les granules des cellules cytotoxiques.

III.1.1. Structure et nomenclature

La première caspase a été mise en évidence chez les mammifères grâce à son homologie avec la protéine pro-apoptotique *ced-3* du nématode *Caenorhabditis elegans* (Miura *et al.*, 1993). Il s'agit de la protéine ICE (« interleukin-1 β converting enzyme ») ou caspase-1. A ce jour, 14 caspases différentes ont été identifiées.

Les caspases sont synthétisées sous la forme de pro-caspases (zymogènes). Toutes les pro-caspases contiennent un pro-domaine N-terminal de taille et de séquence variables qui semble avoir un rôle dans les interactions protéines/ protéines, une grande sous-unité (20 kDa) portant le site catalytique et une petite sous-unité (10 kDa) sur la partie C-terminale (Thornberry, 1998). Ces deux sous-unités s'associent pour former un hétérodimère et deux hétérodimères

s'associent pour former un tétramère, qui est la forme active des caspases (Walker *et al.*, 1994).

III.1.2. Classification des caspases

Les caspases ont été classées selon la taille de leur pro-domaine (LeBlanc, 2003). Les caspases possédant un pro-domaine long (>100 acides aminés) sont les caspases dites initiatrices ou régulatrices. Ces pro-domaines contiennent des motifs spécifiques essentiels à l'activité caspasique. Ces motifs peuvent être des DED (« death effector domain ») retrouvés dans les caspases-8 et -10, ou des CARD dans les caspases-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12, -13 et -14. Les caspases initiatrices se situent en amont de la cascade de signalisation. Elles ne participent pas directement à l'apparition des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose.

Les caspases qui possèdent un pro-domaine court (<30 acides aminés) se situent en aval. Ce sont les caspases exécutrices ou effectrices. Les caspases-3, -7 et -6 sont les caspases directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose. Leur activation par les caspases initiatrices aboutit à un fonctionnement dit en cascade, phénomène irréversible. L'activation des caspases effectrices conduit au clivage de nombreuses protéines cellulaires, aboutissant aux étapes terminales et ultimes de l'apoptose.

D'autres membres incluant les caspases-1, -4, -5, -11 et -13 sont impliqués dans les processus inflammatoires, principalement dans le clivage protéolytique des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 et l'IL8 (Amarande-Mendes et Green, 1999). La caspase-12 est généralement classée dans les caspases inflammatoires, mais elle intervient également dans l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique (Nakagawa *et al.*, 2000).

III.2. Les membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 (« B-cell leukemia »/ « lymphoma 2-like proteins ») sont des protéines intracellulaires essentielles à la régulation de la survie et de l'apoptose. Cette famille est divisée en 2 groupes: les protéines possédant une activité anti-apoptotique et celles ayant une activité pro-apoptotique. Leur classification dépend de la présence ou non de domaines

BH (« Bcl-2 homology »). Quatre domaines BH ont été décrit : BH1, BH2, BH3 et BH4. Les membres de la famille Bcl-2 qui sont anti-apoptotiques (Bcl-2 ou Bcl-X_L) contiennent les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4. Deux sous-familles de membres pro-apoptotiques ont été identifiées : la sous-famille Bax (Bax, Bak, Bok) qui contient BH1, BH2 et BH3, et la sous-famille BH3-only proteins qui possède uniquement le domaine BH3, comme Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf (Ashe et Berry, 2003).

Les membres de la famille Bcl-2 sont régulés de diverses façons : contrôle transcriptionnel et post-traductionnel par des cytokines ou des facteurs de survie ou de mort, interactions protéines/protéines : l'homodimérisation permet aux protéines de s'activer et l'hétérodimérisation leur permet de s'inhiber. Des phénomènes de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la protéolyse permettent de réguler l'activité de certains membres de cette famille.

Bcl-2 semble être très souvent liée à la membrane mitochondriale, contrairement à d'autres protéines (Bax, Bid, Bad et Bim) qui sont cytosoliques mais sont transloquées dans la mitochondrie pendant l'apoptose. Ces protéines jouent un rôle important dans la transduction du signal allant du cytosol vers la mitochondrie. La translocation de ces protéines est contrôlée par des modifications post-traductionnelles. Bax est transloquée du cytosol vers la mitochondrie, modifiant sa conformation. L'externalisation de son domaine N-terminal permet son insertion au niveau de la membrane externe mitochondriale (Jürgensmeier et *al.*, 1998). Cette insertion est suivie par la libération du cytochrome c. L'étude de Rosse et *al.* (1998) a montré que Bcl-2 avait également la possibilité d'empêcher l'activation des caspases sans aucun effet sur la libération du cytochrome c.

La complexité des protéines de la famille de Bcl-2 conduit à des incertitudes sur leurs rôles exacts dans l'apoptose mais il est indiscutable qu'elles interviennent dans l'exécution de la mort cellulaire programmée (Ashe et Berry, 2003)

III.3. Les protéines de choc thermique (Hsp)

III.3.1. Généralités

Les protéines de stress ou Hsp (« heat shock protein ») sont très conservées au cours de l'évolution et sont classées en fonction de leur poids moléculaire. Dans les conditions normales, certaines Hsp (Hsp90, 70, 60 et 27) ont un rôle de chaperonne. Elles sont chargées du bon repliement des protéines, de leur translocation, de l'activation de protéines régulatrices comme les facteurs de transcription et de la dégradation des protéines (Helmbrecht *et al.*, 2000 ; Jolly et Morimoto, 2000).

Elles agissent également après un stress, qu'il soit physique (le plus typique étant l'élévation de température) ou chimique, en protégeant les cellules. Elles vont agir sur les protéines altérées afin d'éviter leur agrégation (Skowyra *et al.*, 1990) ou rétablir leurs fonctions en se liant aux protéines dénaturées (Parsell et Lindquist, 1993).

Les plus connues et les plus conservées sont Hsp70 et Hsp27. Leur expression est induite par différents stress, tels que l'hyperthermie, le stress oxydatif, la staurosporine ou les irradiations UV (Garrido *et al.*, 1996, 1997 ; Mehlen *et al.*, 1996).

III.3.2. Hsp70

Les membres de la famille de Hsp70 sont HSP70 inductible, HSC70 (forme exprimée de façon constitutive), HSP75 (dans la mitochondrie) et GRP78 (dans le réticulum endoplasmique). Dans des conditions normales, Hsp70 participe au repliement des protéines nouvellement synthétisées, à l'assemblage des complexes protéiques et au transport des protéines à travers la membrane (Beckmann *et al.*, 1990 ; Shi et Thomas, 1992). Son activité chaperonne est régulée par des co-chaperonnes telles que Hip, CHIP ou Bag-1 (Garrido *et al.*, 2003) qui se lient au domaine ATPase de HSP70 et augmentent l'affinité pour le substrat.

Hsp70 a un rôle anti-apoptotique (**Figure 11**). Une expression élevée de Hsp70 et de Hsp90 a été détectée dans plusieurs types de cancers (Jolly et Morimoto, 2000). Une surexpression de Hsp70 induit la transformation cellulaire dans quelques types de cancers (Jaattela, 1995) en agissant sur le cycle cellulaire. Récemment, il a été décrit que Hsp70 pouvait réguler

négativement différentes étapes de la voie apoptotique dépendante ou indépendante de p53 (Beere *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2000). L'effet anti-apoptotique de Hsp70 ne modifie pas la libération du cytochrome c ni la quantité de caspase activée d'après l'étude de Jaattela *et al.* (1998). Beere *et al.* (2000) ont montré qu'Hsp70 supprimait l'apoptose en s'associant avec l'Apaf-1, ce qui empêche le recrutement puis l'activation de la pro-caspase-9 et donc l'assemblage d'un apoptosome fonctionnel.

Toutefois, les Hsp n'ont pas qu'un rôle anti-apoptotique. Liossis *et al.* (1997) ont montré que la surexpression de Hsp70 permet à la cellule d'acquérir une thermotolérance mais augmente la mort cellulaire par apoptose induite par Fas. De même une surexpression de hsp90 augmente l'apoptose quand les cellules sont traitées avec une combinaison de TNF α et de cycloheximide (Galea-Lauri *et al.*, 1996).

III.3.3. Hsp27

Hsp27 fait partie de la famille des petites Hsp. Ces chaperonnes sont ATP indépendantes et protègent les cellules des agrégations de protéines (Ehrnsperger *et al.*, 1997). L'affinité des petites Hsp pour les protéines est déterminée par leur oligomérisation. Un oligomère (>1000 kDa) de Hsp27 confère une thermoprotection (Parcellier *et al.*, 2003).

Hsp 27 interagit directement avec plusieurs effecteurs apoptotiques (**Figure 11**). Elle peut inhiber le cytochrome c, empêcher la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases (Garrido *et al.*, 1999 ; Bruey *et al.*, 2000). Des études ont montré que Hsp27 augmente les défenses cellulaires en diminuant la quantité d'espèces oxygénées réactives (Mehlen *et al.*, 1996). Elle neutralise également les effets toxiques des protéines oxydées (Rogalla *et al.*, 1999). Ce dernier rôle est plus particulièrement retrouvé dans les cellules neuronales, où son effet protecteur ne dépend pas de son interaction avec le cytochrome c mais de son état de phosphorylation (Wytenbach *et al.*, 2002). Le rôle cytoprotecteur de Hsp27 est également lié à sa capacité à stabiliser les microfilaments d'actine pendant un stress induit par l'hyperthermie ou la cytochalasine B (Lavoie *et al.*, 1993 ; Guay *et al.*, 1997).

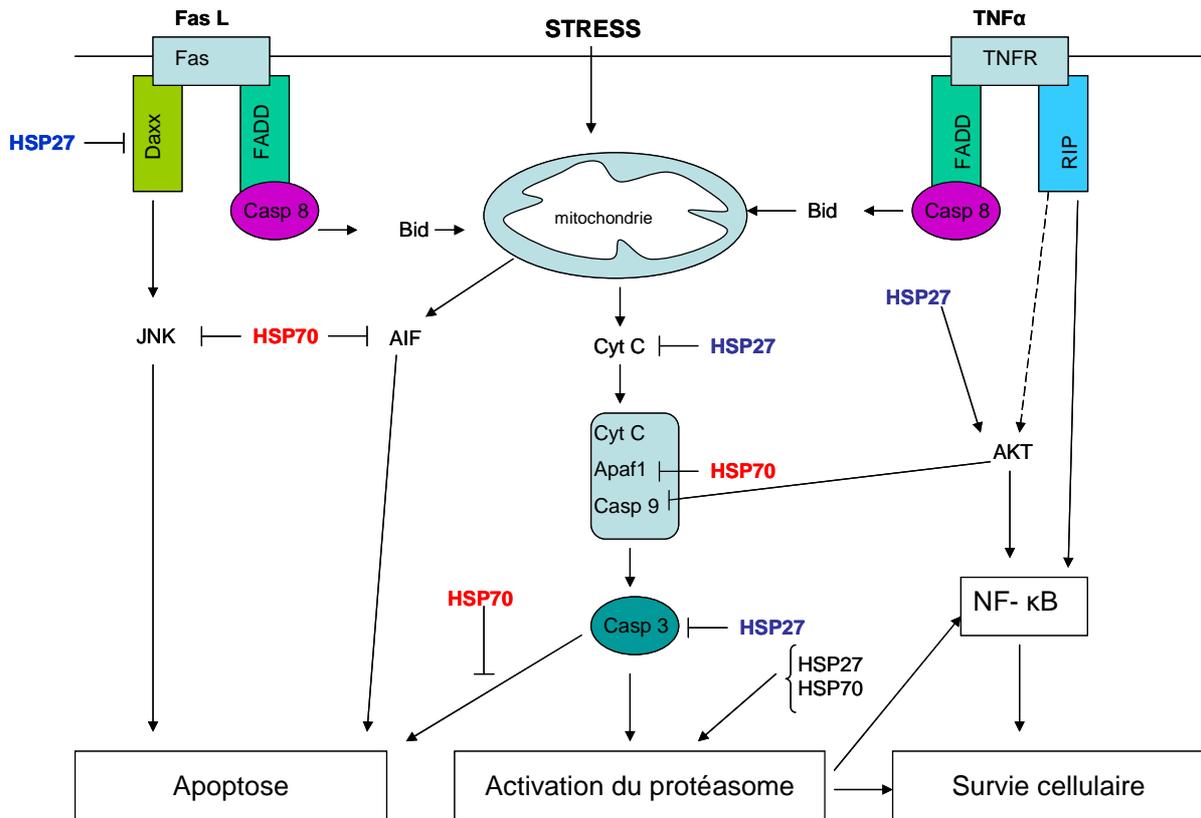


Figure 11: Action des HSP27 et HSP70 sur les protéines clé de l'apoptose (d'après Garrido *et al.*, 2003).

IV. Les techniques de détection de l'apoptose

IV.1. Evolution chronologique des techniques de détection

Depuis sa première description (Kerr *et al.*, 1972), les outils de détection se sont développés (Figure 12). Les premières techniques mettaient en évidence les modifications morphologiques des cellules en apoptose, telles que la condensation du noyau ou la formation des corps apoptotiques. Des techniques plus récentes permettent de détecter des modifications au sein des cellules, notamment au niveau mitochondrial avec la libération du cytochrome c ou de l'AIF.

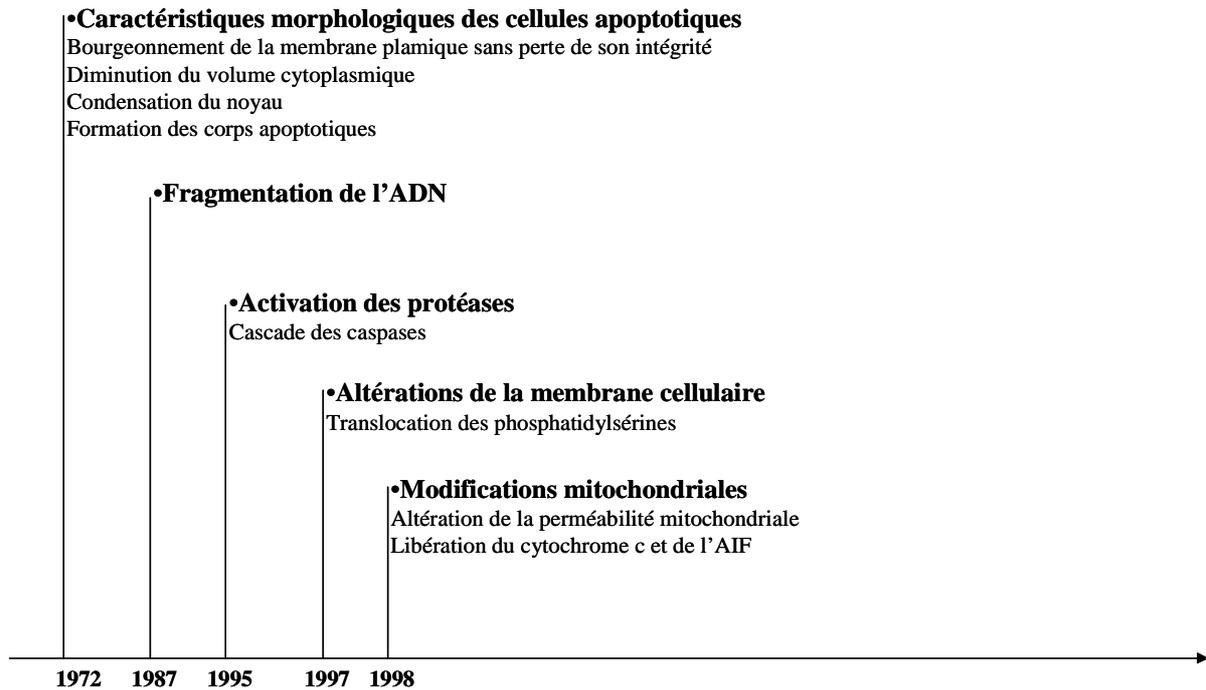


Figure 12 : Outils pour la détection de l'apoptose.

IV.2. Quelques techniques de détection

Il existe de nombreuses techniques, permettant l'étude d'une étape précise de l'apoptose. Quelques unes d'entre elles sont mentionnées ci-dessous.

IV.2.1. Altérations membranaires

Pendant les stades précoces de l'apoptose, il y a translocation des phosphatidylsérines (PS) du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe. L'annexine V est une protéine qui se lie aux PS exposés à la surface des cellules apoptotiques. Ce phénomène a également lieu pendant la nécrose mais une discrimination est possible grâce à un double marquage avec un marqueur de viabilité (iodure de propidium).

Ce marquage peut être visualisé par microscopie en fluorescence, microscopie confocale ou cytométrie de flux. C'est une technique fiable pour des cellules non adhérentes. En revanche, dans le cas de cellules adhérentes, il est nécessaire de les décoller du support, ce qui peut entraîner des biais dans les résultats.

IV.2.2. Activation des caspases

Les caspases sont synthétisées sous la forme de pro-enzymes inactives. Après clivage, elles donnent deux sous-unités qui s'associent pour donner la forme active des caspases. Les caspases interviennent dans des phases précoces. Plusieurs techniques peuvent être utilisées :

- dosage de l'activité des caspases, notamment de la caspase-3, par quantification du substrat clivé (fluorimétrie, colorimétrie) ;
- mise en évidence des caspases actives (immunohistochimie, western blot,...) ;
- détection d'un produit de clivage tel que la PARP (poly ADP-ribose polymérase) : les caspases clivent la PARP en deux fragments de 85 et 25 kDa. Il est possible de détecter le fragment de 85 kDa, qui est un marqueur précoce de l'apoptose en immunofluorescence ou western blot.

IV.2.3. Modifications mitochondriales

Ces modifications concernent essentiellement la chute du potentiel membranaire (mise en évidence par la rhodamine 123 ou le DIOC₆(3) par exemple), la libération du Cyt-c et la libération éventuelle de l'AIF. Le Cyt-c et l'AIF peuvent être détectés en immunofluorescence ou western blot.

IV.2.4. Marquage de l'ADN

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- coloration avec le bleu trypan ou l'iodure de propidium, qui ne pénètrent dans la cellule que si la membrane est endommagée (microscopie, cytométrie en flux) ;
- contenu en ADN : en cas d'apoptose, un pic en sub-G1 est détectable par marquage à l'acridine orange, le DAPI ou l'iodure de propidium (cytométrie de flux) ;
- morphologie du noyau, avec la visualisation des noyaux condensés ou fragmentés par marquage au DAPI ou à l'iodure de propidium (microscopie, cytométrie en flux).

IV.2.5. Fragmentation de l'ADN

Pendant le processus apoptotique, des endonucléases spécifiques sont activées et induisent la fragmentation de l'ADN. Les fragments peuvent être mis en évidence par plusieurs techniques :

- TUNEL : la TdT (terminal déoxynucléotidyl transférase) catalyse la polymérisation de désoxynucléotides couplés à la fluorescéine aux extrémités 3'-OH libres (microscopie, cytométrie en flux) ;
- « DNA ladder »: électrophorèse sur gel d'agarose permettant de visualiser les fragments de 180 paires de bases ;
- ELISA : quantification des nucléosomes.

IV.2.6. Détection des protéines liées à l'apoptose :

De nombreuses protéines interviennent dans l'expression et la régulation de l'apoptose : Bcl-2, p53, c-myc, récepteur (Fas). Leur étude (immunofluorescence, western blot,...) peut permettre de détecter l'apoptose et les mécanismes mis en jeu.

IV.3. Techniques utilisées dans l'étude

Il est préconisé d'utiliser au moins deux techniques pour éliminer d'éventuels faux positifs. Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser quatre méthodes différentes.

IV.3.1. Marquage DAPI

Le DAPI est un fluorochrome qui se fixe spécifiquement sur l'ADN ($\lambda_{\text{excitation}} = 372 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 456 \text{ nm}$). Il permet de visualiser les noyaux et donc leurs éventuelles condensation et fragmentation. Cette méthode est une première approche simple qui permet d'avoir une première idée de l'existence ou non de l'apoptose après un traitement ou une exposition à des toxiques.

IV.3.2. Double marquage TUNEL + iodure de propidium

La cytométrie en flux permet de quantifier la population cellulaire apoptotique (doublement

marquée). Cette méthode détecte l'apoptose en phase tardive.

IV.3.3. Dosage de l'activité caspase-3

Ce dosage a été réalisé en fluorimétrie, plus sensible que la colorimétrie.

IV.3.4. Marquage de l'AIF

Le marquage de l'AIF a été réalisé en immunofluorescence et western blot.

Les deux premières méthodes concernent la première approche de détection au niveau physiologique. Les deux dernières méthodes concernent l'étude des protéines impliquées dans le processus apoptotique.

Chapitre C : Objectif et mise au point du protocole d'exposition

I. Objectif de l'étude

Sur le système nerveux, plusieurs études ont été réalisées concernant l'effet des radiofréquences, notamment sur la prolifération cellulaire qui est à l'origine des tumeurs. Concernant l'apoptose neuronale, une seule étude a été publiée (Merola *et al.*, 2006) sur la lignée cellulaire LAN-5 (issue de neuroblastome). Cette étude a donné des résultats négatifs sur l'induction de l'apoptose par les radiofréquences. Dans le chapitre B, il a été montré qu'un excès d'apoptose neuronale interviendrait dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose amyotrophique latérale. Dans un premier temps, il est donc important d'étudier si les radiofréquences peuvent induire *in vitro* l'apoptose neuronale, dans des conditions non thermiques.

II. Mise au point du protocole d'exposition

Notre étude a été réalisée sur deux types cellulaires (cellules issues de la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y et neurones corticaux de rat) exposés dans les mêmes conditions : 900 MHz, DAS maximal de 2 W/kg, ondes continues (CW) ou modulées (de type GSM), même système d'exposition (cellule fil-plaque).

Cette étude a nécessité la mise au point du protocole d'exposition avec ces deux types d'ondes. Le DAS choisi est de 2 W/kg, que ce soit en CW ou en GSM, où il représente le DAS crête, soit une moyenne de 0,25 W/kg. La température pendant l'exposition est un paramètre important, qu'il est nécessaire de vérifier. Pour cela, une sonde à fibres optiques (Luxtron), placée à l'intérieur des boîtes exposées, permet d'effectuer un relevé pendant toute la durée de l'exposition. Après vérification, l'exposition en CW est caractérisée par une élévation de la température de 2°C par rapport aux boîtes non exposées. Etant donné la configuration du système d'exposition, un procédé de refroidissement était difficile à installer.

Le choix s'est donc porté sur un contrôle supplémentaire. L'exposition des cultures en CW a donc nécessité de comparer les effets sur 4 types de cellules : des cellules exposées aux radiofréquences, des cellules pseudo-exposées (sham), des cellules placées à 39°C et des cellules témoins (placées à 37°C).

L'exposition en GSM ne provoque pas d'élévation de la température dans les cultures exposées aux radiofréquences.

Après avoir réalisé des expositions de 8, 24 et 48 heures, nous avons constaté que le taux d'apoptose était plus élevé après 24 heures d'exposition. Nous avons donc choisi d'exposer les cellules 24 heures aux radiofréquences. Par ailleurs, nous avons réalisé une courbe du taux d'apoptose en fonction de la durée post-exposition (0, 8, 16, 24, 48 et 72 heures) et nous avons constaté que le taux maximal était obtenu après 24 heures d'exposition. Les taux d'apoptose ont donc été étudiés à 0 et 24 heures post-exposition.

Résultats expérimentaux

Publication 1

Microwave exposure of neuronal cells *in vitro*: study of apoptosis.

Vanessa Joubert, Philippe Leveque, Armelle Rametti, Alice Collin, Sylvie Bourthoumieu & Catherine Yardin

International Journal of Radiation Biology 2006; **82**(4): 267-275.

RESUME

Des cellules SH-SY5Y (issues de neuroblastome humain) ont été exposées à 900 MHz avec des ondes continues (CW) ou pulsées de type GSM, pendant 24 heures dans une cellule fil-plaque. Le DAS maximum utilisé était de 2 W/kg (soit 0,25 W/kg en moyenne en GSM). Pendant l'exposition en CW, une élévation de 2°C a été détectée dans les cultures exposées. Un contrôle a donc été réalisé avec des cellules exposées à 39°C. L'apoptose a été étudiée immédiatement et 24 heures après l'exposition, en utilisant trois techniques : (i) le marquage des noyaux au DAPI, (ii) le double marquage TUNEL et iodure de propidium et l'analyse en cytométrie de flux et (iii) le dosage de l'activité de la caspase-3 en fluorimétrie.

Aucune différence significative du taux d'apoptose n'a été détectée entre les cellules témoins et les cellules exposées aux radiofréquences, que ce soit à 0 ou 24 heures après exposition, quelle que soit la forme du signal (CW ou GSM). De plus, concernant l'exposition en CW, aucune différence significative n'a été observée entre les cellules témoins, les cellules exposées aux radiofréquences et les cellules exposées à 39°C. Les trois méthodes utilisées donnent des résultats similaires.

Cette étude montre que, dans les conditions expérimentales utilisées, les radiofréquences n'induisent pas l'apoptose des cellules SH-SY5Y.

Publication 2

No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields.

Vanessa Joubert, Philippe Leveque, Marylene Cueille, Sylvie Bourthoumieu & Catherine Yardin

Bioelectromagnetics (sous presse)

RESUME

Des cultures de neurones primaires de rat, réalisées à partir de prélèvement de cortex sur des embryons à 17 jours de gestation, ont été exposées à 900 MHz avec des ondes de type GSM, pendant 24 heures dans une cellule fil-plaque. Le DAS moyen utilisé était de 0,25 W/kg, soit 2 W/kg crête. L'apoptose a été étudiée immédiatement et 24 heures après l'exposition, en utilisant trois techniques spécifiques de trois étapes du processus apoptotique: (i) la condensation du noyau avec le marquage au DAPI, (ii) la fragmentation de l'ADN avec le double marquage TUNEL et iodure de propidium puis l'analyse en cytométrie de flux et (iii) le dosage de l'activité de la caspase-3 en fluorimétrie.

Aucune élévation de la température n'a été notée au cours de l'exposition. Aucune différence significative du taux d'apoptose n'a été détectée entre les cellules témoins et les cellules exposées aux radiofréquences, que ce soit à 0 ou 24 heures après exposition. Les trois méthodes utilisées donnent des résultats similaires et reproductibles.

Cette étude montre que, dans les conditions expérimentales utilisées, l'exposition *in vitro* à un signal GSM-900 avec un DAS moyen de 0,25 W/kg pendant 24 heures, n'induit pas l'apoptose des neurones corticaux de rat, que ce soit à 0 ou 24 heures après exposition.

Publication 3

Apoptosis is induced by radiofrequency *via* caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons.

Vanessa Joubert, Armelle Rametti, Philippe Leveque, Sylvie Bourthoumieu & Catherine Yardin

Soumise

RESUME

Des neurones corticaux de rat, prélevés sur des embryons à 17 jours de gestation, ont été exposés à 900 MHz avec des ondes continues (CW), pendant 24 heures dans une cellule fil-plaque. Le DAS utilisé était de 2 W/kg. Une élévation de température de 2°C a été détectée dans les cultures exposées en CW. Un contrôle a donc été réalisé avec des cellules exposées à 39°C. L'apoptose a été étudiée immédiatement et 24 heures après l'exposition, en utilisant des techniques spécifiques de deux étapes du processus apoptotique: (i) la condensation du noyau avec le marquage au DAPI, (ii) la fragmentation de l'ADN avec le double marquage TUNEL et iodure de propidium et l'analyse en cytométrie de flux.

Une différence significative du taux d'apoptose a été observée entre les neurones exposés en CW et les témoins (comprenant les neurones exposés à la chaleur), que ce soit à 0 ou 24 heures après exposition, en utilisant les deux techniques. Afin de déterminer la voie apoptotique impliquée, le dosage de l'activité de la caspase-3 et le marquage de l'AIF ont été réalisés. Aucune augmentation de l'activité de la capase-3 n'a été observée, alors que le pourcentage de noyau AIF positifs obtenus dans les neurones exposés en CW était augmenté de 3 à 7 fois, en comparaison avec les autres conditions.

Cette étude montre que, dans les conditions expérimentales utilisées, l'apoptose des neurones corticaux de rat pourrait être induite par l'exposition en CW (DAS de 2 W/kg), *via* la voie apoptotique mitochondriale indépendante des caspases impliquant l'AIF.

Discussion générale

Nos résultats montrent que l'exposition des deux types cellulaires à un signal GSM-900 pendant 24 heures avec un DAS moyen de 0,25 W/kg n'induit pas l'apoptose, que ce soit à 0 ou 24 heures post-exposition. Le taux d'apoptose a été déterminé en utilisant trois méthodes spécifiques d'étapes précises du déroulement de l'apoptose : marquage au DAPI pour la condensation du noyau, TUNEL et cytométrie de flux pour la fragmentation de l'ADN et dosage de l'activité caspase-3. Ces trois méthodes ont donné des résultats concordants.

Contrairement à l'exposition en GSM, l'exposition en CW a donné des résultats différents en fonction du type cellulaire : contrairement aux cellules SH-SY5Y, l'induction de l'apoptose par les radiofréquences a été observée à 0 et 24 heures post-exposition dans les neurones corticaux de rat.

Nous allons maintenant discuter nos résultats et les comparer aux données de la littérature.

I. Radiofréquences, apoptose et lignées cellulaires

Une étude récente donne des résultats similaires à ceux que nous avons obtenus sur la lignée SH-SY5Y. Merola *et al.* (2006) ont exposé des cellules LAN-5 (issues de neuroblastome humain) à 900 MHz en GSM, avec un DAS de 1 W/kg pendant 24, 48 et 72 heures. Ils n'ont pas observé d'induction de l'apoptose.

En revanche, Maeda *et al.* (2004) ont trouvé que les cellules LoVo (issues d'une lignée d'adénocarcinome humain) exposées à 2,5 GHz montrent une augmentation significative du taux d'apoptose. Les auteurs concluent que les radiofréquences pourraient devenir un outil dans la thérapie du cancer du colon. Cependant, aucun détail n'est donné sur le système et la durée d'exposition ni sur le DAS utilisé. Une étude intéressante (Marinelli *et al.*, 2004) sur les cellules CCRF-CEM (lignée lymphoblastoïde, connue pour être particulièrement sensible aux ondes électromagnétiques), a montré qu'une courte exposition (900 MHz, CW, 3,5 mW/kg, 2 heures) induisait une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose, secondaire à l'activation précoce des voies p53-dépendante et indépendante. Pour des expositions plus longues (24 et 48 heures), une augmentation de la synthèse d'ADN avait lieu avec activation des voies de survie. Ce travail est en accord avec celui de Caraglia *et al.* (2005). Les auteurs

ont rapporté que l'apoptose était induite dans les cellules KB (issues d'un carcinome humain) par les radiofréquences : après 1 heure d'exposition à 1,95 GHz avec un DAS de 3,6 W/kg, 20% des cellules sont apoptotiques, et 40% après 3 heures d'exposition. Ils ont observé une diminution de l'expression de Hsp90 et une augmentation de la dégradation des protéines « clientes de Hsp90 » par le protéasome.

La survie cellulaire dépend de la balance entre les signaux pro- et anti-apoptotiques et est d'un intérêt particulier pour étudier les effets des radiofréquences sur la signalisation apoptotique. Ivaschuk *et al.* (1997) ont exposé des cellules PC12 (cellules de phéochromocytome de rat) traitées avec le NGF (nerve growth factor), à 836,55 MHz en TDMA pendant 20, 40, et 60 minutes et ont étudié l'expression des gènes pro-apoptotiques c-fos et c-jun. Aucune modification des niveaux d'ARNm de c-fos n'a été détectée après 20 minutes d'exposition alors que le niveau d'ARNm de c-jun était diminué de 38% après 20 minutes d'exposition. Une autre étude intéressante a concerné l'expression de gènes apoptotiques après exposition aux radiofréquences dans des cellules souches embryonnaires déficientes pour p53 (Czyz *et al.*, 2004). Les résultats montrent que les radiofréquences induisent une sur-régulation des niveaux d'ARNm de hsp70 et une augmentation transitoire de c-myc, c-jun et p21 dans les cellules déficientes pour p53 mais pas dans les cellules sauvages. Les auteurs concluent que le « bagage » génétique pourrait déterminer la réponse cellulaire aux radiofréquences.

Les différentes études sont récapitulées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4: Radiofréquences, apoptose et lignée cellulaire.

| Auteurs | Conditions d'exposition | Modèles | Résultats |
|--------------------------------|---|--|--|
| Ivaschuck <i>et al.</i> (1997) | 836.55 MHz ; TDMA ; 20, 40 et 60 min | Lignée PC12 | Pas d'effet sur ARNm de c-fos Diminution de ARNm de c-jun après 20 minutes |
| Czyz <i>et al.</i> (2004) | 1.71 GHz ; GSM-Basic (1.5 W/kg) ; GSM-DTX (0.11 W/kg) ; GSM-Talk (0.4 W/kg) | Cellules souches embryonnaires (ESC) sauvages ou déficientes pour le gène p53 Cellules embryonnaires carcinogènes | Induction de l'expression de gènes de réponse précoce et de gènes de stress. Pas d'effet dans les ESC sauvages et cellules embryonnaires carcinogènes |
| Maeda <i>et al.</i> (2004) | 2.5 GHz | Lignée LoVo | Augmentation de l'apoptose |
| Marinelli <i>et al.</i> (2004) | 900 MHz ; CW ; 3.5 W/kg ; 2, 24 et 48 h | Lignée CCRF-CEM | Augmentation de l'apoptose après 2 h Activation des voies de survie après 24 et 48 h |
| Caraglia <i>et al.</i> (2005) | 1.95 GHz ; CW ; 3.6 W/kg | Lignée KB | 20% de cellules apoptotiques après 1 h 40% de cellules apoptotiques après 3 h |
| Merola <i>et al.</i> (2006) | 900 MHz; GSM; 1 W/kg; 24, 48 et 72 h | Lignée LAN-5 | Pas d'effet |

II. Radiofréquences, hsp et conformation des protéines

Face à une situation qui peut compromettre la survie cellulaire (hyperthermie, ischémie, processus inflammatoire), les cellules expriment des protéines dites de choc thermique (Hsp) (**voir Chapitre B, III.3**). Une élévation de température induit les Hsp et provoque l'altération des protéines. Les Hsp vont donc se lier aux protéines dénaturées pour restituer leur fonction en rétablissant leur conformation.

Dans des conditions athermiques, Cleary *et al.* (1997) n'ont pas trouvé de modification de l'expression des Hsp en utilisant une séparation électrophorétique des protéines dans des cellules CHO et HeLa S-3 après exposition aux radiofréquences (CW, 27 MHz, DAS de 25 et 100 W/kg pendant 2 heures pour les deux lignées ; et CW, 2450 MHz pendant 2 heures pour les cellules HeLa). Cependant, les auteurs n'ont utilisé aucun anticorps contre les Hsp et leurs conclusions sont basées uniquement sur le poids moléculaire des protéines. L'étude de Tian *et al.* (2002) est également controversée. Ils ont exposé des cellules MO54 (issues de gliome humain) à 2450 MHz en CW pendant des durées variables (2, 4, 8 et 16 heures) avec des DAS de 5, 20, 50 et 100 W/kg. Les auteurs ont constaté une augmentation de Hsp70 pour des DAS supérieurs à 20 W/kg et non pour des DAS inférieurs à 20 W/kg. Toutefois les niveaux de DAS étant élevés, il peut être supposé qu'une élévation de température est la cause de ces résultats. Une deuxième étude (Miyakoshi *et al.*, 2005) a été réalisée sur ce même type cellulaire, dans le cadre du programme européen REFLEX, donnant des résultats contredisant ceux de Tian *et al.* (2002). En effet, Miyakoshi *et al.* (2005) ont étudié l'expression de Hsp27 et de Hsp70, dans des cellules MO54 exposées à 1950 MHz en CW, avec des DAS de 1, 2 et 10 W/kg pendant 10 minutes, 30 minutes, 1 heure et 2 heures. Les auteurs n'ont trouvé aucune modification de la prolifération cellulaire ni de l'expression de Hsp27 et Hsp70 dans les conditions testées. En outre, de Pomerai *et al.* (2000) ont mis en évidence l'induction des Hsp par les radiofréquences (2-20 h, 750-100 MHz, 0,5 W/kg) dans *Caenorhabditis elegans*, mais ont conclu plus tard que ceci était le résultat de l'altération de la conformation des protéines. L'exposition aux radiofréquences augmente l'agrégation de l'albumine bovine sérique. De plus, cette action des radiofréquences sur le repliement des

Tableau 5: Radiofréquences, Hsp et conformation des protéines.

| Auteurs | Conditions d'exposition | Modèles | Résultats |
|---------------------------------|---|-------------------------------|--|
| Cleary <i>et al.</i> (1997) | 27 MHz ; CW ; 25 et 100 W/kg ; 2 h 2450 MHz ; CW ; 2 h | CHO HeLa S-3 | Pas d'effet |
| De Pomerai <i>et al.</i> (2000) | 750-100 MHz ; 0.5 W/kg ; 2 et 20 h | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Induction des Hsp |
| Tian <i>et al.</i> (2002) | 2450 MHz ; CW ; 2, 4, 8 et 16 h ; 5, 20, 50 et 100 W/kg | MO54 | Augmentation de Hsp70 pour DAS>20 W/kg |
| De Pomerai <i>et al.</i> (2003) | | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Modification de la conformation des protéines |
| Mancinelli <i>et al.</i> (2004) | 900 MHz ; 0.3 et 1 W/kg | Myoglobine | Modification du repliement |
| Belyaev <i>et al.</i> (2005) | 915 MHz ; GSM modulé ; 37 mW/kg ; 2 h | Lymphocytes humains | Modification de la conformation de la chromatine |
| Miyakoshi <i>et al.</i> (2005) | 1950 MHz ; CW ; 10 et 30 min ; 1 et 2 h ; 1, 2 et 10 W/kg | MO54 | Pas d'effets sur l'expression de Hsp27 et Hsp70 |

protéines a été retrouvée pour la myoglobine (Mancinelli *et al.*, 2004). D'un autre côté, l'exposition à 915 MHz modulé, avec un DAS de 37 mW/kg pendant 2 heures de lymphocytes humains, n'induisait pas de réponse apoptotique mais des changements de conformation de la chromatine et une diminution de la liaison entre p53 et la protéine foci 1 était observée Belyaev *et al.* (2005).

Ces études sont récapitulées dans le **Tableau 5**.

Notre travail a montré que l'exposition en CW avec un DAS de 2 W/kg induisait une élévation de température de 2°C dans les cultures exposées. Nous avons donc envisagé d'étudier l'induction des Hsp et notamment de Hsp70 qui est majoritaire dans le système nerveux.

III. Radiofréquences, lésions de l'ADN et apoptose

En cas de lésions de l'ADN, telles que les cassures simple-ou double-brins, l'apoptose peut être induite pour protéger l'organisme. L'effet des radiofréquences sur l'induction de ces lésions a été très étudié (**Tableau 6**). Nous nous intéresserons plus particulièrement aux études utilisant le test des comètes qui est une migration sur gel, permettant de visualiser les cassures de l'ADN.

Phillips *et al.* (1998) ont exposé des cellules Molt-4 à deux signaux (iDEN à 2,4 et 24 mW/kg et TDMA à 2,6 et 26 mW/kg) et ont observé une augmentation des cassures pour l'exposition au signal iDEN (26 mW/kg) et une diminution pour les autres conditions. Contrairement à cette étude, Hook *et al.* (2004) n'ont pas trouvé de cassures de l'ADN mesurables dans des cellules Molt-4 exposées à quatre formes de signal modulé. Des résultats comparables ont été obtenus dans des fibroblastes murins avec une exposition à 2450 MHz en CW avec un DAS de 1,9 W/kg (Li *et al.*, 2001 ; Lagroye *et al.*, 2004a). En outre, aucune lésion de l'ADN n'a été détectée dans des cellules de cerveau de rats (2450 MHz, DAS de 1,2 W/kg) (Lagroye *et al.*, 2004b), dans des lymphocytes humains (935 MHz, GSM, 1-2 W/kg, 24 h avec ou sans rayons X) (Stronati *et al.*, 2006) et dans des leucocytes humains exposés à 900 MHz avec des DAS de 0,3 et 1 W/kg (Zeni *et al.*, 2005). Cependant, une étude récente (Diem *et al.*, 2005) a

montré que les radiofréquences modulées induisaient des cassures simple- et double-brin dans l'ADN de cellules de granulosa de rat et dans des fibroblastes humains.

Un travail initié dans notre laboratoire s'intéresse à cet aspect, en étudiant les caryotypes de cellules humaines de type fibroblastique : les amniocytes, après exposition aux radiofréquences. En effet, les cassures éventuelles des chromosomes peuvent être dues à des cassures de l'ADN. Le caryotype constitue une technique fiable et exhaustive pour visualiser les cassures et les remaniements chromosomiques ainsi que les anomalies de nombre.

Tableau 6: Radiofréquences et lésions de l'ADN.

| Auteurs | Conditions d'exposition | Modèles | Résultats |
|-------------------------------|---|--|---|
| Phillips <i>et al.</i> (1998) | 813.56 MHz (iDEN ; 2.4 et 24 mW/kg) ; 836.55 MHz (TDMA ; 2.6 et 26 mW/kg) ; 2 et 21 h | Lignée Molt-4 | Diminution des lésions de l'ADN (de type cassures) sauf pour iDEN, 26 mW/kg où il y a une augmentation. |
| Li <i>et al.</i> (2001) | 2450 MHz ; CW ; 1.9 W/kg | Fibroblastes murins | Pas d'effets |
| Hook <i>et al.</i> (2004) | 847.74 MHz (CDMA ; 3.2 W/kg) ; 835.62 MHz (FDMA ; 3.2 W/kg) ; 813.56 MHz (iDEN ; 2.4 et 24 mW/kg) ; 836.55 MHz (TDMA ; 2.6 et 26 mW/kg) ; 2 et 21 h | Lignée Molt-4 | Pas d'effets |
| Lagroye <i>et al.</i> (2004a) | 2450 MHz ; CW ; 1.9 W/kg | Fibroblastes murins | Pas d'effets |
| Lagroye <i>et al.</i> (2004b) | 2450 MHz ; 1.2 W /kg | Cellules de cerveau de rat | Pas d'effet |
| Diem <i>et al.</i> (2005) | 1800 MHz; exposition continue ou intermittente (5 min on/ 10 min off); CW; GSM basic; GSM talk; 2 W/kg; 4- et 24 h | Cellules de granuloza de rat Fibroblastes humains | Cassures simple et double-brin |
| Zeni <i>et al.</i> (2005) | 900 MHz ; 0.3 et 1 W/kg | Leucocytes humains | Pas d'effet |
| Stronati <i>et al.</i> (2006) | 935 MHz; GSM; 24 h; 1 et 2 W/kg | Lymphocytes humains | Pas d'effet |

IV. Potentialisation par les radiofréquences de l'apoptose induite par un autre agent

Les radiofréquences sont susceptibles d'induire des modifications dans la réponse cellulaire aux agents apoptotiques, notamment en potentialisant l'effet des inducteurs d'apoptose comme les UV ou la staurosporine, que nous avons utilisée en contrôle positif.

Peinnequin *et al.* (2000) ont montré que les radiofréquences (CW, 2,45 GHz, DAS de 4 W/kg pendant 48 heures) augmentent légèrement la sensibilité des cellules Jurkat à l'apoptose induite par Fas mais pas par le butyrate ni les céramides. Les auteurs concluent que les radiofréquences interagissent soit avec la membrane, soit avec la voie Fas entre le récepteur et l'activation de la caspase-3. Il a également été montré, dans des levures, que l'apoptose induite par les ultraviolets était augmenté par les radiofréquences. Markkanen *et al.* (2004) ont exposé des levures mutantes pour le gène *cdc48* à 900 MHz (DAS de 0,4 W/kg) ou 872 MHz (DAS de 3 W/kg) pendant 1 heure, en GSM ou en CW. Ils ont montré que dans les levures mutantes, l'apoptose induite par les ultraviolets était augmentée par l'exposition en GSM. Mais ces effets n'ont pas été observés dans les levures exposées en CW. Les auteurs suggèrent que la modulation des radiofréquences peut être importante dans l'induction de l'apoptose. Cette suggestion est également faite par Mahrouf *et al.* (2005) dans le cadre des effets des radiofréquences sur l'endocytose. Ils ont constaté que les radiofréquences modulées augmentaient l'endocytose contrairement à un signal continu.

Nos résultats sur les neurones corticaux montrent au contraire un effet sur l'apoptose après exposition à un signal continu et pas après l'exposition à un signal modulé. Ceci est peut être dû au DAS utilisé qui, en valeur moyenne, n'est pas identique : 2 W/kg en CW et 0,25 W/kg en GSM. De plus, dans notre cas, aucun autre agent inducteur n'a été utilisé pour étudier la potentialisation possible des radiofréquences à ces agents. Il serait donc intéressant de comparer nos résultats déjà obtenus en utilisant des conditions identiques, mais en rajoutant un inducteur de l'apoptose à faible concentration (comme la staurosporine).

V. Radiofréquences, apoptose et cultures primaires

Peu d'études sont disponibles sur les interactions entre les radiofréquences avec le processus apoptotique, en particulier sur des cultures primaires. Capri *et al.* (2004a) ont exposé des cellules mononucléées du sang périphérique humain de donneurs jeunes et âgés à un signal GSM-1800 (DAS de 1,4 et 2 W/kg) avec différentes modulations (Basic, DTX, Talk), avec ou sans induction préalable de l'apoptose par le 2-deoxyribose (2-dRib). Aucune augmentation significative du taux d'apoptose n'a été observée, que ce soit avec les radiofréquences seules ou avec les radiofréquences + 2-dRib, chez les donneurs jeunes et âgés. Dans une seconde étude, Capri *et al.* (2004b) ont exposé des lymphocytes humains à 900 MHz en GSM (DAS de 76 mW/kg) ou en CW (DAS de 70 mW/kg), 1 heure par jour pendant 3 jours, dans une cellule TEM. Aucune modification significative n'a été observée concernant le potentiel membranaire mitochondrial et les taux d'apoptose entre les contrôles et les cellules exposées. Ces différents auteurs ont obtenu des résultats identiques quel que soit le type d'onde utilisé, avec absence d'induction d'apoptose sur des cultures primaires.

Les études sur les interactions entre les radiofréquences et le processus apoptotique sont récapitulées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7: Récapitulatif des études sur l'apoptose.

| Auteurs | Conditions d'exposition | Types cellulaires | Résultats |
|---------------------------------|--|--|---|
| Peinnequin <i>et al.</i> (2000) | 2.45 GHz ; CW ; 4 W/kg | Cellules humaines Jurkat | Augmentation de la sensibilité à l'apoptose induite par Fas, mais pas celle de l'apoptose induite par le butyrate ou les céramides |
| Capri <i>et al.</i> (2004a) | GSM-1800 (Basic, DTX, Talk); ±2-dRib; 1.4 et 2 W/kg | Cellules mononucléées du sang périphérique humain | Pas d'effet que ce soit avec les RF seules ou RF+2-dRib, quelque soit le donneur |
| Capri <i>et al.</i> (2004b) | 900 MHz ; CW (70 mW/kg) ; GSM (76 mW/kg) | Lymphocytes humains | Pas d'effet |
| Hook <i>et al.</i> (2004) | 847.74 MHz (CDMA; 3.2 W/kg) 835.62 MHz (FDMA; 3.2 W/kg) 813.56 MHz (iDEN; 2.4 et 24 mW/kg); 836.55 MHz (TDMA; 2.6 et 26 mW/kg) | Cellules Molt-4 | Pas d'effet |
| Marinelli <i>et al.</i> (2004) | 900 MHz CW ; 3.5 mW/kg | Cellules CCRF-CEM | Diminution de la viabilité cellulaire après 24 et 48 h d'exposition. Surexpression des gènes anti-apoptotiques (bcl-2, ras, akt1). Augmentation du pourcentage de cellules en apoptose après 2 h d'exposition due à l'activation précoces des voies p53-dépendante et -indépendante |
| Markkanen <i>et al.</i> (2004) | 872 MHz; 3 W/kg 900 MHz; 0.4 W/kg ± modulation ; ± UV-B | Levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> * Sauvage (cdc-48 wild-type) * Mutée (cdc-48) | RF seules : pas d'effet sur les wild-type et les mutées RF+UV-B : augmentation de l'apoptose dans les mutées mais pas dans les wild-type |
| Czyz <i>et al.</i> (2004) | 1.71 GHz GSM-Basic; 1.5 W/kg GSM-DTX; 0.11 W/kg GSM-Talk; 0.4 W/kg | Cellules souches embryonnaires (ESC) sauvages ou déficientes pour le gène p53 Cellules embryonnaires carcinogènes | Induction de l'expression de gènes de réponse précoce et de gènes de stress. Pas d'effet dans les ESC sauvages et cellules embryonnaires carcinogènes |
| Belyaev <i>et al.</i> (2005) | 915 MHz GSM ; 37 mW/kg | Lymphocytes humains | Modifications de la conformation de la chromatine mais pas de réponse apoptotique |
| Caraglia <i>et al.</i> (2005) | 1.95 GHz; 3.6 mW/g | Cellules KB | Augmentation du taux d'apoptose: inactivation de la voie de survie ras → Erk et augmentation de la dégradation de Ras et Raf-1 |
| Merola <i>et al.</i> (2006) | 900 MHz; GSM; 1 W/kg | Cellules LAN-5 | Pas d'effet |

Pour ce qui concerne notre étude, l'apoptose a été induite après exposition aux CW, alors qu'en GSM le taux d'apoptose reste similaire à celui des témoins. L'exposition en CW induit une élévation de la température de 2°C dans les cultures exposées, contrairement à l'exposition en GSM, où aucune élévation de la température n'a été détectée. La première étape a donc été d'éliminer le possible rôle de la température dans l'induction de l'apoptose. Les neurones corticaux de rat exposés en CW ont un taux d'apoptose similaire à celui des neurones exposés à 39°C, immédiatement après exposition, mais montrent un pourcentage de noyaux AIF positifs supérieur. A 24 heures post-exposition, le taux d'apoptose est plus important dans les neurones exposés en CW que dans les neurones exposés à 39°C, avec un pourcentage de noyaux AIF positifs comparable à celui obtenu pour le contrôle positif. Ces résultats tendent à montrer que l'induction de l'apoptose est indépendante de l'augmentation de la température. Néanmoins, un effet thermique plus important pourrait avoir lieu à l'interface entre le milieu de culture et la boîte de Pétri. Ces possibles effets thermiques locaux pourraient avoir un impact délétère sur les cellules qui pourraient alors, entrer en apoptose. L'utilisation des nanotechnologies à visée d'enregistrement de la température à différents points de la boîte de Pétri pourrait donner un argument fiable dans ce sens.

VI. AIF, apoptose neuronale et radiofréquences

Nos résultats sur les neurones corticaux de rat ont montré que l'exposition aux radiofréquences en CW ne provoque pas l'augmentation de l'activité caspase-3, mais induit l'apoptose. Nous avons donc cherché dans la littérature quelles pouvaient être les voies caspase- indépendantes impliquées.

Certaines études ont montré que les ondes électromagnétiques sont impliquées dans l'apoptose caspase-indépendante. Par exemple, les radiations non-ionisantes telles que les UV-B sont connues pour induire l'apoptose des cellules Jurkat, avec une translocation nucléaire de l'AIF (Murahashi *et al.*, 2003). L'AIF est une flavoprotéine mitochondriale qui induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'apoptose, indépendamment des caspases (**Chapitre B-II.2.2.**). De la même façon, l'AIF joue un rôle dans la mort cellulaire induite par les UV-A des lymphocytes B de la lignée Raji (Yuan *et al.*, 2004).

Enfin, les infrarouges pourraient protéger *in vitro* les fibroblastes humains de la cytotoxicité des UV-B en affectant la voie mitochondriale de l'apoptose (Frank *et al.*, 2004).

Nous nous sommes donc intéressés aux relations possibles entre l'AIF et l'apoptose neuronale. Nous avons trouvé que depuis sa première description, l'AIF a été largement impliqué dans l'apoptose neuronale (Cregan *et al.*, 2002). En fait, des études ont montré que l'AIF était impliqué dans quelques voies connues conduisant à l'apoptose neuronale : (i) dans la mort cellulaire dopaminergique en réponse au MPTP (Liou *et al.*, 2005) ; (ii) dans l'apoptose neuronale induite par les céramides, dans des neurones corticaux (Stoica *et al.*, 2005) ; (iii) dans l'apoptose induite par β -carboline (Hans *et al.*, 2005) ; (iv) dans la mort neuronale dépendante ou indépendante de Bax (Cheung *et al.*, 2005). L'AIF est également impliqué dans les mécanismes d'excitotoxicité dans les neurones corticaux et pourrait interférer avec la PARP-1 dans la mort neuronale induite par le NMDA (Wang *et al.*, 2004), ou avec la calpaïne I (Polster *et al.*, 2005). La translocation de l'AIF de la mitochondrie au noyau a été observée *in vivo* dans des cerveaux de rongeurs après une « agression » (Plesnila *et al.*, 2004). Il a été montré que l'AIF pourrait également représenter une cible pour empêcher l'apoptose neuronale après ischémie cérébrale (Lee *et al.*, 2005 ; Niimura *et al.*, 2006). Récemment, Matsumori *et al.* (2005) ont obtenu un effet neuroprotecteur significatif dans des souris transgéniques surexprimant Hsp70 après ligation d'une carotide.

Nous avons donc réalisé un marquage immunocytochimique de l'AIF. Cet immunomarquage était augmenté dans les cellules exposées aux radiofréquences à 0 et 24 heures post-exposition d'un facteur variant de 3 à 7, par rapport aux témoins. Ces données sont en faveur du fait que les radiofréquences, notamment les ondes continues à 900 MHz, pourraient induire l'apoptose neuronale *via* la voie de l'AIF. Toutefois l'induction de l'AIF devra être vérifiée par la réalisation d'immunoblots.

D'autre part la question de la relation entre l'induction de l'AIF et l'augmentation de la température peut se poser. Or, la coimmunoprécipitation de Hsp70 et de l'AIF réduit la translocation nucléaire de l'AIF (Matsumori *et al.*, 2005) et l'AIF est inhibé par Hsp70 (Ravagnan *et al.*, 2001). Il a été également montré que Hsp70 avait un rôle anti-apoptotique (**Chapitre B-III.3.2.**). Puisque les Hsp sont principalement induites après un stress thermique,

ces données rendent peu probable que l'augmentation du taux des noyaux AIF positifs de cette étude soit en relation avec l'augmentation de température provoquée par l'exposition en CW.

Toutefois, il serait utile de réaliser un double marquage AIF et Hsp70 afin d'étudier les variations de leur marquage à différents temps d'exposition.

Conclusion – Perspectives

Contrairement à la prolifération cellulaire, l'interaction des radiofréquences avec l'apoptose neuronale a été peu étudiée. Nous avons donc exposé des cellules neuronales de deux types différents (lignée et culture primaire) aux radiofréquences avec un signal continu et un signal modulé. Nos résultats ont montré une sensibilité cellulaire aux radiofréquences différente, confirmant que les lignées sont plus résistantes à l'apoptose que les cultures primaires. Ils ont également mis en évidence que les neurones corticaux sont plus sensibles à un signal continu qu'à un signal modulé.

Nous avons montré dans ce dernier type cellulaire, que les radiofréquences en CW, induisaient l'apoptose par une voie indépendante des caspases, passant par l'AIF. Un immunomarquage de l'AIF a donc été réalisé, montrant sa translocation au noyau. Toutefois, nous envisageons de réaliser des immunoblots pour confirmer ces résultats. De plus, il paraît intéressant de réaliser une étude cinétique de l'apoptose et de la translocation nucléaire de l'AIF.

A court ou moyen terme, nous souhaitons étudier l'induction des Hsp et notamment de Hsp70 dans les neurones corticaux de rat dans nos conditions d'exposition. En effet, l'exposition en CW induit une élévation de température dans les cultures exposées ainsi que l'apoptose, qui semble indépendante de la température. De plus, il a été prouvé que l'AIF était inhibé par Hsp70. Une cinétique de l'expression de Hsp70 et de l'AIF semble importante pour comprendre les mécanismes mis en jeu par les CW. Nous envisageons de réaliser des expositions avec différents DAS pour déterminer à quelle valeur apparaît l'apoptose. Nous envisageons également de réaliser des expositions intermittentes pour comparer les résultats à ceux que nous avons déjà obtenus après exposition continue. Nous souhaitons également étudier si les radiofréquences potentialisent l'action de la staurosporine, qui est un inducteur d'apoptose que nous avons utilisée pour les contrôles positifs.

Une étude, actuellement initiée au sein de notre laboratoire et qui demande à être poursuivie, concerne l'étude des possibles effets génotoxiques des radiofréquences par l'examen de caryotypes réalisés sur des cellules d'origine fibroblastique: les amniocytes.

A plus long terme, deux axes de recherches se dessinent :

- l'étude *in vivo* des effets des radiofréquences sur l'apoptose neuronale. En effet, il est important de regarder si les résultats obtenus *in vitro*, le sont également chez l'animal.
- l'utilisation des nanotechnologies pour la mesure de la température et du DAS. La conception de « nanosondes » permettrait d'être au plus près de la cellule, et donc de connaître précisément les phénomènes qui s'y déroulent.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- A -

1. **Adrain C, Creagh EM, Martin SJ (2001).** Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* **20**: 6627-6636.
2. **Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171.
3. **Amarante-Mendes GP, Green DR (1999).** The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* **32**: 1053-1061.
4. **Ashe PC, Berry MD (2003).** Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**: 199-214.

- B -

5. **Barone MV, Crozat A, Tabae A, Philipson L, Ron D (1994).** CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev* **8**: 453-464.
6. **Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ (1990).** Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* **248**: 850-854.
7. **Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR (2000).** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**: 469-475.
8. **Bellet V (2003).** Les différentes voies apoptotiques induites par le lentivirus visna. Inhibition par l'AZT et corrélation avec l'apoptose, *in vitro*. *Thèse de doctorat « Virologie-Biologie cellulaire et moléculaire-Biochimie », Limoges (300 D/1).*

9. **Belyaev IY, Hillert L, Protopopova M, Tamm C, Malmgren LO, Persson BR, Selivanova G, Harms-Ringdahl M (2005).** 915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Bioelectromagnetics* **26**: 173-184.
10. **Bergqvist B, Arvidsson L, Pettersson E, Galt S, Saalman E, Hamnerius Y, Norden B (1994).** Effect of microwave radiation on permeability of liposomes. Evidence against non-thermal leakage. *Biochim Biophys Acta* **1201**: 51-54.
11. **Borner C (2003).** The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* **39**: 615-647.
12. **Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR (1998).** Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* **17**: 37-49.
13. **Brewster JL, Martin SL, Toms J, Goss D, Wang K, Zachrone K, Davis A, Carlson G, Hood L, Coffin JD (2000).** Deletion of Dad1 in mice induces an apoptosis-associated embryonic death. *Genesis* **26**: 271-278.
14. **Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C (2000).** Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* **2**: 645-652.

- C -

15. **Cain K, Bratton SB, Cohen GM (2002).** The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* **84**: 203-214.
16. **Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG, Cohen GM (2001).** Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* **276**: 41985-41990.
17. **Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G (2002).** Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**: 215-222.

- 18. Capri M, Scarcella E, Bianchi E, Fumelli C, Mesirca P, Agostini C, Remondini D, Schuderer J, Kuster N, Franceschi C, Bersani F (2004a).** 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors. *Int J Radiat Biol* **80**: 389-397.
- 19. Capri M, Scarcella E, Fumelli C, Bianchi E, Salvioli S, Mesirca P, Agostini C, Antolini A, Schiavoni A, Castellani G, Bersani F, Franceschi C (2004b).** *In vitro* exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential. *Radiat Res* **162**: 211-218.
- 20. Caraglia M, Marra M, Mancinelli F, D'Ambrosio G, Massa R, Giordano A, Budillon A, Abbruzzese A, Bismuto E (2005).** Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. *J Cell Physiol* **204**: 539-548.
- 21. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000).** Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/ DIABLO. *Nature* **406**: 855-862.
- 22. Challis LJ (2005).** Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissue. *Bioelectromagnetics Supplement 7*: S98-S106.
- 23. Cheung EC, Melanson-Drapeau L, Cregan SP, Vanderluit JL, Ferguson KL, McIntosh WC, Park DS, Bennett SA, Slack RS (2005).** Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J Neurosci* **25**: 1324-1334.
- 24. Chiabrera A, Bianco B, Moggia E, Kaufman JJ (2000).** Zeeman-Stark modeling of the RF EMF interaction with ligand binding. *Bioelectromagnetics* **21**: 312-324.
- 25. Cleary SF, Cao G, Liu LM, Egle PM, Shelton KR (1997).** Stress proteins are not induced in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation. *Bioelectromagnetics* **18**: 499-505.
- 26. Cosquer B, Vasconcelos AP, Frohlich J, Cassel JC (2005).** Blood-brain barrier and

electromagnetic fields: effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole-body exposure to 2.45 GHz microwaves in rats. *Behav Brain Res* **161**: 229-237.

27. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* **158**: 507-517.

28. Czyz J, Guan K, Zeng Q, Nikolova T, Meister A, Schonborn F, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM (2004). High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics* **25**: 296-307.

- D -

29. D'Andrea JA, Chou CK, Johnston SA, Adair ER (2003). Microwave effects on the nervous system. *Bioelectromagnetics Supplement* **6**: S107-S147.

30. Dawe AS, Smith B, Thomas DW, Greedy S, Vasic N, Gregory A, Loader B, De Pomerai DI (2006). A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioelectromagnetics* **27**: 88-97.

31. De Pomerai DI, Daniells C, David H, Allan J, Duce I, Mutwakil M, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, Jones D, Candido P (2000). Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature* **405**: 417-418.

32. De Pomerai DI, Smith B, Dawe A, North K, Smith T, Archer DB, Duce IR, Jones D, Candido EP (2003). Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Lett* **543**: 93-97.

33. Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, Jahn O, Rudiger H (2005). Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells *in vitro*. *Mutat Res* **583**: 178-183.

34. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes

cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42.

- E -

- 35. Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J (1997).** Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* **16**: 221-229.
- 36. Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM, Vaux DL (2001).** DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/ XIAP from processed caspase-9. *J Cell Biol* **152**: 483-490.
- 37. Ekert PG, Vaux DL (1997).** Apoptosis in the immune system. *Br Med Bull* **53**: 591-603.
- 38. Evan G, Littlewood T (1998).** A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317-1322.

- F -

- 39. Fesik SW, Shi Y (2001).** Structural biology. Controlling the caspases. *Science* **294**: 1477-1478.
- 40. Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J, Utteridge TD, Gebiski V, Davies RA, Vernon-Roberts B, Kuchel TR (2002).** Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* **34**: 344-347.
- 41. Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J, Utteridge TD, Gebiski V, Swift JG, Vernon-Roberts B, Kuchel TR (2001).** Effect of global-system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* **33**: 338-340.
- 42. Frank S, Oliver L, Lebreton-De Coster C, Moreau C, Lecabelle MT, Michel L, Valette FM, Dubertret L, Coulomb B (2004).** Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* **123**: 823-831.
- 43. Franke H, Ringelstein EB, Stogbauer F (2005).** Electromagnetic fields (GSM 1800) do not alter blood-brain barrier permeability to sucrose in models *in vitro* with high barrier

tightness. *Bioelectromagnetics* **26**: 529-535.

- G -

- 44. Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, Katz DR (1996).** Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J Immunol* **157**: 4109-4118.
- 45. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E (1999).** HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* **13**: 2061-70.
- 46. Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, Chauffert B (1996).** Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem* **237**: 653-659.
- 47. Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P (1997).** HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anti-cancer drugs. *Cancer Res* **57**: 2661-2667.
- 48. Garrido C, Schmitt E, Cande C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G (2003).** HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* **2**: 579-584.
- 49. Germain M, Shore GC (2003).** Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci STKE* **173**: pe10.
- 50. Goldrath AW, Bevan MJ (1999).** Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* **402**: 255-262.
- 51. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000).** The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* **2**: 156-162.
- 52. Green D, Kroemer G (1998).** The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends Cell Biol* **8**: 267-271.

- 53. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J (1997).** Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* **110**: 357-368.

- H -

- 54. Hajnoczky G, Davies E, Madesh M (2003).** Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 445-454.
- 55. Hans G, Malgrange B, Lallemand F, Crommen J, Wislet-Gendebien S, Belachew S, Robe P, Rogister B, Moonen G, Rigo JM (2005).** Beta-carbolines induce apoptosis in cultured cerebellar granule neurons *via* the mitochondrial pathway. *Neuropharmacology* **48**: 105-117.
- 56. Hardell L, Hallquist A, Mild KH, Carlberg M, Pahlson A, Lilja A (2002a).** Cellular and cordless telephones and the risk for brain tumours. *Eur J Cancer Prev* **11**: 377-386.
- 57. Hardell L, Mild KH, Carlberg M (2002b).** Case-control study on the use of cellular and cordless phones and the risk for malignant brain tumours. *Int J Radiat Biol* **78**: 931-936.
- 58. Hardell L, Mild KH, Carlberg M (2003).** Further aspects on cellular and cordless telephones and brain tumours. *Int J Oncol* **22**: 399-407.
- 59. Harmand PO (2004).** Etude du processus apoptotique induit par l'acide ursolique sur deux lignées cellulaires humaines de la peau : les cellules HaCaT dérivées de kératinocytes humains et les cellules M4Beu issues d'un mélanome humain. **Thèse de doctorat « Biologie cellulaire et Biologie moléculaire », Limoges (300C).**
- 60. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandez-Alnemri T, Alnemri ES (2002).** Identification of Omi/ HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**: 432-438.
- 61. Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J, Nieminen AL (1999).** Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem* **274**: 5654-5658.

- 62. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L (2000).** Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* **33**: 341-365.
- 63. Hook GJ, Zhang P, Lagroye I, Li L, Higashikubo R, Moros EG, Straube WL, Pickard WF, Baty JD, Roti Roti JL (2004).** Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after *in vitro* exposure to radiofrequency radiation. *Radiat Res* **161**: 193-200.
- 64. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G (1999).** Role of cytochrome c and dATP/ ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J* **18**: 3586-3595.

- I -

- 65. Ivaschuk OI, Jones RA, Ishida-Jones T, Haggren W, Adey WR, Phillips JL (1997).** Exposure of nerve growth factor-treated PC12 rat pheochromocytoma cells to a modulated radiofrequency field at 836.55 MHz: effects on c-jun and c-fos expression. *Bioelectromagnetics* **18**: 223-229.

- J -

- 66. Jaattela M (1995).** Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer* **60**: 689-93.
- 67. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M (1998).** Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* **17**: 6124-6134.
- 68. Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L (1999).** Molecular biology of aging. *Cell* **96**: 291-302.
- 69. Jolly C, Morimoto RI (2000).** Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1564-1572.
- 70. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998).** Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4997-5002.

- K -

71. Kaufman RJ (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**: 1211-1233.
72. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
73. Koh JY, Wie MB, Gwag BJ, Sensi SL, Canzoniero LM, Demaro J, Csernansky C, Choi W (1995). Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp Neurol* **135**: 153-159.
74. Korsching S (1993). The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* **13**: 2739-2748.
75. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**: 44-51.
76. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* **384**: 368-372.
77. Kuribayashi M, Wang J, Fujiwara O, Doi Y, Nabae K, Tamano S, Ogiso T, Asamoto M, Shirai T (2005). Lack of effects of 1439 MHz electromagnetic near field exposure on the blood-brain barrier in immature and young rats. *Bioelectromagnetics* **26**: 578-588.

- L -

78. Lagroye I, Anane R, Wettring BA, Moros EG, Straube WL, Laregina M, Niehoff M, Pickard WF, Baty JD, Roti Roti JL (2004b). Measurement of DNA damage after acute exposure to pulsed-wave 2450 MHz microwaves in rat brain cells by two alkaline comet assay methods. *Int J Radiat Biol* **80**: 11-20.
79. Lagroye I, Hook GJ, Wettring BA, Baty JD, Moros EG, Straube WL, Roti Roti JL (2004a). Measurements of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low-dose gamma irradiation *in vitro*. *Radiat Res* **161**: 201-214.
80. Lantow M, Lupke M, Frahm J, Mattsson MO, Kuster N, Simko M (2006). ROS

- release and Hsp70 expression after exposure to 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiat Environ Biophys* **45**: 55-62.
- 81. Laurence JA, French PW, Lindner RA, McKenzie DR (2000).** Biological effects of electromagnetic fields – Mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. *J Theor Biol* **206**: 291-298.
- 82. Laval L, Leveque P, Jecko B (2000).** A new *in vitro* exposure device for the mobile frequency of 900 MHz. *Bioelectromagnetics* **21**: 255-263.
- 83. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J (1993).** Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* **268**: 24210-24214.
- 84. LeBlanc AC (2003).** Natural cellular inhibitors of caspases. *Progress Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**: 215-229.
- 85. Lee BI, Chan PH, Kim GW (2005).** Metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic attenuates the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and the subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **36**: 2712-2717.
- 86. Leszczynski D, Nylund R, Joenvaara S, Reivinen J (2004).** Applicability of discovery science approach to determine biological effects of mobile phone radiation. *Proteomics* **4**: 426-431.
- 87. Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951).** Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* **116**: 321-362.
- 88. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS (2000).** Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**: 25665-25671.
- 89. Li L, Bisht KS, Lagroye I, Zhang P, Straube WL, Moros EG, Roti Roti JL (2001).** Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed *in vitro* to radiofrequency

fields at SARs of 3-5 W/kg. *Radiat Res* **156**: 328-332.

- 90. Li LY, Luo X, Wang X (2001).** Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99.
- 91. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/ caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- 92. Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC (1997).** Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol* **158**: 5668-5675.
- 93. Liou AK, Zhou Z, Pei W, Lim TM, Yin XM, Chen J (2005).** BimEL up-regulation potentiates AIF translocation and cell death in response to MPTP. *FASEB J* **19**: 1350-1352.
- 94. Liu H, Bowes RC, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL (1997).** Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* **272**: 21751-21759.
- 95. Loeffler M, Kroemer G (2000).** The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* **256**: 19-26.
- 96. Lonn S, Ahlbom A, Hall P, Feychting M; Swedish Interphone Study Group (2005).** Long-term mobile phone use and brain tumor risk. *Am J Epidemiol* **161**: 526-535.
- 97. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G (1999).** Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* **6**: 516-524.

- M -

- 98. Maeda K, Maeda T, Qi Y (2004).** *In vitro* and *in vivo* induction of human LoVo cells into apoptotic process by non-invasive microwave treatment: a potentially novel approach for physical therapy of human colorectal cancer. *Oncol Rep* **11**: 771-775.
- 99. Mahroun N, Pologea-Moraru R, Moisescu MG, Orlowski S, Leveque P, Mir LM**

- (2005). *In vitro* increase of the fluid-phase endocytosis induced by pulsed radiofrequency electromagnetic fields: importance of the electric field component. *Biochim Biophys Acta* **1668**: 126-137.
- 100. Malyapa RS, Ahern EW, Straube WL, Moros EG, Pickard WF, Roti Roti JL (1997).** Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz). *Radiat Res* **148**: 618-627.
- 101. Mancinelli F, Caraglia M, Abbruzzese A, D'Ambrosio G, Massa R, Bismuto E (2004).** Non-thermal effects of electromagnetic fields at mobile phone frequency on the refolding of an intracellular protein: myoglobin. *J Cell Biochem* **93**: 188-196.
- 102. Marinelli F, La Sala D, Ciccio G, Cattini L, Trimarchi C, Putti S, Zamparelli A, Giuliani L, Tomassetti G, Cinti C (2004).** Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between pro-apoptotic and pro-survival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells. *J Cell Physiol* **198**: 324-332.
- 103. Markkanen A, Penttinen P, Naarala J, Pelkonen J, Sihvonon AP, Juutilainen J (2004).** Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells. *Bioelectromagnetics* **25**: 127-133.
- 104. Martin JB (1999).** Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* **340**: 1970-1980.
- 105. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J (2002).** The serine protease Omi/ HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* **277**: 439-444.
- 106. Mathiasen IS, Jaattela M (2002).** Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Mol Med* **8**: 212-220.
- 107. Matsumori Y, Hong SM, Aoyama K, Fan Y, Kayama T, Sheldon RA, Vexler ZS, Ferriero DM, Weinstein PR, Liu J (2005).** Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 899-910.

- 108. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001).** Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl-2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**: 1249-1259.
- 109. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997).** FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signalling complex (DISC). *EMBO J* **16**: 2794-2804.
- 110. Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP (1996).** Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat-shock protein 27 blocks Fas/APO-1 and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* **271**: 16510-16514.
- 111. Meier P, Finch A, Evan G (2000).** Apoptosis in development. *Nature* **407**: 796-801.
- 112. Meltz ML (2003).** Radiofrequency exposure and mammalian cell, toxicity, genotoxicity, and transformation. *Bioelectromagnetics Supplement* **6**: S196-S213.
- 113. Merola P, Marino C, Lovisolo GA, Pinto R, Laconi C, Negroni A (2006).** Proliferation and apoptosis in a neuroblastoma cell line exposed to 900 MHz modulated radiofrequency field. *Bioelectromagnetics* **27**: 164-171.
- 114. Michelin S, Del Rosario Perez M, Dubner D, Gisone P (2004).** Increased activity and involvement of caspase-3 in radiation-induced apoptosis in neural cells precursors from developing rat brain. *Neurotoxicology* **25**:387-398.
- 115. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993).** Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene ced-3. *Cell* **75**: 653-660.
- 116. Miyakoshi J, Takemasa K, Takashima Y, Ding GR, Hirose H, Koyama S (2005).** Effects of exposure to a 1950 MHz radiofrequency field on expression of Hsp70 and Hsp27 in human glioma cells. *Bioelectromagnetics* **26**: 251-257.
- 117. Murahashi H, Azuma H, Zamzami N, Furuya KJ, Ikebuchi K, Yamaguchi M, Yamada Y, Sato N, Fujihara M, Kroemer G, Ikeda H (2003).** Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leuk Biol* **73**: 399-406.

- N -

118. Nakagawa T, Yuan J (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150**: 887-894.
119. Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, Shore GC (1997). p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and pro-caspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **139**: 327-338.
120. Nicholson DW, Thornberry NA (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**: 299-306.
121. Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Ishihara N, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T, Takeo S (2006). Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 1354-1365.

- O -

122. Oppenheim RW (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**: 453-501.
123. Oppenheim RW (1996). The concept of uptake and retrograde transport of neurotrophic molecules during development: history and present status. *Neurochem Res* **21**: 769-777.
124. Oyadomari S, Araki E, Mori M (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* **7**: 335-345.

- P -

125. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 505-512.

126. **Parone PA, James D, Martinou JC (2002).** Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* **84**: 105-111.
127. **Parsell DA, Lindquist S (1993).** The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**: 437-96.
128. **Peinnequin A, Piriou A, Mathieu J, Dabouis V, Sebbah C, Malabiau R, Debouzy JC (2000).** Non-thermal effects of continuous 2.45 GHz microwaves on Fas-induced apoptosis in human Jurkat T-cell line. *Bioelectrochemistry* **51**: 157-161
129. **Phillips JL, Ivaschuk O, Ishida-Jones T, Jones RA, Campbell-Beachler M, Haggren W (1998).** DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields *in vitro*. *Bioelectrochem Bioenerg* **45**: 103-110.
130. **Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, Groger M, Moskowitz MA, Blomgren K (2004).** Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**: 458-466.
131. **Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005).** Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* **280**: 6447-6454.

- R -

132. **Ramundo-Orlando A, Liberti M, Mossa G, D'Inzeo G (2004).** Effects of 2.45 GHz microwave fields on liposomes entrapping glycoenzyme ascorbate oxidase: evidence for oligosaccharide side chain involvement. *Bioelectromagnetics* **25**: 338-345.
133. **Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2001).** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* **276**: 33869-33874.
134. **Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G (2001).** Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* **3**: 839-843.
135. **Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002).** Mitochondria, the killer organelles

and their weapons. *J Cell Physiol* **192**: 131-137.

- 136. Rodriguez J, Lazebnik Y (1999).** Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**: 3179-3184.
- 137. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M (1999).** Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* **274**: 18947-18956.
- 138. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C (1998).** Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**: 496-499.
- 139. Rougier C (2003).** Etude des interactions entre la bactérie *Escherichia coli* et les micro-ondes appliquées en mode discontinu dans des conditions faiblement thermiques. *Thèse de doctorat « Biologie-Sciences-Santé », Limoges (33-2003)*.
- 140. Ruchalski K, Mao H, Singh SK, Wang Y, Mosser DD, Li F, Schwartz JH, Borkan SC (2003).** HSP72 inhibits apoptosis-inducing factor release in ATP-depleted renal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**: C1483-C1493.

- S -

- 141. Saalman E, Norden B, Arvidsson L, Hamnerius Y, Hojevnik P, Connell KE, Kurucsev T (1991).** Effect of 2.45 GHz microwave radiation on permeability of unilamellar liposomes to 5(6)-carboxyfluorescein. Evidence of non-thermal leakage. *Biochim Biophys Acta* **1064**: 124-130.
- 142. Salford LG, Brun AE, Sturesson K, Eberhardt JL, Persson BR (1994).** Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50 and 200 Hz. *Microsc Res Tech* **27**: 535-542.
- 143. Salford LG, Brun AE, Eberhardt JL, Malmgren L, Persson BR (2003).** Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect* **111**: 881-883.

- 144. Samejima K, Tone S, Earnshaw WC (2001).** CAD/ DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 45427-45432.
- 145. Schirmacher A, Winters S, Fischer S, Goetze J, Galla HJ, Kullnick U, Ringelstein EB, Stogbauer F (2000).** Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood-brain barrier *in vitro*. *Bioelectromagnetics* **21**: 338-345.
- 146. Schuderer J, Spät D, Samaras T, Oesch W, Kuster N (2004).** *In vitro* exposure systems for RF exposures at 900 MHz. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* **52**: 2067-2075.
- 147. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2003).** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**: 135-139.
- 148. Sherman MY, Goldberg AL (2001).** Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**: 15-32.
- 149. Shi Y, Thomas JO (1992).** The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* **12**: 2186-2192.
- 150. Skowrya D, Georgopoulos C, Zylicz M (1990).** The E. coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**: 939-44.
- 151. Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES (2000).** Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac-DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* **275**: 36152-36157.
- 152. Stoica BA, Movsesyan VA, Knoblach SM, Faden AI (2005).** Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins. *Mol Cell Neurosci* **29**: 355-371.
- 153. Stronati L, Testa A, Moquet J, Edwards A, Cordelli E, Villani P, Marino C, Fresegna AM, Appolloni M, Lloyd D (2006).** 935 MHz cellular phone radiation. An *in vitro* study of genotoxicity in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* **82**: 339-346.

- 154. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999).** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446.
- 155. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996).** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* **184**: 1331-1341.
- 156. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001).** A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**: 613-621.

- T -

- 157. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002).** Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**: 1991-1995.
- 158. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J (1997).** Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**: 517-521.
- 159. Thompson CB (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462.
- 160. Thornberry NA (1998).** Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* **5**: R97-103.
- 161. Tian F, Nakahara T, Wake K, Taki M, Miyakoshi J (2002).** Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields induces hsp70 at a high SAR of more than 20 W/kg but not at 5 W/kg in human glioma MO54 cells. *Int J Radiat Biol* **78**: 433-440.
- 162. Tong JX, Vogelbaum MA, Drzymala RE, Rich KM (1997).** Radiation-induced apoptosis in dorsal root ganglion neurons. *J Neurocytol* **26**: 771-777.
- 163. Tsurita G, Nagawa H, Ueno S, Watanabe S, Taki M (2000).** Biological and

morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field. *Bioelectromagnetics* **21**: 364-371.

- V -

- 164. Van Loo G, Schotte P, van Gorp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P (2001).** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**: 1136-1142.
- 165. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL (2001).** Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* **2**: REWIEWS3009.
- 166. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000).** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43-53.

- W -

- 167. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD et al. (1994).** Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**: 343-352.
- 168. Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2004).** Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* **24**: 10963-10973.
- 169. Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D (1996).** Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* **16**: 4273-4280.
- 170. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT (2001).** Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with

exonuclease and Dnase I. *J Biol Chem* **276**: 48404-48409.

- 171. Woodward JR, Timmel CR, McLauchlan KA, Hore PJ (2001).** Radiofrequency magnetic field effects on electron-hole recombination. *Phys Rev Lett* **87**: 077602.
- 172. Wyttenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC (2002).** Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* **11**: 1137-1151.

- Y -

- 173. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002).** DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* **9**: 680-684.
- 174. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001).** Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* **276**: 13935-13940.
- 175. Yuan CQ, Li YN, Zhang XF (2004).** Down-regulation of apoptosis-inducing factor protein by RNA interference inhibits UVA-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **317**: 1108-1113.

- Z -

- 176. Zeni O, Romano M, Perrotta A, Lioi MB, Barbieri R, D'Ambrosio G, Massa R, Scarfi MR (2005).** Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute *in vitro* exposure to 900 MHz radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics* **26**: 258-265.
- 177. Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P (2004).** Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* **3**: 187-197.

- 178. Zmyslony M, Politanski P, Rajkowska E, Szymczak W, Jajte J (2004).** Acute exposure to 930 MHz CW electromagnetic radiation *in vitro* affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions. *Bioelectromagnetics* **25**: 324-328.