

Etudes sur la différenciation et la prolifération cellulaire

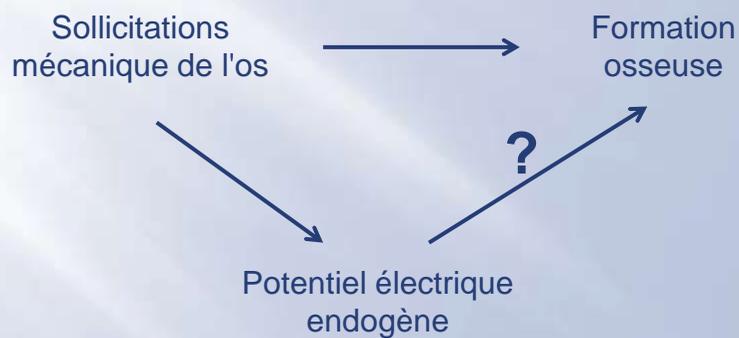
M. Hinsenkamp, J.-F. Collard

Laboratoire de Recherche en Orthopédie-Traumatologie
Université Libre de Bruxelles
Hôpital Erasme

Belgian BioElectroMagnetics Group

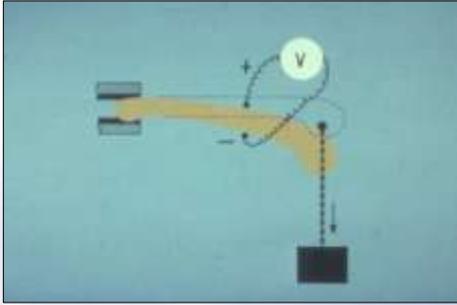


Hypothèse électrique

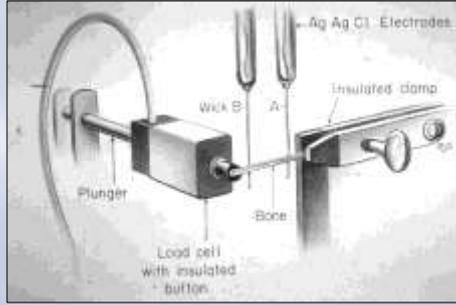


Yasuda, 1953
Fukada, 1957

Hypothèse électrique

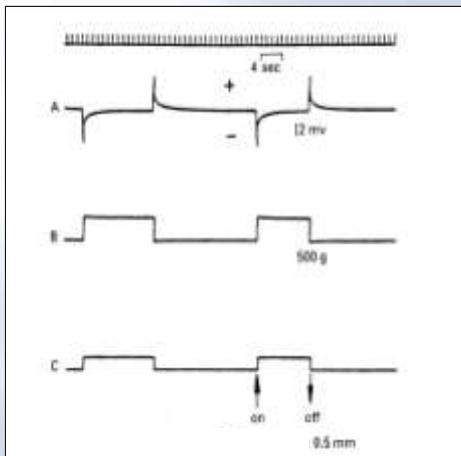


Yasuda, 1953
Fukada, 1957
Bassett 1968

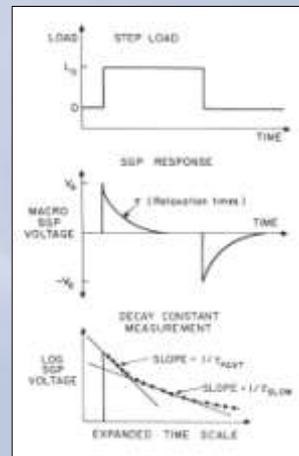


Cochran 1968

Hypothèse électrique

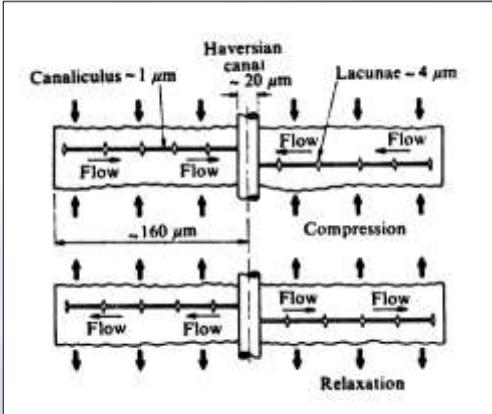


Cochran 1968

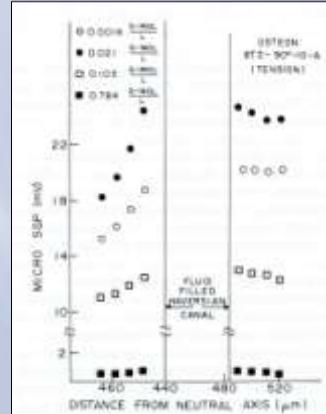


Pienkowski 1983

Hypothèse électrique

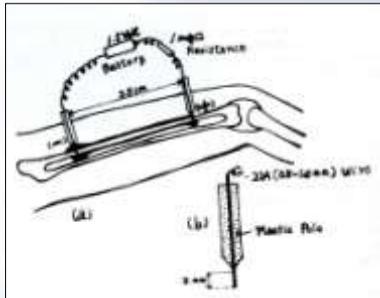


Piekarski 1977

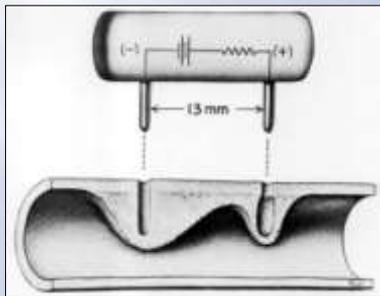


Pienkowski 1983

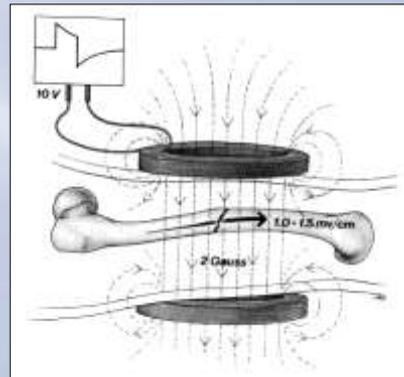
Hypothèse électrique



Yasuda 1974



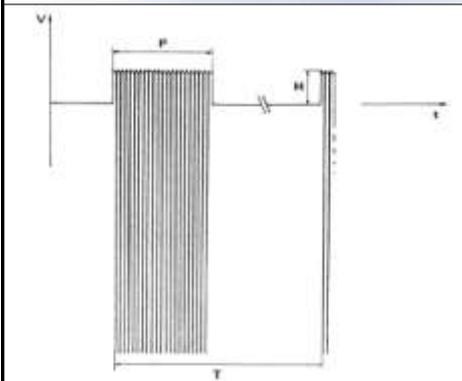
Bassett 1971



Bassett 1981

Caractéristiques des champs électriques

- Basses fréquences: 0Hz à 300kHz
- Faible amplitude : B : 0,22 mT valeur efficace
E : 0,72 V/m valeur efficace



- Train d'impulsion :
onde porteuse : 5kHz
modulation : 15Hz

Historique des traitements cliniques des années 80

- Applications cliniques sans indication rigoureuse
- Résultats décevants
- Ne peut être substitué aux indications chirurgicales
- Des effets cliniques sont observés sur certaines pathologies :
 - les pseudarthroses
 - les fractures
 - les ostéonécroses

Etude clinique : pseudarthroses

Résultats

	Hypertrophic	Atrophic
Consolidation	86,1%	56,1%

χ^2 : 15,02; ddl.: 1; $p < 0,001$; $n=129$

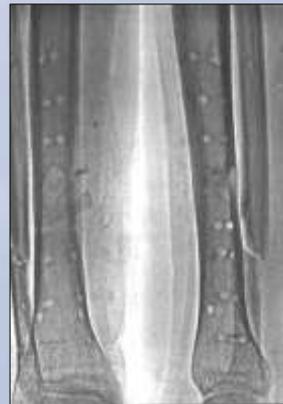


A partir de biopsie du cal, Gossling (1982) observe une relation existant entre la présence d'un fibrocartilage important chez les pseudarthroses hypertrophiques et le taux de consolidation après traitement par champs électromagnétiques

Etude clinique : fractures fraîches

Résultats:

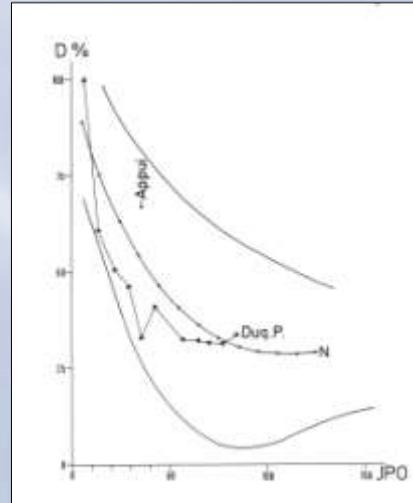
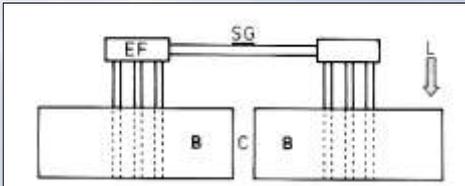
- Diminution statistiquement significative ($p < 0,05$) de la durée de consolidation mais trop courte pour avoir un intérêt clinique
- Peu ou pas de cal périosté en dépit de la fixation externe élastique



Etude clinique : fractures fraîches

Résultats:

- Augmentation précoce de la rigidité du cal



Etude clinique : ostéonécroses

Résultats Rx : comparaison avec les traitements conservateurs de la littérature

Ficat II

Auteurs	T.	n	Follow up (mois)	% altération
Hungerford, 1980	Cons.	22	21	86
Steinberg, 1982	Cons.	11	21?	82
Musso, 1986	Cons.	7	16	86
Hinsenkamp, 1993	PEMF	6	36	0
	PEMF	4	58	0

Ficat III

Auteurs	T.	n	Follow up (mois)	% altération
Hungerford, 1980	Cons.	11	28	91
Steinberg, 1982	Cons.	10	21	90
Musso, 1986	Cons.	26	16	46 ?
Hinsenkamp, 1993	PEMF	14	36	50
	PEMF	7	54	64

Conclusion: stabilisation des Ficat II sans réelle cicatrisation des lésions

Etude embryonnaire *in vitro*

Matériel et méthode

- Bourgeons de membres d'embryons de souris
- Coloration :
 - bleu de toluidine
 - fer colloïdal
 - double coloration squelettale *in toto*



Etude embryonnaire *in vitro*

Résultats

- Augmentation des GAGs acides
- Structure plus rigide de la matrice cartilagineuse
- Gradient proximodistal



Commentaire

- Dans la matrice cartilagineuse le pool des GAGs devient acide juste avant l'ossification



Discussion

- Modification de la configuration spatiale de l'ADN
- Augmentation de la production de l'ARN
- Accélération de l'ossification
 - augmentation de la concentration des GAGs acides
 - accélération de l'ossification des rudiments osseux embryonnaires
 - augmentation précoce de la rigidité du cal
 - ossification du fibrocartilage présent dans les pseudarthroses hypertrophiques
- Ces observations correspondent à une accélération de la maturation et/ou de la différenciation du cartilage précédant les processus d'ossification

Discussion

Mais...

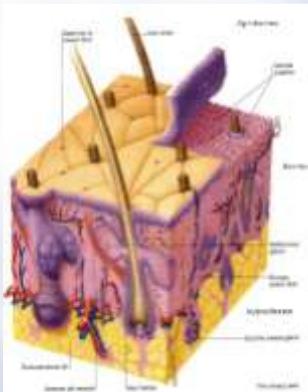
- La définition des caractéristiques électriques des champs reste empirique, les paramètres électriques agissant spécifiquement sur les mécanismes cellulaires étant inconnus
- Les cascades métaboliques impliquées dans la réception, la transcription et la réponse aux champs électromagnétiques ne sont pas identifiées

Evolution

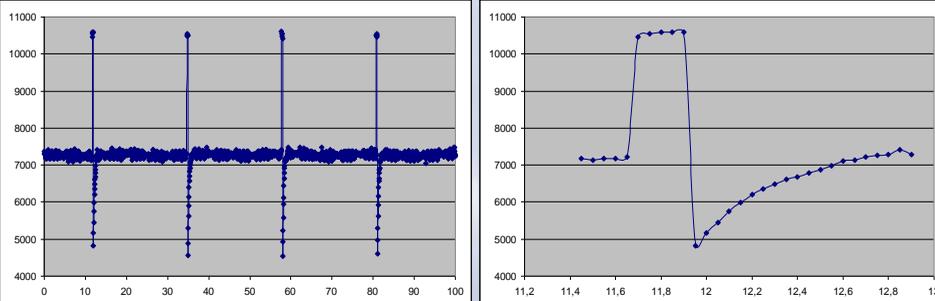
Nous avons essayé de simplifier le modèle biologique et l'environnement électrique :

- Kératinocytes en croissance
- Champ électrique pulsée de basse fréquence

Modèle expérimental



Modèle expérimental



Theoretical Conductivity : medium : 14,0 S/m
 dermis : 2,5 S/m
 epidermis : 1,0 S/m

Epidermis input : $I_{ef} = 0,282 \text{ mA to } 0,987 \text{ mA}$

Premiers résultats

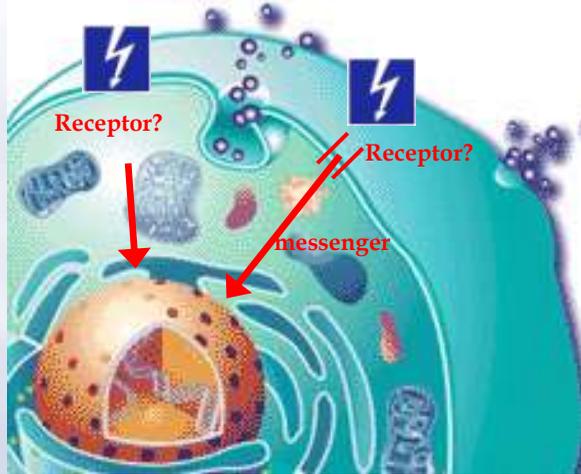
Modèle de culture de kératinocytes :



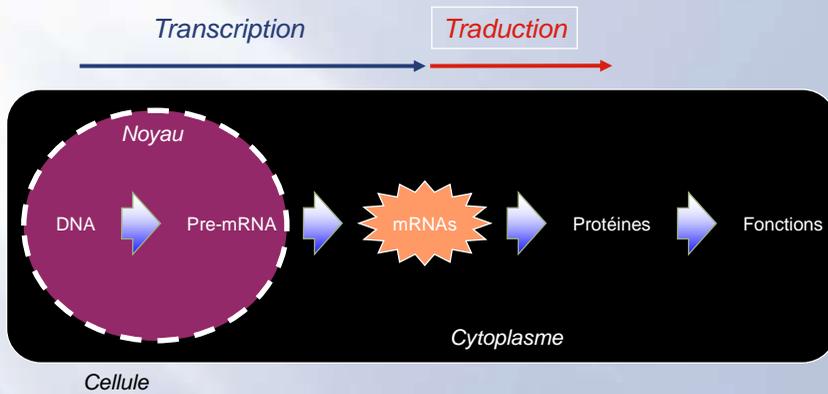
- Planimétrie
- Marquage [^3H]-thymidine
- Histologie

Diminution de la prolifération des kératinocytes au profit de leurs différenciations

Microarray

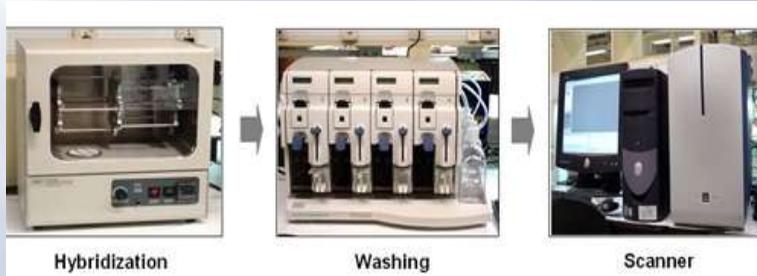


Microarray

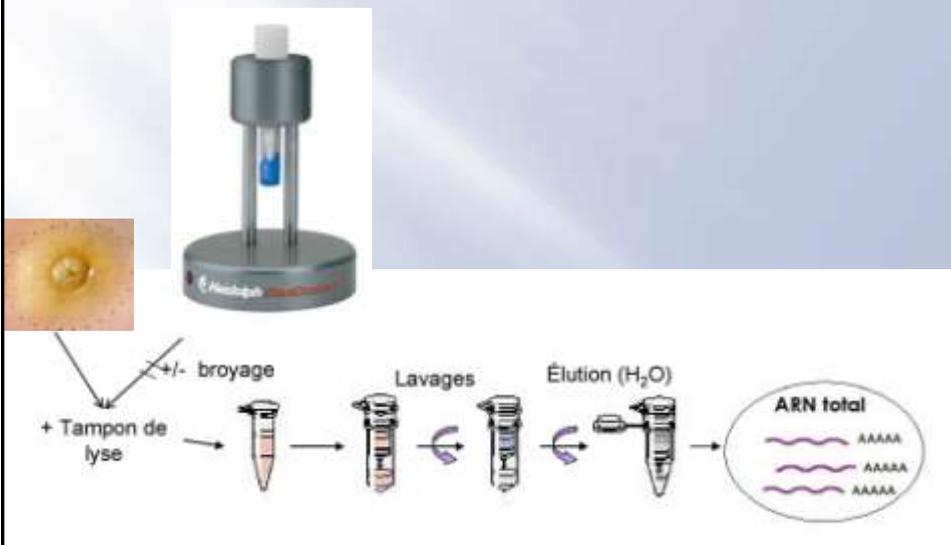


Microarray

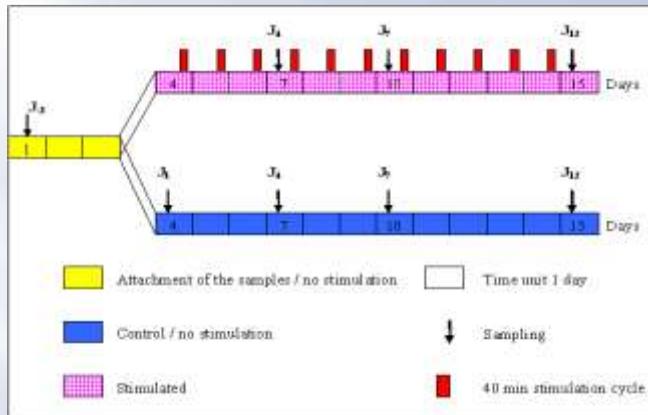
- Affymetrix U133 Plus 2.0 chips
- Analyse de l'expression transcriptionnelle de 38,500 genes



Microarray



Modèle expérimental



8 prélèvements X 3 patients = 24 échantillons d'ARNm

Modèle expérimental



8 prélèvements X 3 patients = 24 échantillons d'ARNm

Résultats Microarrays

Nombre de gènes sur- ou sous-exprimé

Comparaison	<u>Stimulé</u> <u>Témoin</u>		
	$\frac{J4_s}{J4_t}$	$\frac{J7_s}{J7_t}$	$\frac{J12_s}{J12_t}$
Sur-exprimé	39	30	237
Sous-exprimé	265	190	259

P < 0,05 et FC > 2

Résultats Microarrays

Nombre de gènes sur- ou sous-exprimé

Comparaison	<u>Stimulé</u> <u>Témoin</u>		
	$\frac{J4_s}{J4_t}$	$\frac{J7_s}{J7_t}$	$\frac{J12_s}{J12_t}$
Sur-exprimé	39	30	237
Sous-exprimé	265	190	259

3 gènes commun aux listes J4S/J4T, J7S/J7T, J12S/J12T

P < 0,05 et FC > 2

Résultats Microarrays

TXNRD1 : Thioredoxin reductase 1

FC : J4=2,02 J7=3,22 J12=2,34

diminution de la prolifération chez l'embryon

ATF3 : Activating transcription factor 3

FC : J4=2,49 J7=13,41 J12=9,28

concentration augmentée dans le processus de différenciation des chondrocytes

MME : Membrane metallo-endopeptidase

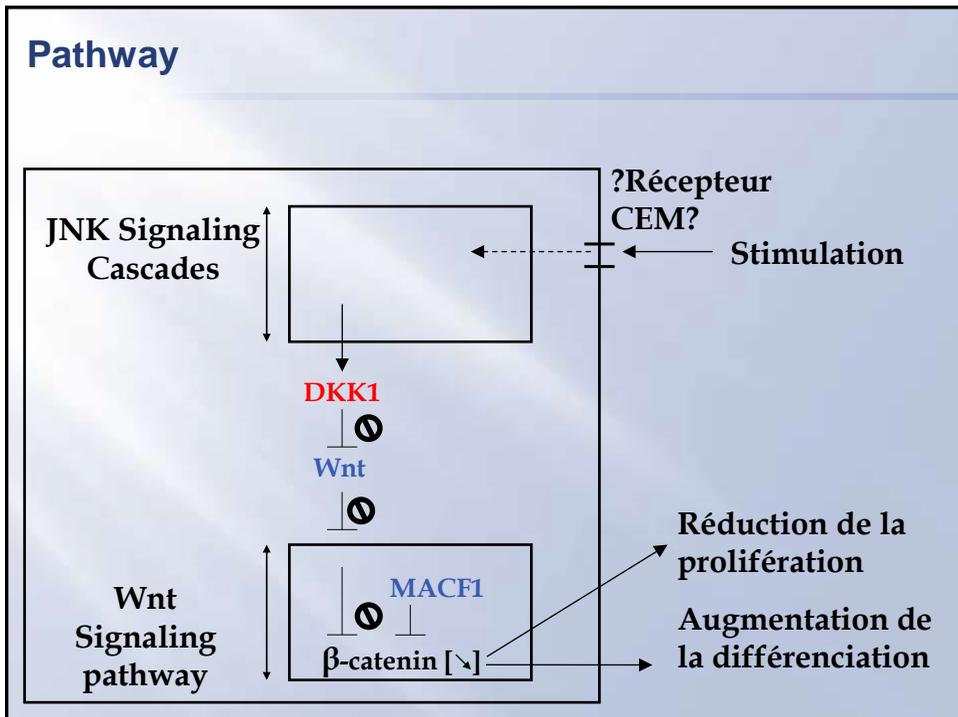
FC : J4=3,02 J7=5,53 J12=20,28

arrête la mitose en phase G1,
diminue la prolifération

Résultats Microarrays

- Différenciation cellulaire
- Prolifération cellulaire
- Régulation du cycle mitotique
- Protection cellulaire face au stress

Validation PCR



Observation intéressante

Parallèle entre

nos résultats microarrays
et
les mécanismes de la Leucémie Lymphoblastique aiguë (ALL)
connus dans la littérature :

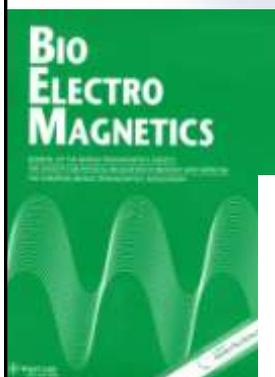
Inversion dans la régulation de certains gènes d'intérêt

Observation intéressante

“...inhibition of β -catenin induces apoptosis of ALL establishes this pathway (Editor's note: WNT pathway) as an attractive target for the use of more specific therapies...”

Roman-Gomez et al., Blood. 2007 Apr 15;109(8):3462-9

Publication



Bioelectromagnetics 32:28–36 (2011)

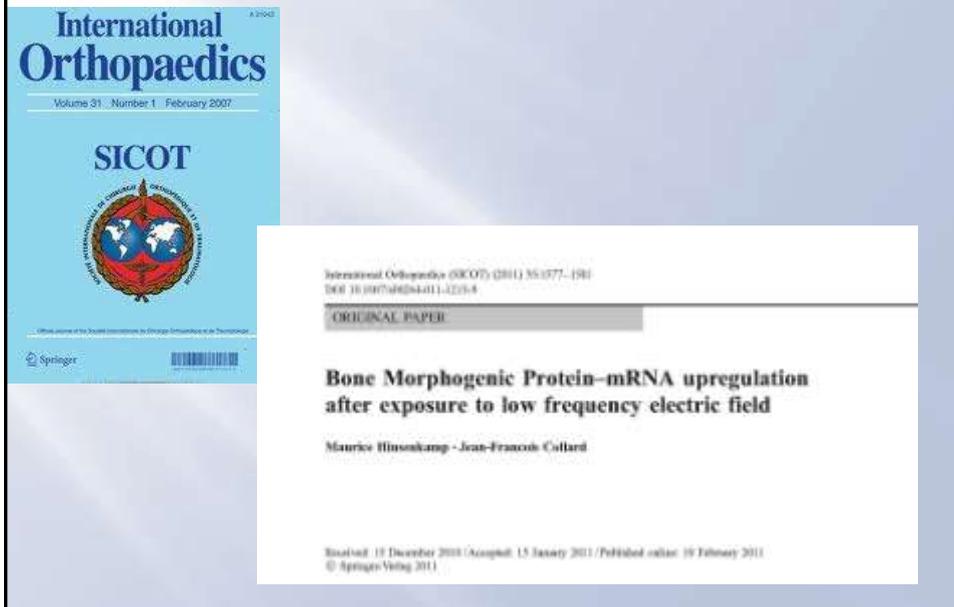
In Vitro Study of the Effects of ELF Electric Fields on Gene Expression in Human Epidermal Cells

Jean-Francois Collard, Benjamin Mertens, and Maurice Hinsenkamp*

Laboratoire de Recherche en Géométrie Biomécanique (LRGT),
Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium

Acceleration of differentiation, in the expense of proliferation, is observed after exposure of various biological models to low frequency and low amplitude electric and electromagnetic fields. Following these results showing significant modifications, we try to identify the biological mechanisms involved at the cell level through transcriptome screening. For this study, we use epidermal cultures harvested from human skin biopsies. Two platinum electrodes are used to apply the electric signal. The gene expression of 35,510 well characterized human genes are analyzed using Affymetrix[®] microarray U133 Plus 2.0 chips. The protocol is repeated on three different patients. After three periods of exposure, a total of 24 chips have been processed. After the application of ELF electric fields, the microarray analysis confirms a modification of the gene expression of epidermal cells. Particularly, four up-regulated genes (CXCL1, TNFSF10, ATE1, and MME1) and one down-regulated gene (GNAQ1) are involved in the regulation of proliferation and differentiation. Expression of these five genes was also confirmed by real-time qPCR in all samples used for microarray analysis. These results corroborate an acceleration of cell differentiation at the expense of cell proliferation. Bioelectromagnetics 32:28–36, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Publication: BMP-2



Publication: BMP-2

Les cellules de l'épiderme humain montrent une sur-régulation significative de l'ARNm BMP-2 après 12 jours de stimulation (40min/jour) à un courant électrique de basse fréquence et de faible intensité.

$$(FC J12_g/J12_t = 2.82, p\text{-value}=0.038)$$

Publication: triangulation



The image shows the cover of the journal 'Progress in Biophysics & Molecular Biology' on the left and a screenshot of an article in press page on the right. The journal cover features the title, editors Denis Noble and Tom L. Blundell, and a list of reviewers. The article in press page is for a review titled 'Statistical validation of the acceleration of the differentiation at the expense of the proliferation in human epidermal cells exposed to extremely low frequency electric fields' by J.-F. Collart, C. Lazar, A. Nivo, and M. Hinsen.

PROGRESS IN Biophysics & Molecular Biology
An International Review Journal

EDITORS
Denis Noble
Tom L. Blundell

REVIEWED BY
David Robinson, Peter F. Ince, and
Cristina Quarta

COVER
Cover
Cover

ARTICLE IN PRESS

Progress in Biophysics and Molecular Biology (2013), 1-11

Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Biophysics and Molecular Biology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/progress

Review

Statistical validation of the acceleration of the differentiation at the expense of the proliferation in human epidermal cells exposed to extremely low frequency electric fields

J.-F. Collart^a, C. Lazar^b, A. Nivo^b, M. Hinsen^{a,c,*}

^aYukawa Institute for Theoretical Physics (YITP), Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0191, Japan
^bDepartment of Computer Science, Faculty of Sciences, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

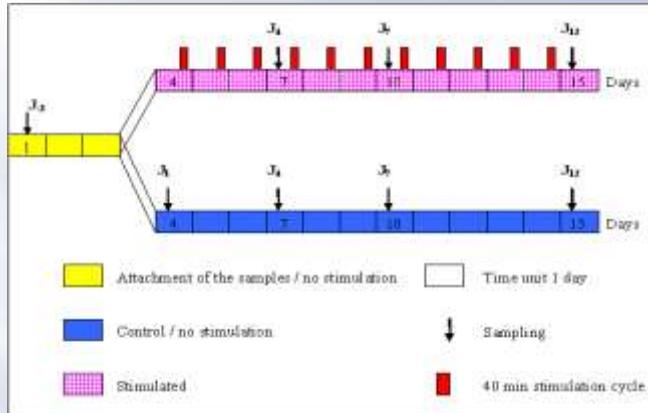
ABSTRACT

An acceleration of differentiation at the expense of proliferation is observed in our previous publications, but, at the time, the accuracy of a model based on cell cycle, cell death, and low-frequency

Publication triangulation : But de la publication

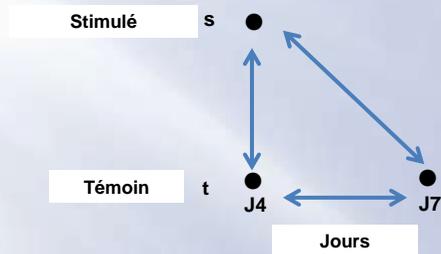
- Validation des résultats par une 2ème méthode statistique.
- Confirmation de l'hypothèse que la stimulation ELF accélère la sur- ou sous-régulation de certains gènes. Ces modifications apparaissent aussi dans les échantillons témoins mais plus lentement.

Triangulation : Hypothèse



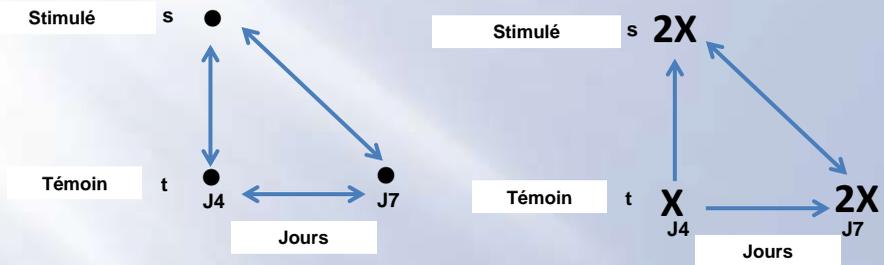
L'échantillonnage au cours du temps permet de comparer l'évolution naturelle du groupe contrôle à l'effet du stimulus

Triangulation : Hypothèse



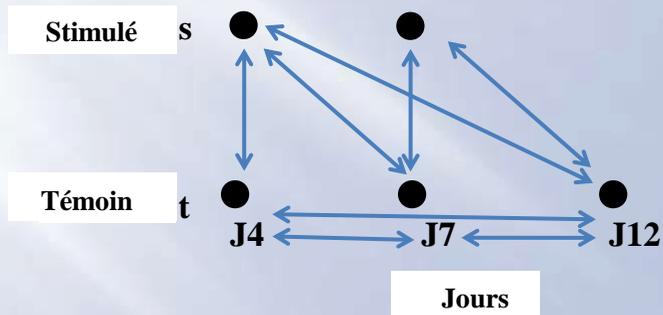
La stimulation ELF a-t-elle le même effet sur une cellule que le temps sur l'évolution naturelle d'une cellule non stimulée?

Triangulation : Hypothèse



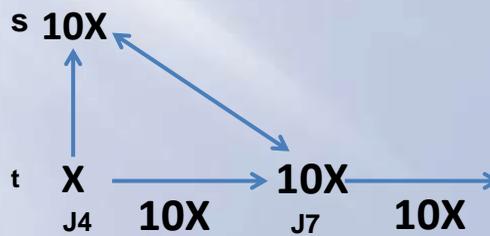
La stimulation ELF a-t-elle le même effet sur une cellule que le temps sur l'évolution naturelle d'une cellule non stimulée?

Triangulation : Hypothèse



Triangulation : Résultats

- Triangle J4_s-J4_t-J7_t
 - Il y a 319 gènes qui rencontrent les 3 conditions de p-value dans le triangle J4s-J4t-J7t



Triangulation : Résultats

DKK1

- Inhibe la voie de signalisation Wnt
- L'inhibition de la voie de signalisation Wnt est nécessaire pour l'induction de la différenciation cellulaire et l'inhibition de la prolifération cellulaire

Triangulation : Résultats

SPRR3

- Son expression est associée avec la différenciation épidermique de la peau normale.

Triangulation : Résultats

NDRG4

- L'expression de ces protéines est sur-exprimée durant la différenciation cellulaire et sous-exprimée dans plusieurs types de cellules tumorales

Triangulation : Résultats

CHEK1

- CHEK1 joue un rôle essentiel mais mal défini dans la prolifération des cellules normales

Triangulation : Résultats

UBE2D3

- Joue un rôle dans la voie de signalisation des BMP

Le rôle des BMPs dans l'ostéogenèse et la consolidation des fracture est bien connu

Triangulation : Conclusions

- Nouvelle validation par une deuxième méthode statistique des résultats microarrays montrant une sur- ou sous-expression significative d'un certain nombre de gène
- La stimulation ELF accélère la sur- ou sous-régulation de certains gènes qui, dans des circonstances normales, auraient suivi le même schéma de régulation (sur- ou sous-régulé) mais d'une manière plus lente

Pathway Studio

Conclusions

- Les résultats montrent :
 - une cohérence avec les résultats des études *in vitro* et *in vivo* précédentes
 - une accélération de la différenciation cellulaire au dépend de la prolifération
 - une modification de l'expression génique
 - une liste de gènes jouant un rôle dans l'accélération de mécanismes normaux (prolifération, différenciation,...)
 - Une sélection de ces gènes pourrait servir de marqueur à la sensibilité d'un tissu aux champs