



Effets des CEM sur les kératinocytes

Document préparé par le **Belgian BioElectroMagnetics Group (BBEMG)**

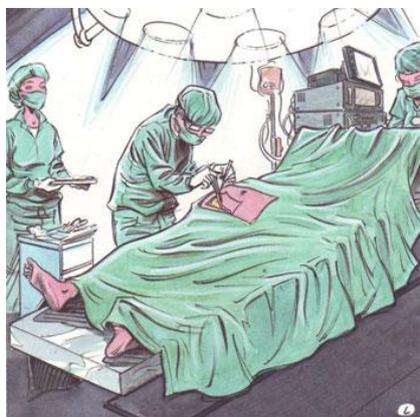
Introduction

Cette étude a comme objectif d'analyser les effets biologiques des champs électriques et magnétiques de fréquences extrêmement basses. Des kératinocytes, cellules de la couche extérieure de la peau (l'épiderme), sont placés sur un morceau de derme décellularisé (le derme est la couche interne de la peau humaine). Deux électrodes en platine sont utilisées pour appliquer le signal électrique. Nous comparons l'activation des gènes au niveau des cellules exposées et exposées de manière simulée.

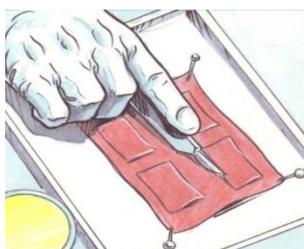
Ce modèle simplifié et bien caractérisé permet d'étudier les effets biologiques d'une stimulation électromagnétique.

Vous trouverez ici une présentation de l'étude ainsi que les principaux résultats.

Préparation du derme



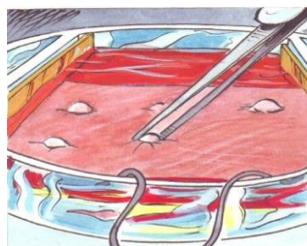
Le morceau de derme est retiré d'une personne en surpoids lors d'une opération de chirurgie plastique (abdominoplastie).



Exposition au champ électrique



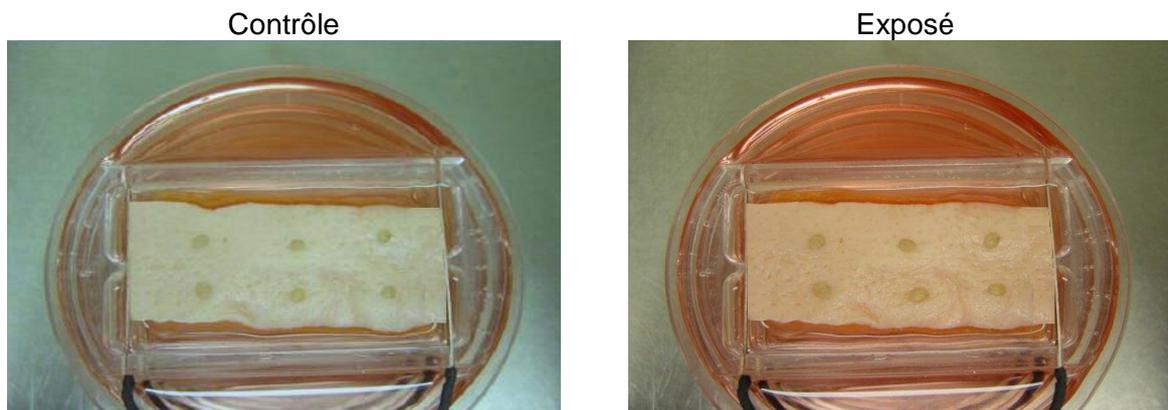
Le derme décellularisé est placé dans une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif (en rouge). Les deux côtés du derme sont en contact avec les électrodes.



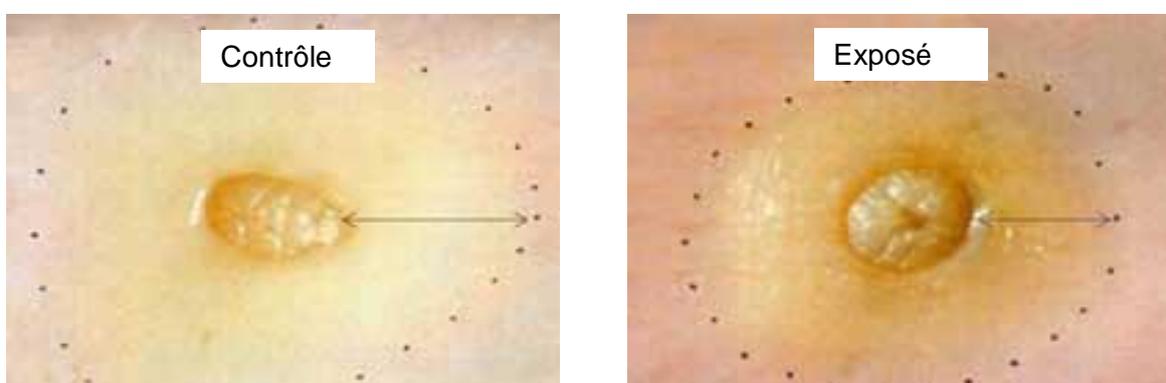
Des échantillons de kératinocyte (explants) sont pris sur le même donneur et placés sur le derme. Ce modèle reproduit la structure réelle de la peau :

Peau = des couches de cellules dermiques et des couches de cellules épidermiques

Des paires d'échantillons du même donneur sont préparées pour l'étude. Les premiers sont exposés quotidiennement à un champ électrique alors que les autres sont utilisés comme contrôle.



Comparaison de la croissance de l'épiderme entre les échantillons contrôles et les échantillons exposés au champ électrique (comparaison après 14 jours en culture)



Observation :

Ce qui se passe naturellement, c'est un processus de cicatrisation (voir la zone blanche): les cellules se divisent et l'épiderme croît en bordure des échantillons d'épiderme. Toutefois:

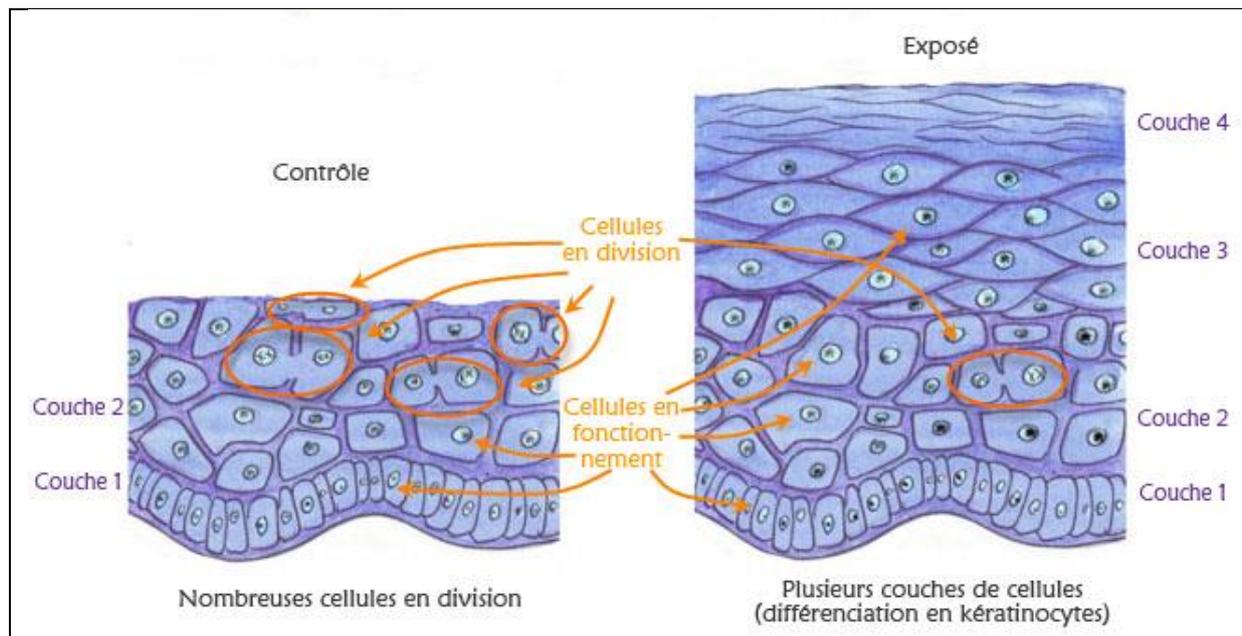
- sous exposition simulée : plus grande surface de cellules périphériques, ce qui signifie que les cellules se divisent plus activement.
- sous exposition réelle : plus grande épaisseur des cellules périphériques (plus de couches...)

Ce qui est observé sous exposition, c'est donc une augmentation de la différenciation cellulaire (*1), au dépend de la prolifération.

(*1) Différenciation cellulaire : Il s'agit du processus par lequel une cellule non spécialisée devient une cellule spécialisée. Dans cette expérience, cela signifie que les cellules deviennent plus rapidement des kératinocytes matures, c'est-à-dire capables de jouer leur rôle protecteur de la peau.

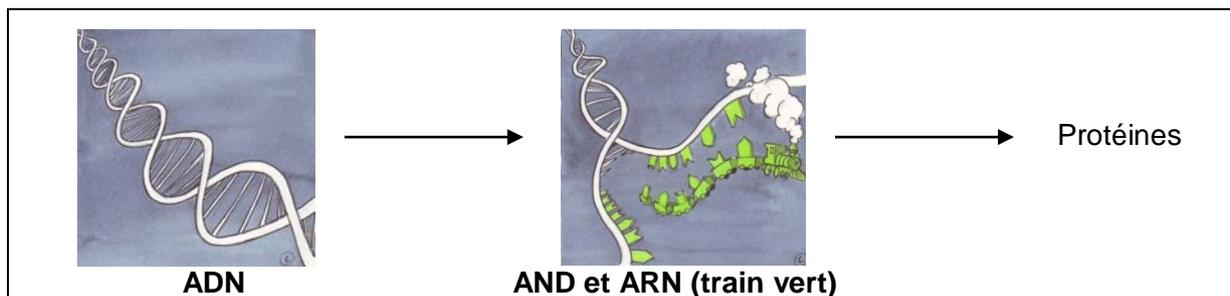
Que se passe-t-il au niveau des cellules périphériques (zone blanche) ?

Voici une représentation d'une coupe au niveau de la zone blanche (vue au microscope) :



Les illustrations montrent des cellules en division et d'autres cellules. Etant donné l'objectif de cette étude, nous approfondissons ici ces dernières. Que se passe-t-il au niveau des cellules qui ne sont pas en division ?

Imaginons un microscope très puissant qui nous permettrait de visualiser finement ce qui se passe à l'intérieur de ces cellules. Que verrions-nous ?



Le noyau contient l'**ADN**, une molécule qui stocke notre information génétique. L'ADN est organisé en séquences appelées **gènes**: notre ADN contient des milliers de gènes. Il est spécifique à chacun des individus. **L'ADN** est une sorte de *livre de recette*: il dit comment une cellule particulière doit travailler. Cependant, pour être utile, l'information des recettes doit passer dans le cytoplasme, la partie active de la cellule (en violet dans les illustrations ci-dessous). Comme l'ADN ne peut sortir du noyau (*la librairie*), un autre acteur entre en jeu: **l'ARN**.

L'ARN, ici représenté par *le train vert*, est la transcription d'un gène particulier. Dans cet exemple, le gène est constitué d'une succession de 6 bases spécifiques (éléments de l'ARN,

représenté ici par les wagons). L'ARN voyage vers le cytoplasme (*la cuisine de la cellule*) pour être traduit en **protéines**.

Plus:

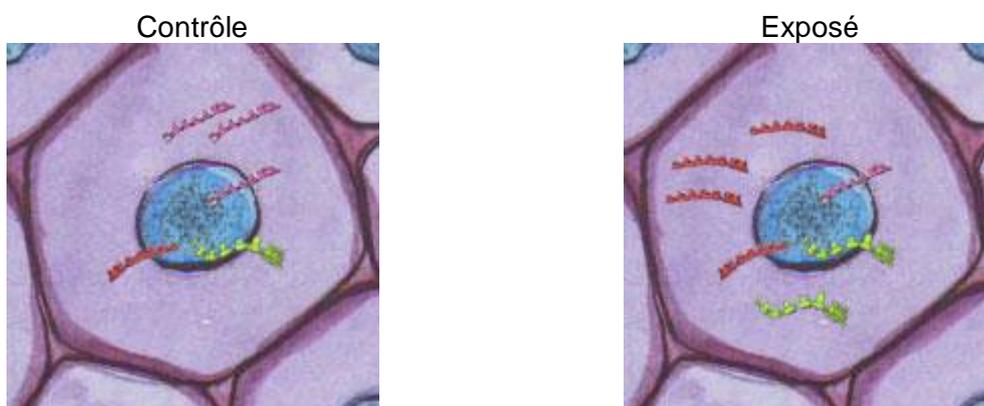
Lorsqu'une cellule est en division, l'ADN est organisé en longues structures appelées chromosomes (voir la figure ci-dessous). Ces chromosomes sont dupliqués avant la division cellulaire, permettant ainsi aux deux cellules-filles de recevoir l'entièreté de l'information génétique.

Lorsqu'une cellule est fonctionnelle, les gènes sont transcrits en ARN dans le noyau. L'ARN est une copie d'un **gène** particulier qui va transférer l'information génétique du noyau au cytoplasme. Il sera alors transformé en quelque chose capable de travailler à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, les **protéines**. Les protéines sont les éléments de base de la cellule et elles sont impliquées dans son fonctionnement.

L'ADN et l'ARN sont constitués d'une succession de seulement 4 molécules, appelées bases. C'est l'alphabet de notre livre de recette. Les différentes combinaisons de ces 4 lettres sont suffisantes pour écrire l'ensemble des recettes nécessaires à notre fonctionnement.

Les protéines sont constituées de 20 acides aminés (AA). Les différentes combinaisons des AA produisent différents cuisiniers, spécialisés dans différentes tâches.

Que se passe-t-il dans les deux échantillons de cellules dans cette étude ? Les ARN, transcrits dans le noyau, vont dans le cytoplasme. Comme illustré ci-dessous, les quantités d'ARN et leur origine (gènes transcrits) sont différents en situation d'exposition réelle et simulée.



Malheureusement, le microscope capable de faire la différence entre les ARN n'existe pas ! Comment les scientifiques peuvent-ils les identifier, et par la même occasion, identifier les gènes activés ? C'est l'objectif du **screening par microarray**. Cette technique permet d'analyser l'activation des gènes en quantifiant les ARN. A partir de cette analyse, il est possible de comprendre les mécanismes qui se passent au niveau cellulaire.

Dans cette étude, l'objectif est d'identifier les mécanismes cellulaires déclenchés par les champs électromagnétiques en comparant l'ARN dans les cellules exposées et non exposées.

Purification de l'ARN

En premier lieu, il est nécessaire de séparer les ARN des autres constituants de la cellule comme les membranes, les organites ... Cette étape est appelée purification de l'ARN.



Après destruction des membranes des cellules, l'ARN est filtré et séparé des autres parties de la cellule.

Avant l'étape suivante, une molécule de marquage (par fluorescence) est fixée sur l'ARN. Comme nous le verrons ci-dessous, cette molécule permettra de visualiser la présence et la quantité d'ARN sur la puce (« gene chip »).

A ce moment de l'étude, les chercheurs ont deux échantillons d'ARN, l'un provenant des cellules exposées, l'autre des cellules contrôles. Tous deux seront analysés séparément de manière à déterminer leur composition (*).

(*) A noter qu'avant de placer l'ARN en contact avec la puce, celui-ci est transformé en ADN (la forme reconnue par la puce). Dans la suite du texte, nous parlerons donc d'ADN et non d'ARN.

Fixation de l'ADN sur la puce

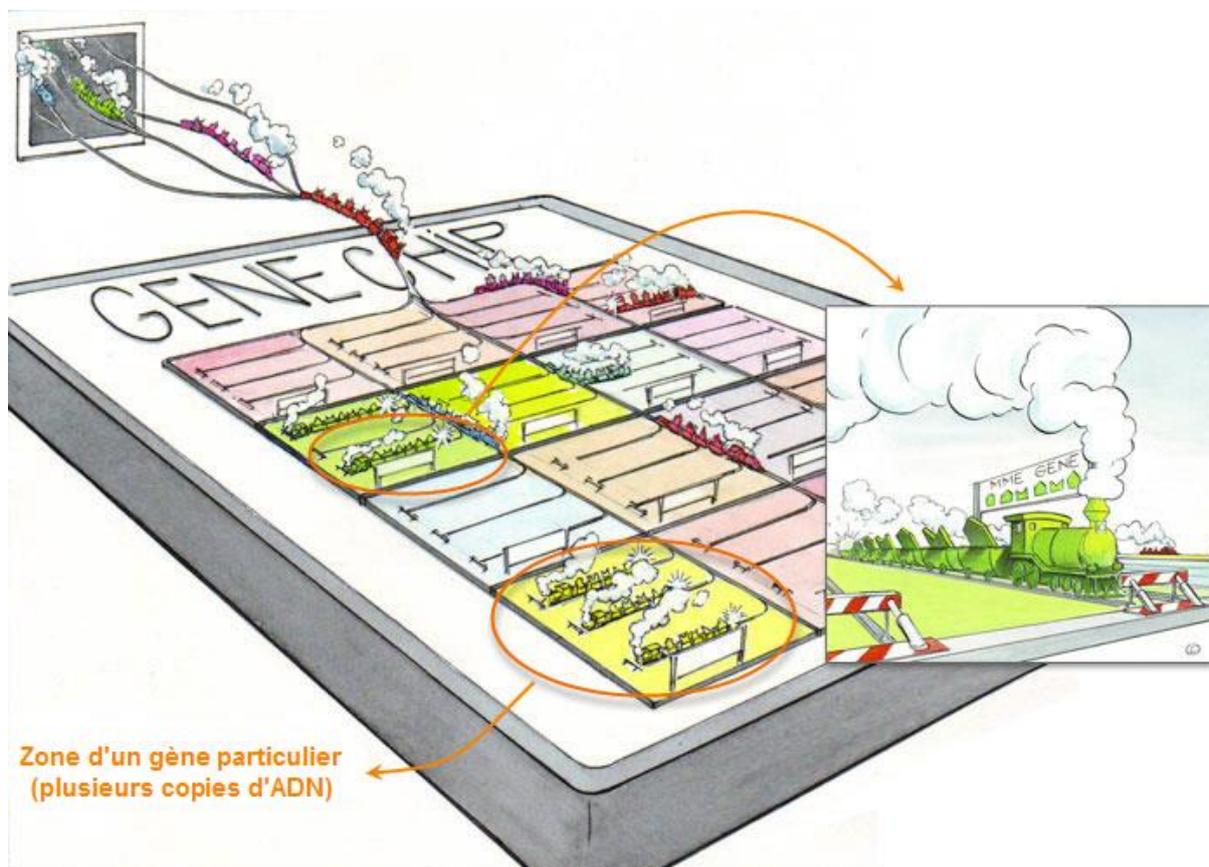
Les deux échantillons d'ADN sont mis en contact avec deux « gene chip » différentes.

Une puce est un outil très ingénieux pour les biologistes : elle est composée de multiples copies d'un morceau spécifique de gènes bien identifiés (par exemple 38 500 pour l'espèce

humaine). Ces copies sont organisées sur la puce : les mêmes copies sont groupées dans la même zone, comme des gares spécifiques attendant leurs trains (Figure 1).

Que se passe-t-il au niveau de la puce quand les ADN sont placés en contact avec elle ? Chaque ADN reconnaît sa zone et se fixe à elle.

Voici une vue simplifiée d'une puce avec seulement 16 zones de fixation de l'ADN permettant de mettre en évidence 16 gènes différents. En réalité, ce type de puce est composé de milliers de zones sur une surface de moins de 2 cm².



Quand les ADN sont fermement fixés à leurs quais respectifs, la puce est analysée par un scanner capable d'identifier les différentes zones et de distinguer de très petites variations d'intensité lumineuse :

- Une zone plus intense est composée de plus d'ADN, ce qui signifie que le gène correspondant est plus activé.
- A l'inverse, si un gène est peu ou pas activé, la zone ne sera pas fluorescente.

Les deux puces sont comparées afin d'analyser les ARN transcrits sous exposition réelle et simulée.

Analyse génique

Après analyse, les chercheurs obtiennent une liste des ADN présents dans les deux échantillons et, par conséquent, les gènes activés ou non (gènes up et down régulés) dans les cellules exposées et non exposées.

Toutefois, rappelons-nous que la puce peut fournir des informations sur 38 500 gènes ! Les chercheurs doivent analyser les données afin de classer les gènes et de vérifier les niveaux d'activation dans les deux échantillons. Le travail est énorme !

Premiers résultats

A ce jour, aucun effet pathologique n'a été identifié, seulement une accélération des mécanismes physiologiques normaux.

La comparaison de la liste des gènes up- et down- régulés des deux échantillons a permis de mettre en avant les 3 gènes suivants, up-régulés. Ils sont présents au cours de l'ensemble du processus expérimental :

- Thioredoxine reductase 1 (TXNRD1),
- Activating transcription factor 3 (ATF3),
- Membrane metallo-endopeptidase (MME).

La comparaison des échantillons exposé et contrôle au 4^e jour d'exposition met également en avant un autre gène up-régulé, Dickkopf Homolog 1 (DKK1), et un autre down-régulé, microtubule-actin cross-linking factor 1 (MACF1).

Concernant la formation des os, les chercheurs ont également identifié une protéine spécifique, BMP2, qui est up-régulée au 12^e jour d'exposition. Cette up-régulation de BMP2 permet d'expliquer les effets biologiques observés dans toutes nos précédentes études sur les cellules, les tissus embryonnaires et les tissus osseux en croissance et en pratique clinique.

Les fonctions biologiques de ces gènes confirment les observations macroscopiques : une accélération de la différenciation au dépend de la prolifération.

Références

Collard, J.-F., Mertens, B. & Hinsenkamp, M. [In vitro study of the effects of ELF electric fields on gene expression in human epidermal cells](#). *Bioelectromagnetics*, 32:28-36 (2011)

Hinsenkamp M., Jercinovic A., Heenen M., De Graef Ch., Wilaert Ch. Effects of alternating electrical current on keratinocytes in vitro (AC). *Bioelectromagnetics*, 18: 250-254, 1997.

Jercinovic A., Hinsenkamp M., Wilaert F., De graef Ch., Heenen M., Goldschmidt D. Effects of direct constant current on keratinocytes in vitro (DC). *Bioelectroch. Bioener.*, 39 (2): 209-214, 1996.