

N°1128

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX I

Par Sophie TUFFET

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

Spécialité : Biologie et Physiologie Cellulaires

**LES CHAMPS MAGNETIQUES PULSES PEUVENT-ILS MODIFIER
LA PROLIFERATION CELLULAIRE ?**

Etude expérimentale de modèles *in vivo* et *in vitro* des mécanismes
pouvant être impliqués en pathologie tumorale et dans l'activation
du système immunitaire

soutenue le 12 juillet 1994

Après avis de MM. :

L. Mir : I. G. Roussy, Villejuif - Chargé de recherches CNRS	Rapporteur
F. Bersani : Université de Bologne (Italie), Professeur	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de MM. :

J. Jousot - Dubien : Université Bordeaux I, Professeur, Directeur de thèse	Président du jury
Dr B. Lesourd - Pitié Salpêtrière, Paris - Maître de Conférences, Directeur du Laboratoire d'Immunologie	Examineur
B. Veyret - Université Bordeaux I - Directeur de recherches CNRS	Examineur
C. Chapron : Université de Bordeaux I - Professeur	Examineur

1994

Laboratoire de Physique des Interactions Ondes-Matière (PIOM) de l'école d'ingénieur de chimie et de physique à Bordeaux I.

Ce laboratoire PIOM, associé au CNRS depuis le début de l'année 1992, fait partie de l'école pratique des hautes études.

il est constitué de 3 équipes:

- la première étudie les interactions ondes-solides
- la deuxième les interactions ondes-liquides
- et enfin la troisième, l'équipe de Bioélectromagnétisme à laquelle je suis associée, étudie les interactions ondes-organismes vivants.

La présentation de cette thèse est l'occasion privilégiée pour moi d'exprimer ma reconnaissance à tous les membres de l'équipe pluridisciplinaire de bioélectromagnétisme, au sein de laquelle j'ai partagé un enthousiasme, une intensité de travail, une chaleur dans les relations humaines, qui m'ont aidée à progresser dans ce travail de recherche et contribué à mon épanouissement. Je remercie personnellement :

J. JOUSSOT-DUBIEN Professeur physico-chimiste, directeur du laboratoire
B. VEYRET, Directeur de recherche CNRS physico-chimiste
J. MOREAU, Maître de Conférence physiciens
M. Le DIRAISON, technicienne
J.L. CHAGNAUD, chercheur biologiste
E. BARBIER, allocataire de recherche en thèse de Biologie
S. MNAIMNEH, étudiante en thèse de Biologie

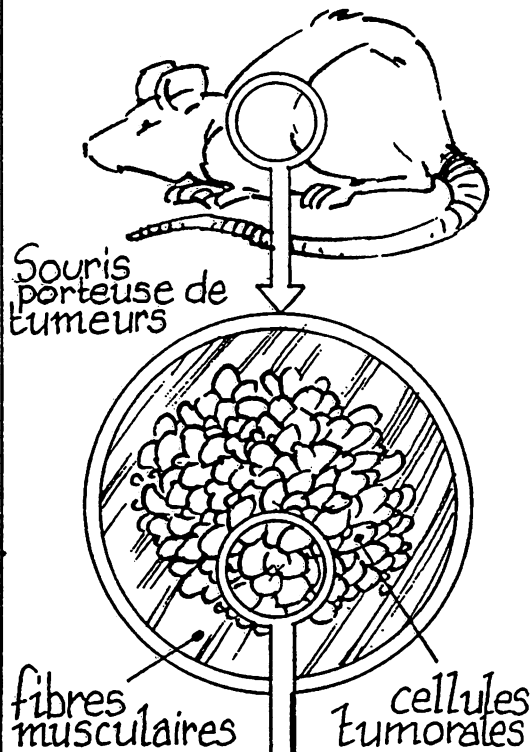
Je remercie également les membres du jury messieurs :

L.MIR et **F. BERSANI** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir consacré une partie de leur temps à l'étude de ce mémoire;
monsieur **C. CHAPRON** d'avoir accepté de faire partie du jury;
et monsieur **B. LESOURD** d'avoir soutenu et accompagné ce travail.

"ce-qui-n'est-pas est ce qui n'est pas,
donc il est... donc il n'est plus."

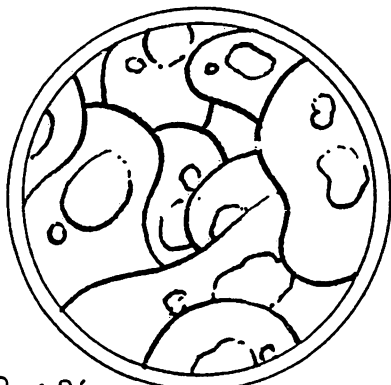
Sow Télémaq

In vivo

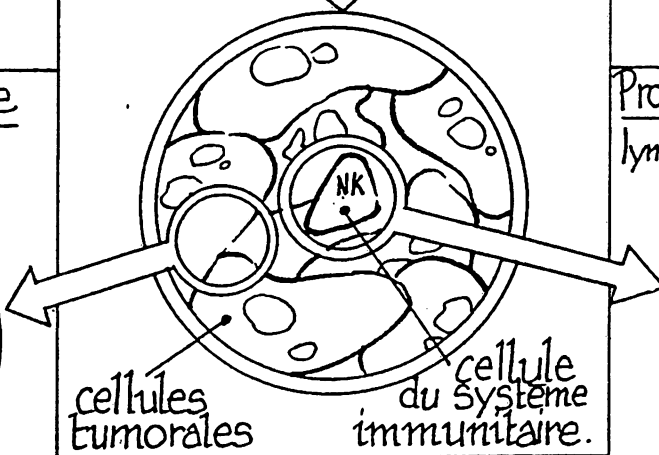


In vitro

Prolifération anarchique

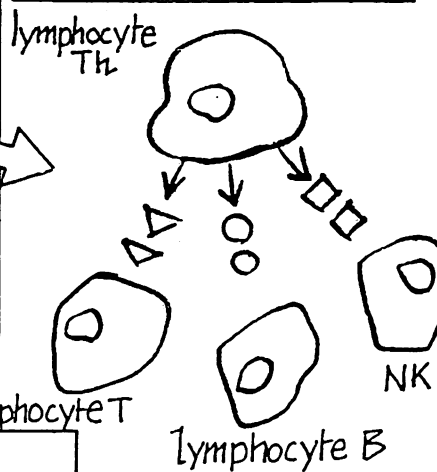


Prolifération anarchique des cellules tumorales ayant perdu l'inhibition de contact.

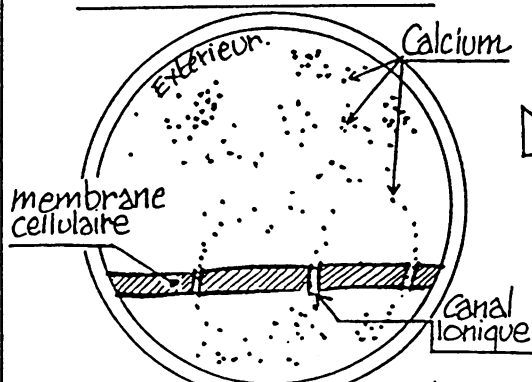


In vitro

Prolifération orchestrée



ACTIVATION



Activation de la cellule tueuse par augmentation du calcium intracellulaire.

Activation de la cellule tueuse par augmentation du calcium intracellulaire.

CHAMP
MAGNETIQUE

In vivo

CHAMP
MAGNETIQUE

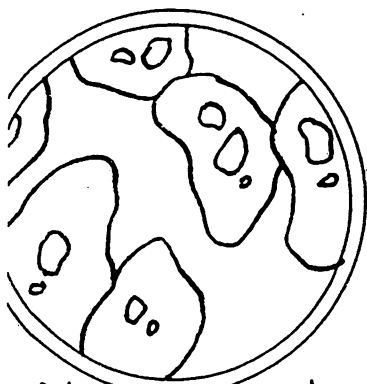
Souris
porteuse de
tumeurs

CHAMP
MAGNETIQUE



In vitro

Prolifération anarchique

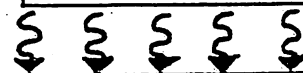


Prolifération réduite
sous champ magnétique.

fibres
musculaires

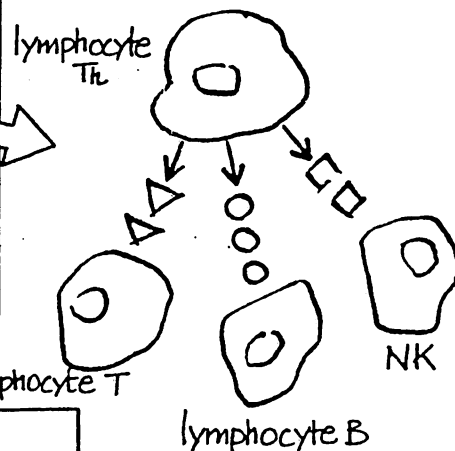
cellules
tumorales

CHAMP
MAGNETIQUE

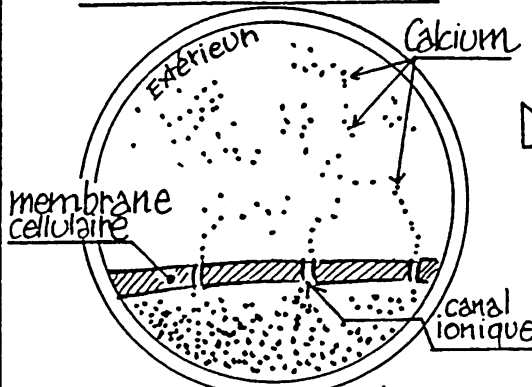


In vitro

Prolifération orchestrée



ACTIVATION



Concentration de calcium
plus importante dans la
cellule immunitaire.

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 A) Matériels et Méthodes	15
A-1) Définitions	15
A-2) Equipement physique	15
A-2-1) Champs magnétiques intenses	15
A-2-2) Champs magnétiques faibles	17
A-2-3) Champs électriques	18
A-3) Description de la régulation de température	20
A-3-1) Pour des expositions <i>in vivo</i> de champs magnétiques intenses (120 mT)	20
A-3-2) Pour les expositions <i>in vitro</i> de champs magnétiques intenses (180 mT)	21
A-3-3) Pour les expositions <i>in vitro</i> de champs magnétiques faible (5 mT)	21
A-4) Matériels biologiques	22
A-4-1) Les animaux	22
A-4-2) Les lignées tumorales	22
A-4-3) les milieux de culture	22
A-5) Méthodes et Techniques	22
A-5-1) Expositions <i>in vivo</i>	22
A-5-1-1) <i>Tumeurs chimio-induites</i>	23
A-5-1-2) <i>Tumeurs greffées</i>	23
A-5-1-3) <i>Croissance destumeurs</i>	23
A-5-1-4) <i>Mesure de l'activité Natural Killer</i>	23
A-5-2) Expositions <i>in vitro</i>	25
A-5-2-1) <i>Test colorimétrique MTT</i>	25
A-5-2-2) <i>Prolifération des lignées tumorales</i>	25
A-5-2-3) <i>Prolifération des lymphocytes spléniques</i>	26
A-5-2-4) <i>La cytométrie en flux</i>	27
A-5-2-5) <i>Mise au point du protocole</i>	30
A-6) Outils statistiques	31

ABBREVIATIONS

ADN : acide desoxyribonucléique

ATP : adénosine trisphosphate

Ca²⁺ : calcium

ConA : concanavalin A

DAG : diacylglycerol

ELF : extremely low frequency (extrêmes basses fréquences)

fig : figure

hepes : N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

Hz : hertz

IL2 : interleukine 2

IP3 : inositol triphosphate

K⁺ : potassium

IRM : imagerie par résonance magnétique

M : molaire

MHZ : mégahertz

MTT : 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

mW/cm² : milliwatts par centimètre carré

NK : Natural Killer

SD : sprague-dawley

SDS : sodium dodecyl sulfate

t : temps

T : tesla

μA/cm² : microampère par centimètre carré

UV : ultra-violet

CHAPITRE 2 :	B) Résultats et Discussion	32
B-1) Effets de champs magnétiques <i>in vivo</i>		32
B-1-1) Etude de l'effet sur la croissance de tumeurs		32
<i>B-1-1-1) Tumeurs chimio-induites-</i>		32
<i>B-1-1-2) Discussion</i>		42
<i>B-1-1-3) Tumeurs greffées : mélanome B16</i>		46
<i>B-1-1-4) Discussion -</i>		49
B-1-2) Etude de l'effet sur l'activité Natural Killer		51
<i>B-1-2-1) Réplication des expériences faites à Limoge</i>		60
<i>B-1-2-2) Etude sur une autre espèce de souris</i>		61
<i>B-1-2-3) Discussion</i>		62
B-2) Effets de champs magnétiques <i>in vitro</i>		64
B-2-1) Etude des effets du champ magnétique intense (180 mT) lors d'une exposition de longue durée		64
<i>B-2-1-1) Prolifération de lignée tumorale</i>		64
<i>B-2-1-2) Etude des effets sur les lymphocytes</i>		78
B-2-2) Etude des effets du champ magnétique faible (5mT) pendant une exposition courte (30 minutes) sur la réponse calcique		83
<i>B-2-2-1) Contrôle de la température</i>		85
<i>B-2-2-2) Concentration du mitogène</i>		85
<i>B-2-2-3) Calibration</i>		86
<i>B-2-2-4) Expériences contrôles</i>		87
<i>B-2-2-5) Analyse statistique</i>		88
<i>B-2-2-6) Expériences à 5 mT, 0,8 Hz</i>		89
<i>B-2-2-7) Expériences à 5 mT, 0,8 Hz sans activation</i>		90
<i>B-2-2-8) Expériences à 5 mT, 16 Hz</i>		91
<i>B-2-2-9) Expériences à 0,1 mT, 0,8 Hz</i>		91
<i>B-2-2-10) Expériences à 5mT, 0,8 Hz avec une augmentation du champ électrique</i>		92
<i>B-2-2-11) Importance de l'âge des animaux</i>		93
<i>B-2-2-12) Les oscillations de calcium</i>		94
<i>B-2-2-13) Effet sur l'activation et sur la prolifération</i>		95
<i>B-2-2-14) Etude des différentes populations cellulaires</i>		96
<i>B-2-2-15) Etude du cycle cellulaires</i>		98
B-2-3) Discussion		99
 Conclusion et perspectives		 101
Références bibliographiques		110

INTRODUCTION

Le sujet sur lequel notre laboratoire travaille depuis quelques années fait partie du bioélectromagnétisme. Dans un sens initial et éthymologique, le bioélectromagnétisme se définit comme l'étude des interactions de tous les rayonnements électromagnétiques avec les systèmes vivants. La définition que nous adopterons dans ce mémoire sera plus restrictive. Mais, avant de préciser cette définition, et afin de mieux cadrer notre propos, j'introduirai des phénomènes bioélectromagnétiques connus des biologistes et qui sont écartés de notre domaine de recherche.

Il existe des cas bien connus où les ondes électromagnétiques agissent sur des éléments membranaires spécialisés dans leur réception, par exemple le système membranaire des cellules de la rétine des vertébrés. Ces cellules produisent une réponse électrique aux rayonnements électromagnétiques visibles (environ 10^{14} Hz), permettant aux animaux d'être renseignés sur leur environnement visible et de réagir en conséquence. Un autre exemple est constitué par les chloroplastes qui captent l'énergie lumineuse et la transforment en gradient transmembranaire de protons, déclenchant ainsi la synthèse d'ATP à la base de presque toute la bioénergétique. Nous excluons de notre définition du bioélectromagnétisme de tels effets qui sont traditionnellement étudiés dans le cadre de la photobiologie appliquée à la physiologie animale et végétale.

Par ailleurs, des rayonnements électromagnétiques extrêmement énergétiques, tels que les rayons UV, X, gamma dont les fréquences vont de 10^{15} à 10^{20} Hz, ont une action mutagène bien connue sur l'ADN. De tels effets sont étudiés et utilisés en génétique et en radiobiologie. Nous excluons également ce type de phénomène dans notre définition du bioélectromagnétisme.

Enfin d'autres effets de rayonnements électromagnétiques, comme les infrarouges, les micro-ondes, sont indirects et provoquent l'échauffement des tissus. Nous n'incluons pas non plus ces effets thermiques dans notre approche du bioélectromagnétisme.

Dans les deux premiers exemples décrits, les ondes électromagnétiques agissant selon des mécanismes, certes différents, interviennent au niveau d'une membrane biologique. Il est à noter que lors de la réaction d'une membrane biologique à une onde, la réponse ultime est de nature électrique et peut se traduire par un changement du potentiel transmembranaire de part et d'autre de cette membrane biologique.

Définition du bioélectromagnétisme

Existe-t-il des interactions des champs électromagnétiques avec des éléments cellulaires qui ne sont pas spécialisés dans leur réception ? Cette question a pendant longtemps suscité interrogations et polémiques. Mais c'est seulement depuis quelques années que le bioélectromagnétisme est l'activité d'un grand nombre de chercheurs qui s'intéressent à l'étude des effets des champs électromagnétiques non ionisants et non thermiques, c'est à dire dont les fréquences vont du continu (fréquence nulle) aux micro-ondes (3.10^{11} Hz) et dont les puissances sont inférieures à 10 mW/cm^2 .

Ce domaine de recherche fondamentale est en amont de deux voies d'investigation finalisées : les applications médicales et l'environnement.

Bioélectromagnétisme dans le domaine médical

Des applications bénéfiques de champs ont déjà été développées dans le domaine médical. Citons l'utilisation des champs électriques intenses pulsés (de l'ordre du kV/cm) qui est certainement l'application médicale la mieux comprise au niveau des mécanismes. Elle entraîne la perméabilisation de membranes cellulaires d'une façon réversible; on retrouve ce procédé en électrochimiothérapie, par exemple (Mir et al, 1991).

En diagnostic, certains champs pulsés et intenses utilisés pour l'imagerie à résonance magnétique (IRM), ne doivent pas cette fois modifier les systèmes vivants, mais uniquement les sonder. Jusqu'ici, il n'a pas été décelé de changements physiologiques chez les patients dans les conditions habituelles d'examens.

Les propriétés des champs électromagnétiques sont aussi utilisées pour les explorations fonctionnelles neurologiques et contribuent également au diagnostic de certaines pathologies neurologiques (magnétostimulation). Des champs magnétiques de faibles intensités (1-10 mT), variables (sinusoïdaux ou pulsés) à des fréquences basses, favorisent la consolidation des fractures pathologiques et la cicatrisation (Bassett 1974a; 1974 b; Hinsenkamp, 1990).

Bioélectromagnétisme dans le domaine de l'environnement

En même temps que naissaient ces nouvelles utilisations prometteuses, le bioélectromagnétisme s'est développé ces dernières années à la suite d'études épidémiologiques qui ont mis en cause l'exposition continue et croissante de l'homme aux champs électromagnétiques dans son environnement : écrans d'ordinateurs (INSERM 1986; Savitz et al., 1987; Höjevik, 1991; London et al., 1991), lignes de distribution d'électricité. Ces dernières produisent des champs magnétiques sinusoïdaux de l'ordre de 50 μ T, 50 ou 60 Hz, champs habituellement classés sous la dénomination ELF (initiales de Extremely Low Frequency) puisqu'ils ont une fréquence comprise entre 0 et 300 Hz.

La question de l'impact des champs produits par les lignes haute tension a été abordée au cours d'études épidémiologiques menées en Suède (Feychting et Ahlbom 1992), et aux USA (Savitz et al. 1988). celles-ci n'ont révélé aucune incidence sur la santé publique; par contre une étude récente, concernant les trois organismes Electricité de France, Ontario hydro et hydro Québec (Thériault et al., 1994), a montré un risque significativement accru de leucémie aigüe non lymphoïde et de leucémie myéloïde aigüe, en outre un faible doute subsiste pour certaines tumeurs cérébrales. Les craintes persistantes de l'opinion publique, des effets secondaires issus de l'environnement électromagnétique, ont incité certains fabricants à adopter une position prudente. Les écrans d'ordinateurs, par exemple, ont été modifiés afin de diminuer le niveau d'émission des champs (NRPB 1992).

Au vu des incertitudes et des appréhensions évoquées tant au niveau médical que dans le domaine de l'environnement, il apparaît plus que jamais nécessaire de persévérer dans une approche fondamentale qui seule peut permettre la mise en évidence des effets et l'élucidation des mécanismes impliqués.

L'activité de notre groupe a eu pour point de départ la recherche d'effets biologiques de champs électromagnétiques artificiels, n'existant pas dans l'environnement, et susceptibles d'être optimisés dans un objectif d'applications médicales.

Conjointement avec la recherche exploratoire d'effets, le bioélectromagnétisme doit répondre à une exigence cruciale : le choix de modèles et de méthodes adéquats pour reproduire les effets observés, et résoudre un problème central : l'identification de la ou des cibles qui demeurent globalement inconnues.

I) Rôle clef des membranes biologiques

les cibles privilégiées des champs électromagnétiques pourraient être liées au fonctionnement des membranes biologiques.

I-1) Activité électrique des membranes

Les membranes sont le siège de perturbations donnant lieu à des mouvements d'ions par le fonctionnement de pompes qui engendrent des gradients électrochimiques. Si les cellules créent certains champs électriques pour des fonctions précises, on peut penser, à priori, que l'exposition à des champs extérieurs aura une interférence avec le fonctionnement des membranes. Mais il faut noter que les champs électriques, créés naturellement par les cellules, sont d'un ordre de grandeur bien plus élevé que ceux créés de l'extérieur par application de champs électriques et magnétiques.

I-2) Energies mises en jeu

L'énergie de l'agitation thermique ($kt = 0,03 \text{ eV}$) étant supérieure à l'énergie des photons électromagnétiques ($kt = 10^{-12} \text{ eV}$) de très basses fréquences, il ne peut y avoir de modifications des liaisons chimiques (l'énergie de liaison est de 3 eV) par les champs électromagnétiques; donc les éventuelles influences des champs sur les mécanismes cellulaires ne pourraient exister que sous certaines conditions.

I-3) Cible effective

La membrane biologique est la cible effective lors d'expositions aux champs électriques intenses que nous avons déjà évoqués dans les applications médicales. Durant de telles expositions, les phénomènes d'électroporation provoqués par les impulsions électriques interviennent au niveau des membranes avec une augmentation importante du potentiel transmembranaire (on passe de -50 mV à $-200, -300 \text{ mV}$).

I-4) Cibles potentielles

La composante électrique induite par les champs magnétiques pulsés de basse fréquence peut avoir une action à la surface des cellules en modifiant par exemple la polarisation de la membrane, cependant l'amplitude de cet éventuel effet paraît trop faible pour induire des effets biochimiques. En revanche, la composante magnétique pourrait intervenir au niveau des ions (tel que le calcium, par exemple) par des phénomènes de résonance.

Les champs magnétiques peuvent avoir une action à l'intérieur des cellules sur des molécules particulièrement sensibles aux champs (complexe Ca^{2+} calmoduline).

La présence de "particules magnétites biogéniques" (Fe_3O_4) dans le cerveau humain (Kirschvink et al. 1992) et plus généralement dans l'organisme pourrait expliquer certaines interactions entre les champs et les tissus. Ces particules, qui sont de petits aimants, pourraient être des cibles privilégiées des champs magnétiques. Toutefois, leur rôle dans les diverses structures cellulaires reste encore énigmatique.

Dans le cas des eucaryotes supérieurs, la membrane cytoplasmique est soumise à des stimuli provenant du milieu extracellulaire, déclenchant, selon des mécanismes complexes, la prolifération et la différenciation cellulaire.

II) Processus biologiques impliquant les cibles éventuelles

La prolifération cellulaire nous est apparue essentielle dans le cadre de notre étude pour deux raisons : c'est une des caractéristiques du vivant et c'est un processus qui paraît être sensible aux champs électromagnétiques.

Notre choix s'est orienté vers l'étude de deux types de cellules qui, sous certaines conditions, peuvent proliférer de façon massive : les lymphocytes et les cellules tumorales.

Les lymphocytes peuvent être activés en culture entraînant ainsi leur prolifération et les cellules tumorales ont une prolifération anarchique, de part la dérégulation de certains gènes.

II-1) Activation et prolifération des lymphocytes

Les lymphocytes sont programmés pour proliférer rapidement dans des situations de stress, d'agression et de défense. Ce sont des cellules bien caractérisées et un modèle de culture bien maîtrisé.

Leur prolifération, provoquée dans des conditions physiologiques par des stimuli naturels (antigènes), est simulée artificiellement *in vitro* par l'adjonction d'activateurs particuliers : les substances mitogènes (Freedman et al., 1975; Lichtman et al., 1983).

L'activation est une augmentation des fonctions, induite par l'activateur, qui commence par la formation de lymphoblastes et continue à travers le cycle cellulaire et la différenciation.

Les mitogènes, en se fixant sur les membranes, entraînent la cascade métabolique qui permet aux lymphocytes de rentrer dans le cycle cellulaire tous en même temps : il y a donc synchronisation des cellules de la phase G_0 (phase de repos) vers la phase G_{1a} (première étape de l'activation).

Lors de l'activation des lymphocytes par les mitogènes, certaines cascades métaboliques ont particulièrement retenu notre attention.

- La première réponse à la fixation du mitogène est l'entrée de K^+ dans les 30 secondes qui suivent. Cette entrée est compensée par la sortie de Na^+ pendant les 5 premières minutes. Ces variations de potentiels transmembranaires sont le résultat des mouvements ioniques ATP dépendants par les $Na^+K^+ATPases$.

- Durant ces premières minutes de l'activation la concentration de calcium intracellulaire entre en augmentation, un phénomène qui a été beaucoup étudié (Freedman et al., 1975; Tsien et al., 1982; Hesketch et al., 1985; Poenie et al., 1985). La mobilisation du calcium varie selon la sous-population concernée.

Le taux de calcium, bas au repos, augmente pendant 8 à 10 minutes par relargage de calcium de stocks internes qui sera suivi d'une augmentation soutenue de calcium due à une entrée massive de calcium extracellulaire, via des canaux ioniques. L'influx de calcium agit sur la phospholipase A_2 qui libère des acides gras tels que l'acide arachidonique. L'acide arachidonique entraîne la production de prostaglandines et de leucotriènes qui vont permettre un auto-contrôle de la fluidité membranaire.

L'entrée de calcium que nous venons de décrire semble nécessaire à la production de l'interleukine 2 chez les lymphocytes T et contribue au déclenchement de l'activation des récepteurs qui provoque l'hydrolyse de la phospholipase C qui, à partir du phosphatidylinositol diphosphate membranaire, donne de l'inositol trisphosphate. L'inositol trisphosphate va permettre la libération du calcium séquestré dans le réticulum endoplasmique, et du diacylglycerol qui va activer la protéine kinase C.

L'inositol trisphosphate joue vraisemblablement le rôle de second messenger. L'activation de l'adénylate cyclase va former de l'AMPc qui, à son tour, joue un rôle prépondérant en activant les protéines kinases.

Une partie du calcium va se fixer sur la calmoduline. Ce complexe change alors de conformation et permet à d'autres protéines de se fixer entraînant une activation de nouvelles fonctions. Quatre grands types de protéines peuvent se fixer ainsi selon des affinités différentes : les protéines kinases et phosphatases, les phosphodiesterases et adénylates cyclases, les protéines du cytosquelette, les calcium ATPases.

- Les kinases activées vont à leur tour activer d'autres protéines en les phosphorylant, ce qui peut aboutir par exemple au couplage des sous-unités catalytiques et régulatrices d'une protéine.

Suite à cette activation, les lymphocytes changent de forme, ils peuvent devenir très gros et très étalés, ils sont appelés alors lymphoblastes et finissent, à travers le cycle cellulaire (Maizel et al., 1981), par se diviser et enfin par se différencier.

Les lymphocytes permettent donc, d'une part, l'étude des interactions récepteurs-antigènes, d'autre part, l'étude des flux ioniques, tels que ceux du calcium, à travers la membrane cellulaire et cela d'autant plus que toute perturbation de flux calciques est liée à des modifications dans la prolifération.

La prolifération des lymphocytes suite aux contacts avec les antigènes, est un des modèles les plus utilisés dans le bioélectromagnétisme

(Conti et al, 1983; Smith et al., 1983; Emilia et al., 1985; Mooney et al., 1986; Cadossi et al., 1988; Lyle et al., 1988; Polidori et al., 1988; Bersani et al., 1989; Waliczek 1992).

Il n'y a jamais eu d'effets observés sur des lymphocytes pendant la phase de repos G_0 où ils ne prolifèrent pas. (Conti et al., 1983; Emilia et al., 1985; Mooney et al., 1986; Polidori et al., 1988).

L'activation des lymphocytes par les mitogènes est un modèle intéressant car la synchronisation de cellules de G_0 à G_{1a} qu'elle induit fait que si les champs ont un effet sur une phase spécifique du cycle cellulaire, on peut s'attendre à ce que cette activation simultanée en G_{1a} permette d'augmenter l'amplitude de l'effet.

Une variation de la concentration en mitogènes, qui module les flux calciques, est un paramètre important, car elle provoque une modulation de la sensibilité des cellules aux champs.

La sensibilité des lymphocytes aux champs est accrue dans le cas d'une mobilisation réduite du calcium (Walleczek et al., 1990). Cela a été observé, entre autres, en utilisant différentes concentrations de mitogènes qui modulent la prolifération (Conti et al., 1986; Cantini et al. 1986). Lorsque la concentration de mitogènes utilisée entraîne une prolifération qui n'est pas maximale, il y a souvent stimulation de la prolifération sous l'action des champs. Dans le cas contraire, si les concentrations en mitogènes sont fortes et suractivent les lymphocytes, il peut y avoir inhibition de la prolifération par suite de l'exposition. De nombreuses variations dans la prolifération se traduisent ainsi par des effets de champs qui peuvent être très différents (Conti et al., 1986, Cadossi et al., 1992).

Sur les lymphocytes humains, des chercheurs italiens ont observé, chez les sujets âgés, une prolifération réduite des lymphocytes en culture (Cossarizza et al., 1989a; Cadossi et al., 1992). Par exemple, des lymphocytes en culture, de sujets âgés, en bonne santé présentent 15-20% des cellules qui ne prolifèrent plus. Le même phénomène a été mis en évidence dans certaines pathologies (Cossarizza et al., 1989b; 1991; Cadossi et al., 1992) : le pourcentage de lymphocytes ne proliférant plus peut aller dans ce cas jusqu'à 80% (Lesourd 1990).

Les auteurs (Cossarizza et al., 1989a et b; Cadossi et al., 1992) montrent que les effets des champs sur la prolifération des lymphocytes varient à cause des processus du vieillissement et des déficiences liées aux maladies. Il est suggéré que les champs magnétiques pulsés restaurent la capacité proliférative des lymphocytes exposés en favorisant leur entrée dans le cycle cellulaire (Baserga et al., 1985; Cossarizza et al., 1989).

Les effets sur l'influx et l'efflux du calcium ont été aussi étudiés sur d'autres types de cellules (Bawin et al., 1978; Emilia et al., 1985; Blackman et al., 1985a et b; Conti et al., 1985a; 1985b; Liboff et al., 1987).

Bien que le mécanisme responsable des effets modulateurs des champs magnétiques reste encore incompris, les propriétés d'activation et de prolifération des lymphocytes ont permis les observations intéressantes pour la mise en évidence d'effets qui sont maintenant reproductibles et reconnus par les chercheurs travaillant sur le sujet.

Nous nous sommes intéressés, dans le cadre de ce mémoire, aux lymphocytes de rongeurs activés par un mitogène, la concanavaline A (ConA), et à leur prolifération sous exposition à des champs magnétiques pulsés.

L'action de la ConA est différente selon qu'il s'agit des lymphocytes T ou des lymphocytes B. En effet, ce mitogène peut faire entrer certaines cellules dans des processus d'activation et aboutir à une mitogenèse, comme c'est le cas pour les lymphocytes T. En revanche, pour les lymphocytes B, la ConA n'est pas mitogénique bien qu'elle entraîne ces cellules dans des processus d'activation; elle conduit les lymphocytes B dans un état transitoire entre l'état de repos (G_0) et la première étape d'activation (G_1) avec une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire équivalente en intensité à celle des lymphocytes T.

Nous avons étudié plus particulièrement une des étapes précoces de l'activation dans la phase G_{1a} , l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire.

L'intérêt que nous portons sur cette étape s'explique par le fait que les processus cellulaires mis en route à ces moments semblent être particulièrement sensibles à l'action des champs électromagnétiques.

II-2) Activation des cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules du système immunitaire qui confèrent à l'hôte une résistance spontanée contre les tumeurs (Haller et al. 1977).

L'activité anti-tumorale *in vivo* des cellules NK pourrait présenter une forme d'immuno-surveillance archaïque précédant l'apparition des lymphocytes cytotoxiques T spécifiques, elle pourrait également éliminer les cellules anormales de l'organisme. Il est évident que l'activité anti-tumorale n'est pas leur seule fonction. Les cellules NK montrent une hétérogénéité fonctionnelle dépendante de leur localisation et de l'environnement.

La propriété de cytotoxicité Natural Killer (NK) se trouve chez certains lymphocytes, non T non B, capables de détruire *in vitro* certaines lignées tumorales. Ces cellules sont capables de lyser spontanément des cellules tumorales sans reconnaissance spécifique d'antigènes particuliers avec les complexes majeurs d'histocompatibilités.

Il y a encore peu d'informations disponibles, concernant les structures des cibles, lors de l'oncogénèse sur les molécules et processus impliqués dans la reconnaissance des cellules NK, ainsi que dans les signaux trans-membranaires.

Les événements dans les cellules NK, lors d'interactions avec les cellules cibles, entraînent une élévation du niveau d'inositol phosphate (Windebank et al. 1988) qui est accompagné par une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium libre (Atkinson et al. 1989).

Le niveau d'activité des cellules NK peut varier entre les individus et les différentes lignées de souris, car il est génétiquement contrôlé (Windhurst et Padgett 1973). Cette activité est soumise à de nombreuses influences : elle dépend de l'âge (Krihnaraj, Blandford 1988), du sexe (Tilden et al., 1986), du rythme circadien et circannuel, du régime alimentaire (Pati et al., 1987) et de l'exposition au stress (Pollock 1987). Ces variations de l'activité des cellules NK, observées en fonction d'influences extérieures, se traduisent par des niveaux d'activité et de mobilisation calciques différents qui offrent des possibilités de modulation par les champs, sur lesquelles nous avons travaillé.

Différents auteurs ont étudié les effets des champs électromagnétiques sur l'activité de cellules NK après une exposition des animaux (Malter et al, 1987; Mc Lean et al, 1991; tremblay et al, 1993).

II-3) Prolifération des cellules tumorales

Les cellules tumorales sont caractérisées par le fait qu'elles ne répondent plus aux règles de l'homéostasie qui imposent l'arrêt de la prolifération.

Les mécanismes de régulation de la prolifération encore peu connus au niveau moléculaire peuvent s'accomplir, semble-t-il, de diverses façons selon les facteurs et récepteurs considérés. Dans des conditions physiologiques normales, des fonctions métaboliques inhibitrices permettent de verrouiller de façon efficace le système de stimulation cellulaire. La levée permanente de ces inhibiteurs favorise le développement incontrôlé de la prolifération et peut conduire à la croissance de tumeurs.

L'expression de gènes particuliers permet aux cellules normales de rentrer dans différentes phases du cycle cellulaire. Dans le cas des cellules tumorales, cette expression est modifiée, les cellules ne possèdent plus les signaux permettant les arrêts du cycle et donc le passage en G0. Cette perturbation de la régulation cellulaire entraîne des augmentations de calcium qui peuvent induire à une mort programmée : l'apoptose (Trump et al 1992).

Des effets de champs magnétiques sur la prolifération de cellules tumorales ont été observés depuis longtemps.

Certains travaux montrent un ralentissement du développement de tumeurs après exposition aux champs (Cros, 1964; Batkin et al., 1977; Omote et al., 1990). Il semble que les modèles les plus sensibles aux champs soient ceux qui sont le plus antigéniques. Une observation supplémentaire qui met en cause la sensibilité aux champs des cellules du système immunitaire (Omote et al. 1990).

Nous avons choisi d'étudier la prolifération de cellules tumorales in vivo sous exposition à un champ magnétique (0,8 Hz, 100 mT).

Deux modèles de cancers expérimentaux très courants et très différents chez les rongeurs ont été choisis : un modèle de cancer chimio-induit par le benzopyrène et un modèle de tumeurs greffées, le mélanome B16. Ces deux modèles sont assez agressifs. La régression des tumeurs est exceptionnelle et les animaux meurent rapidement, dès que les cellules tumorales se développent.

- Les tumeurs chimio-induites sont un des premiers modèles de carcinogénèse chimique expérimentale. Ces modèles comportent toutes les étapes de la transformation maligne et donc ressemblent beaucoup au développement des cancers spontanés.

- L'autre type de tumeur, les tumeurs greffées, met en jeu des mécanismes très différents de ceux induits chimiquement. Le modèle du mélanome B16 est un modèle très utilisé et bien caractérisé. Après injection des mélanocytes, le développement des cellules tumorales est rapide. Nous avons pu l'utiliser pour faire varier certains paramètres physiques.

L'organisme, dans son entité, est-il indispensable pour observer des effets des champs ?

Pour le savoir, nous avons étudié l'effet du champ magnétique sur la prolifération de cellules tumorales en culture in vitro.

Le champ magnétique pulsé, dont nous avons étudié les effets sur la croissance des tumeurs et sur l'activité NK *in vivo*, pouvait-il avoir un effet sur la prolifération de différentes cellules en culture *in vitro* ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons observé l'effet sur la prolifération de deux lignées tumorales : les cellules HeLa et les mélanocytes B16.

II-4) Relation système immunitaire-cancer

Les cellules étrangères à l'organisme, portant à leur surface des antigènes étrangers ou des cellules devenues tumorales, peuvent être reconnues par les membranes des cellules du système immunitaire et éliminées.

Parmi les cellules du système immunitaire, il existe deux types de mécanismes vis à vis des cancers :

- l'immunité non spécifique (cf cellules NK II-2)
- l'immunité spécifique : certaines tumeurs portant des antigènes engendrent une réaction immunitaire spécifique qui se fait par une sous-population de lymphocytes : les lymphocytes cytotoxiques.

Lorsque la lutte du système immunitaire n'est pas assez efficace et conduit à l'évolution d'une tumeur, l'immunité subit des modifications. Les causes de la diminution des réponses immunes chez les hôtes porteurs de tumeurs sont encore inconnues. De nombreuses hypothèses sont suggérées :

- le travail de Broder et collaborateurs (1978) suggère que des sous-populations suppressives de lymphocytes pourraient être induites lors de tumeurs. Ces cellules suppressives ont été identifiées comme des cellules T porteuses $ly1+2^-$ qui pourraient induire une suppression quand il y a transfert à des souris non porteuses de tumeurs.
- Plus récemment Jenkins et collaborateurs (1987) proposent que l'altération majeure du système immunitaire serait due à une modification de la présentation des antigènes qui entraînerait une réponse erronée des lymphocytes T4.
- D'autres auteurs suggèrent le rôle suppresseur des macrophages (Watson et al. 1991).
- Mizoguchi et collaborateurs (1992) trouvent des anomalies chez des souris porteuses de tumeurs, non seulement dans la montée de calcium très réduite après stimulation des lymphocytes par l'anticorps antiCD3, mais aussi dans une diminution du taux des kinases (p56 et p59). Ils en déduisent que ces modifications seraient dues aux interactions de la tumeur avec l'animal hôte.
- D'autres auteurs étudient les lymphocytes CD8⁺ chez les souris porteuses de tumeurs (Loeffler et al., 1992). Dans ce cas, les fonctions lytiques de ces lymphocytes CD8⁺ sont affaiblies, alors que tout est normal pour les lymphocytes CD4⁺. Ces auteurs suggèrent que la tumeur elle-même produirait un facteur diminuant le potentiel cytotoxique des cellules CD8⁺.

Avant de présenter le plan des résultats nous voudrions souligner une différence fondamentale dans les conséquences d'une augmentation de calcium intracellulaire entre les cellules tumorales et les cellules lymphocytaires.

Les cellules tumorales modifiées dans leur régulation répondent à l'augmentation de calcium intracellulaire de façon opposée aux lymphocytes. Dans les processus tumoraux l'augmentation de calcium intracellulaire entraîne une destruction des cellules alors que pour les lymphocytes cette augmentation entraîne des processus d'activation. Ces réponses opposées vis à vis du calcium amplifient l'intérêt que nous avons porté à ces deux mécanismes cellulaires dans l'étude des effets des champs magnétiques.

Plan des résultats

Dans l'exposé de nos travaux, la présentation des résultats suit une démarche inverse de celle du plan de l'introduction. Partant de l'étude *in vivo* puis *in vitro* de modèles de prolifération tumorale, nous nous sommes orientés vers des modèles du système immunitaire pour ensuite continuer avec l'étude du calcium lors de l'activation des lymphocytes.

La description des champs est faite dans le chapitre matériels et méthodes.

La discussion intégrée aux résultats est présentée dans l'ordre suivant :

- étude des effets des champs magnétiques (120 mT) *in vivo* :
 - * sur la croissance de tumeurs et le temps de survie des animaux
 - * sur l'activité des cellules Natural Killer.
- étude des effets des champs magnétiques sur la prolifération de cellules en culture *in vitro* avec deux intensités différentes du champ magnétique :
 - * intenses (180 mT) sur la prolifération des cellules tumorales en culture et des lymphocytes,
 - * faibles (5 mT) sur l'activation, la prolifération des lymphocytes ainsi que sur leur réponse calcique.

CHAPITRE 1

A) Matériels et Méthodes

A-1) Définitions

La présence d'une charge, appelée charge source, ou de plusieurs charges en un point de l'espace environnant modifie la propriété de l'espace, cette propriété s'appelle le champ électrique E. Si dans cet espace, on dispose une charge témoin q_t , la force $q_t E$ qu'elle subit révèle l'existence de E.

De la même façon, la présence d'une charge ou de plusieurs charges en mouvement en un point de l'espace qui créent un courant, appelé courant inducteur, modifie la propriété de l'espace environnant et cette propriété s'appelle le champ magnétique. Si dans cet espace, on dispose un courant témoin i_t dans une direction dl , la force F qu'il subit révèle l'existence de B, elle est donnée par l'expression suivante : $F = i_t dl \times B$ (loi de Lorentz).

Lorsque les variations des champs sources ou courants inducteurs ne sont pas trop rapides, les champs E et B sont dissociables. Quand on monte en fréquence ($> 1\text{MHz}$), l'existence du champ électrique est liée à l'existence du champ magnétique et inversement, les deux champs sont indissociables, c'est ce que l'on appelle le champ électromagnétique (équations de Maxwell).

Dans nos expériences, nous avons utilisé des courants de basses fréquences (0,8 Hz), donc le champ électrique E est très faible; il est proportionnel à la vitesse de variation de B, dB/dt (temps de montée).

Les champs à basses fréquences sont des champs magnétiques ou électriques variables sans radiations, car l'énergie n'est pas associée à la partie rayonnante qui dans ce cas est négligeable.

A-2) Equipement physique

A-2-1) Champs magnétiques intenses

Un courant I qui circule dans une bobine induit à l'intérieur et à l'extérieur un champ magnétique proportionnel à I . Notre appareillage est constitué de deux bobines (de résistance de 2,7 ohms) en position de Helmholtz, c'est à dire placées à une distance égale à leur rayon. Elles produisent entre elles un champ magnétique uniforme, c'est à dire qu'à un instant donné, l'intensité et la direction du champ sont les mêmes en tout point. Au niveau des faces externes des bobines, le champ est convergent ou divergent.

Les bobines sont constituées d'une centaine de tours de spires en cuivre et refroidies par circulation d'eau. Elles sont alimentées en parallèle par un générateur de tension continue qui est commandé par un générateur pilote de tensions carrés. La valeur maximale du courant, de 160 A, permet d'atteindre le champ magnétique de 180 mT au plateau.

Shéma de l'appareillage magnétique : figure 1

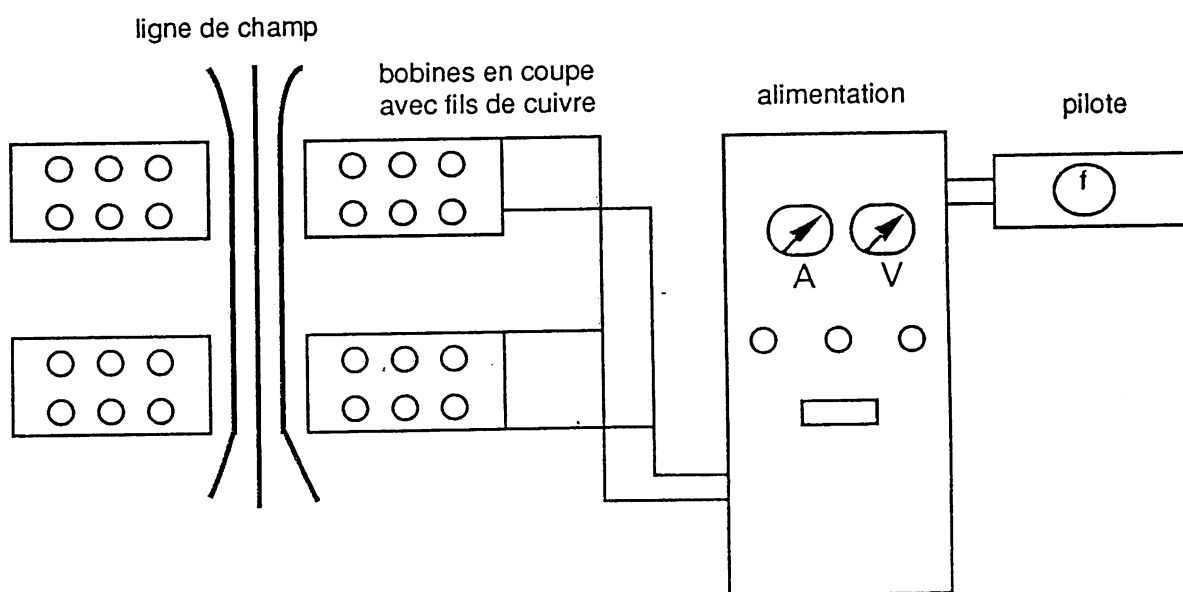


figure 1

La valeur du champ est mesurée à l'aide d'un gaussmètre (FW Bell-4048) fonctionnant avec une sonde que l'on positionne au point où l'on veut mesurer le champ magnétique B .

Dans le temps, B peut être constant ou variable. Quand il s'agit d'un champ magnétique pulsé, la forme des impulsions est directement proportionnelle à celle des impulsions de courant dans le circuit d'alimentation des bobines. L'impulsion est constituée d'une phase de montée, d'un plateau et d'une phase de descente : figure 2

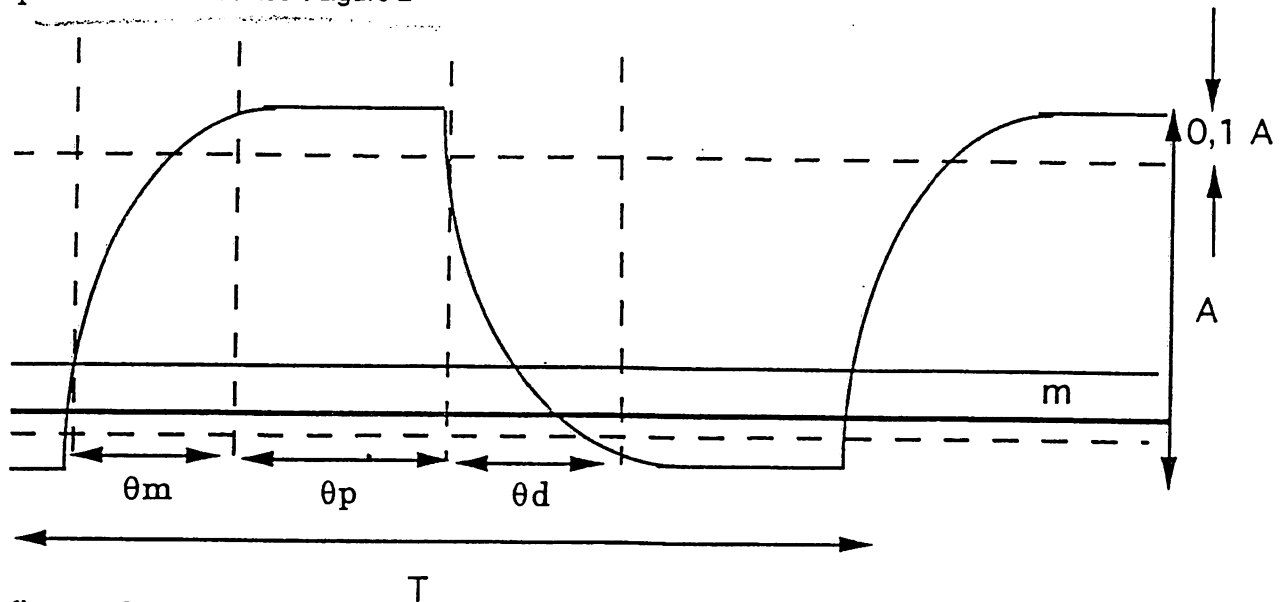


figure 2

La description d'une impulsion de champ magnétique fait appel à plusieurs paramètres :

- l'amplitude A et la valeur moyenne m . Elles sont limitées par le courant maximum fourni par l'alimentation et par l'échauffement des bobines par effet Joule;
- les intervalles de temps que sont le temps de montée θ_m , la durée du plateau θ_p , le temps de descente θ_d et la période T . Théoriquement ces intervalles sont comptés à partir de points dont les amplitudes sont situées à $0,1A$ du niveau bas ou du niveau haut des impulsions.
- Les vitesses de variations pendant θ_m et θ_p qui seront notées dB/dt et qui sont à peu près égales à $0,8A/\theta_m$ ou $0,8A/\theta_p$.

Dans nos expériences,

$T = 1,2\text{s}$, ce qui correspond à une fréquence de $0,8 \text{ Hz}$;

$\theta_m = \theta_d = 0,2\text{s}$ et $\theta_p = 0,4\text{s}$;

$m = A/2$ avec donc un B toujours > 0 .

Dans le cas des champs moyens les plus intenses ($120\text{-}180 \text{ mT}$), elles sont de 1 T/s , mais avec des champs de 5 mT , elles sont de 100 T/s . Ces valeurs conditionneront les courants induits dans les tissus biologiques.

A-2-3) Champs magnétique faibles (5 mT)

Le champ magnétique est créé par des petites bobines immergées dans un bain circulant thermostaté à 37°C. Les bobines sont fabriquées suivant un double bobinage et raccordées à 4 bornes. Si le courant va dans le même sens de rotation, les bobines créent un champ magnétique qui sera uniforme à leur centre. Par contre, si les 2 bobines sont parcourues par des courants de sens inversés, elles créent alors des champs antagonistes dont la résultante est nulle : ceci sera la bobine témoin pour les cellules "sham exposées" (exposition fictive). Ce véritable témoin a l'avantage d'avoir dans les deux cas la même résistance. Ainsi, s'il y a une élévation de la température, elle sera la même pour les cellules exposées et pour les cellules sham-exposées.

Le bobinage étant beaucoup plus long que large, on admet qu'au centre le champ magnétique sera uniforme.

Le système est plongé dans un bain à 37°C circulant, la figure 3 schématise le montage.

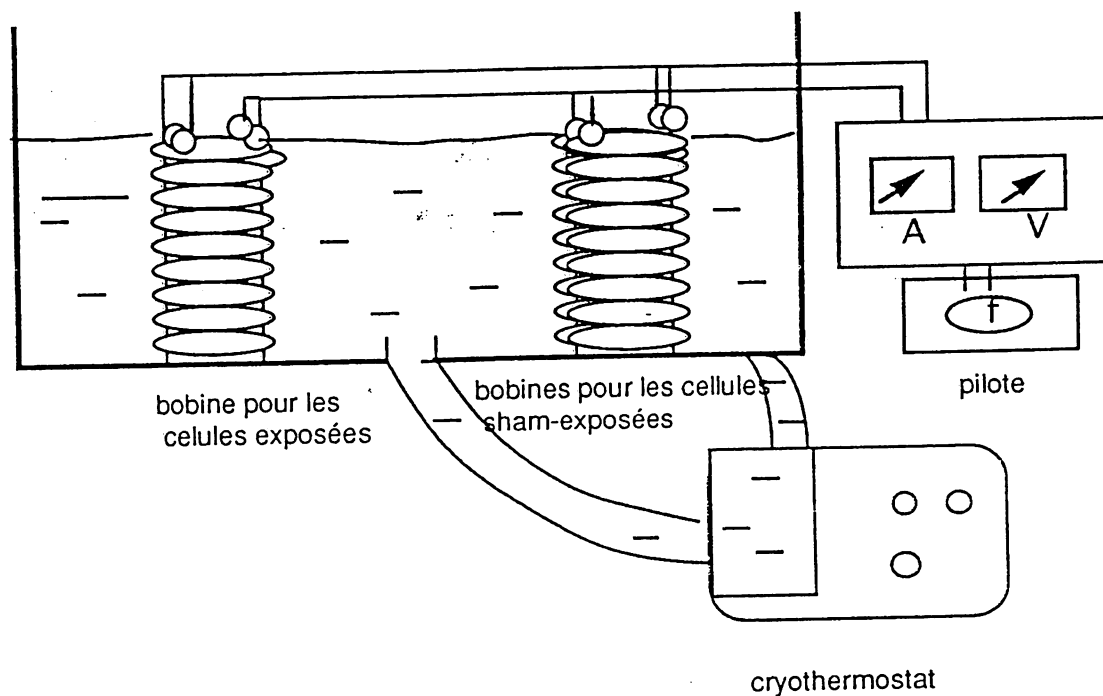


figure 3

A-2-4) Champs électriques

Bien que le champ électrique induit par le champ magnétique de 180 mT soit très faible, son effet a été étudié sur la prolifération des cellules HeLa dans le cadre d'une collaboration avec des collègues américains à Richmond. Avec des électrodes nous avons simulé le champ électrique induit par le champ magnétique; la densité de courant estimée était de l'ordre de $0,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ et l'allure est représentée dans la figure suivante :

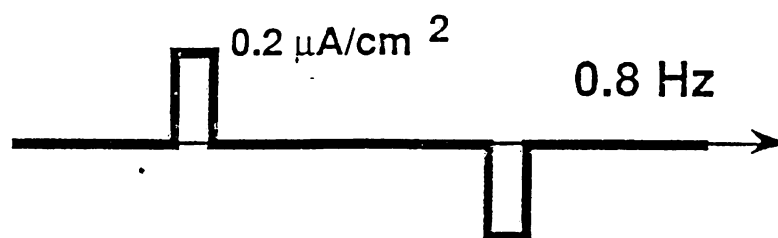


figure 4

Après avoir porté la fréquence à 5 Hz, le champ prend alors la forme suivante figure 5 :

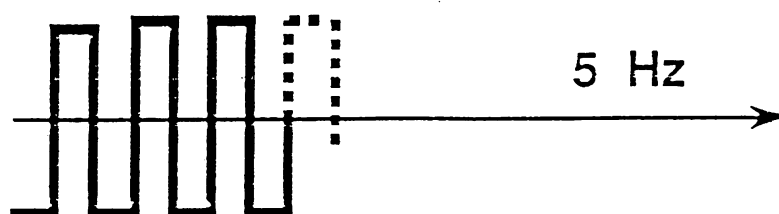


figure 5

Un champ de même type que celui émis par les lignes de transport, soit un champ électrique sinusoïdal de 60 Hz, a été testé dans ce laboratoire américain pour l'étude de la prolifération de cellules HeLa : figure 6

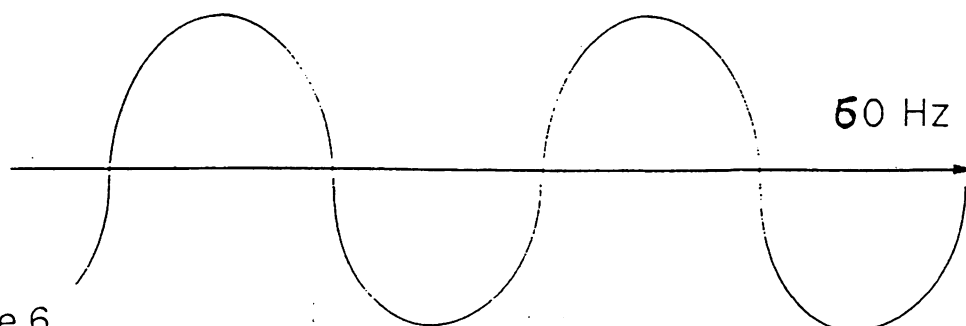


figure 6

A-3) Description de la régulation de température

A-3-1) Lors des expositions *in vivo* (120 mT)

Nous avons exposé les animaux dès la détection des tumeurs, et ce jusqu'à leur mort, pendant 8 heures par jour (sauf exception comme dans le cas des BALB/c). Les animaux sont confinés dans des boîtes en Plexiglas cylindriques qui mesurent 16 cm de diamètre, 8 cm de haut et sont divisées en deux par une cloison médiane (voir figure 9). En général, les souris se regroupent contre la cloison pour dormir dans la journée. Ces boîtes sont placées entre les bobines de Helmholtz, avec des trous d'aération percés sur la paroi extérieure afin de permettre les échanges thermiques. La pièce est maintenue à une température constante de 25 °C, température choisie pour le confort des animaux. Les bobines sont refroidies par circulation d'eau. Les animaux témoins sont dans une cage identique, dans la même pièce, mais éloignés du champ. La nuit, les souris témoins et exposées sont mises ensemble dans une grande cage, avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum*.

Dans le cas des expériences sur l'activité des cellules Natural Killer, les souris sont exposées 10 heures/jour pendant 5 jours.

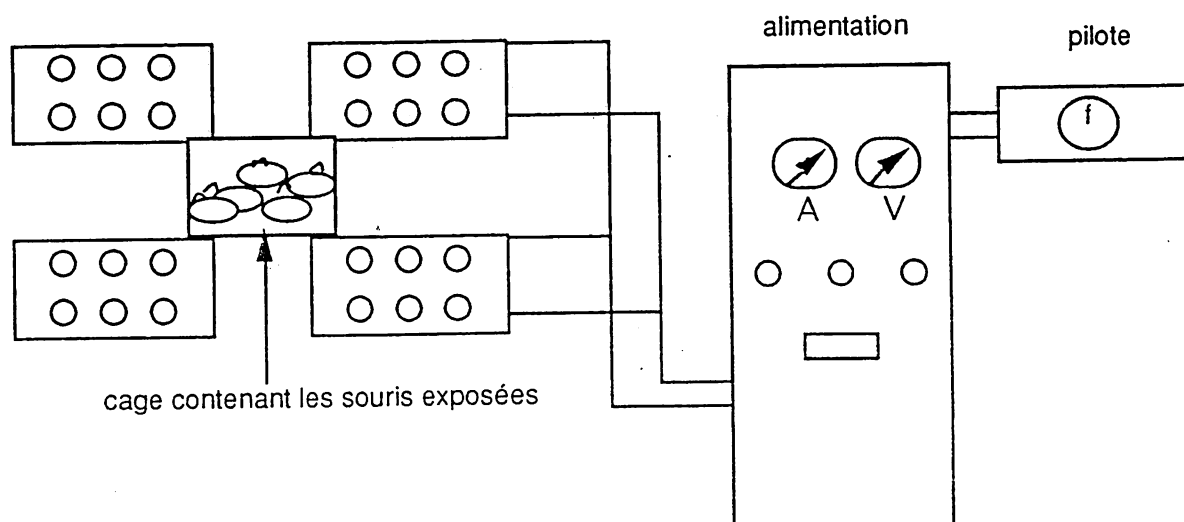


figure 7 : Montage lors des expositions *in vivo* à 120 mT, les animaux se trouvent au centre des bobines, dans un champ magnétique uniforme.

A-3-2) Lors des expositions *in vitro* de champs magnétiques forts (180 mT)

L'exposition des cellules en culture nécessite une température suffisamment élevée et stable pour ne pas perturber leur prolifération. D'autre part, il est nécessaire d'avoir une ambiance parfaitement stérile, en présence de CO₂. L'idéal eût été de réaliser des expositions à l'intérieur des incubateurs, mais l'inclusion d'un dispositif d'exposition était impossible. Nous avons donc réalisé un minincubateur que nous avons inclus dans les bobines de Helmholtz. Il est constitué d'une boîte à double paroi, entre lesquelles circule de l'air et plus tard de l'eau dont la température est régulée par des cryothermostats HUBER. Dans le dispositif, il est possible de glisser une boîte hermétique stérile ; à l'intérieur, on recrée une atmosphère à 5% de CO₂ grâce à des pastilles de Gaspack (Biomérieux).

Figure 8 :

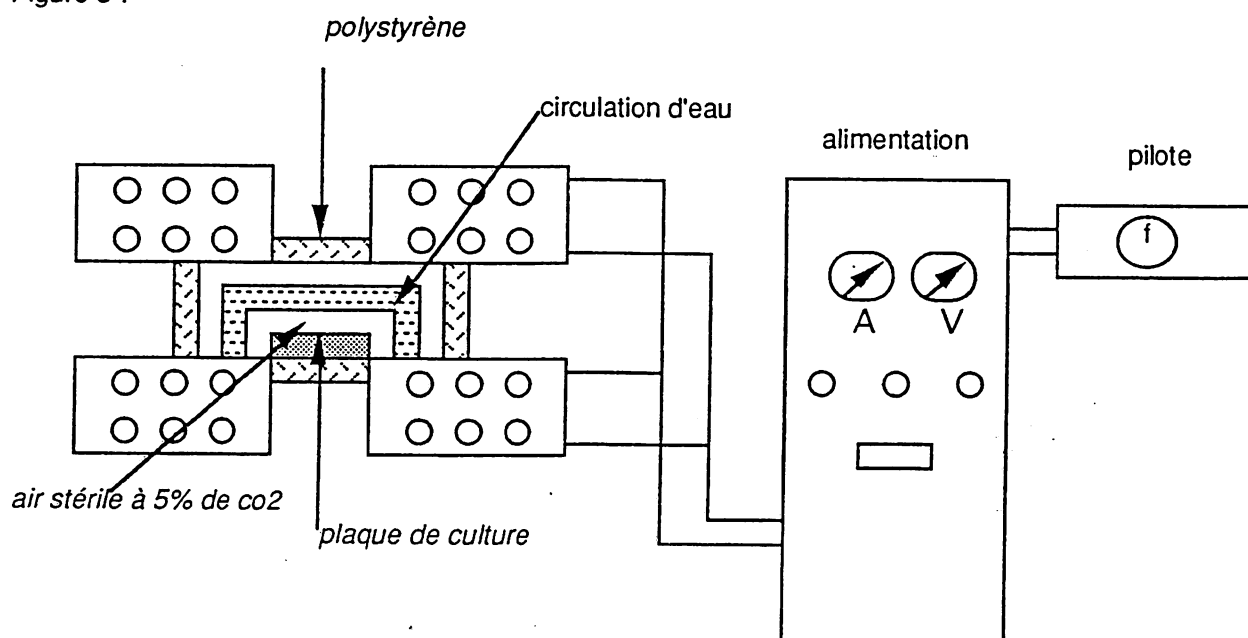


figure 8 : Montage lors des expositions *in vitro* à 180 mT, les plaques de cultures se trouvent au centre des bobines, dans un champ magnétique uniforme.

A-3-3) Lors des expositions *in vitro* de champs magnétiques faibles (5mT)

Les bobines sont plongées dans un bain circulant qui permet de maintenir les cellules à 37°C. La température est rigoureusement la même pour les cellules exposées et les cellules sham-exposées (voir figure 3, A-2-3). Les cellules sont à 37°C tout au long de l'expérience, y compris pendant l'acquisition au cytomètre en flux.

A-4) Matériels biologiques

A-4-1) les animaux

Les animaux proviennent de IFFA CREDO, en général, au moins une semaine avant l'expérience afin qu'ils récupèrent du voyage et qu'ils s'habituent à leur nouvel environnement.

Les rates sont des Sprague Dawley. Les souris mâles BALB/c, C3H, C57Bl/6 sont commandées à l'âge de 6 semaines.

A-4-2) Les lignées tumorales

Les cellules HeLa nous ont été procurées par le Dr Portail de la fondation Bergonié à Bordeaux. Il s'agit de sous-cultures de la culture ATCC CCL (American type culture collection certified cell lines) 2.2 HeLa S3. Cette lignée a été clonée en 1955 par Puck et al 1956 à partir de la lignée initiale provenant d'une tumeur utérine prélevée chez Helen Larsen, d'où son nom. La morphologie de ces cellules est établie comme étant de type épithéliale.

Pour l'autre lignée étudiée, le Mélanome B16, les cellules sont prélevées de tumeurs portées par les C57bl/6 et remises en culture *in vitro* dans du milieu complet. Le nombre de passage pour ces cellules est entre 2 et 4 au maximum.

A-4-3) Les milieux de culture

Les cellules sont maintenues dans un milieu standard RPMI-1640 ou milieu CO2 indépendant, contenant 5% de sérum de veau foetal inactivé et testé, 2mM de glutamine, 1% d'hepès, 1% d'antibiotique pénicilline-streptomycine et 0,05 mM de 2 mercaptoethanol (GIBCO). Tous ces éléments sont stériles.

A-5) Méthodes et Techniques

A-5-1) Expositions *in vivo*

A-5-1-1) Conditions expérimentales d'induction des tumeurs chimio-induites - Des rates Sprague-Dawley femelles âgées de 57 jours ont été anesthésiées avec 500µl de chloralhydrate (12%), injectées en sous-cutanée dans la cuisse droite avec 500µl d'une solution de benzopyrène dans de l'huile de sésame (à une concentration de 4mg/ml).

Les animaux provenant du centre d'élevage CERJ ont été envoyés au laboratoire 18 jours avant la date d'injection du carcinogène afin de s'habituer aux conditions de vie de l'animalerie. Les animaux ont été répartis à raison de 10 par cage et reçoivent nourriture et boisson *ad libitum*.

La dose de benzopyrène injectée est de 2 mg par rate; pour les expériences avec les BALB/c et C3H, la dose est divisée par 10, soit 0,2 mg par souris; nous sommes revenus ensuite à la dose initiale avec les souris C57Bl/6.

A-5-1-2) Tumeurs greffées- Le modèle du mélanome B16 - La lignée nous a été fournie par le laboratoire de L. Mir; nous avons également pu profiter de son expérience pour la mise en route de ce modèle. Les mélanocytes ont toujours été conservés *in vivo*. Les cellules sont récupérées quand la tumeur mesure environ 1 cm de diamètre. Les cellules sont alors resuspendues dans du tampon phosphate à l'aide d'aspiration répétée dans une seringue, puis filtrées à travers une membrane laissant passer uniquement les cellules individuelles afin d'éliminer les agrégats. Les cellules sont ensuite comptées et resuspendues dans du tampon à la dilution de 10^6 cellules/ml; 0,2 ml sont injectés par souris.

A-5-1-3) Croissance de tumeurs - Dès la détection des tumeur, les animaux exposés ou témoins sont palpés tous les 3 jours afin de mesurer la tumeur. A l'aide d'un pied à coulisse, la longueur (L) ainsi que la largeur (l) sont notées et le volume est calculé suivant la formule : $L \times l^2 / 2$. Chaque souris est identifiée par les oreilles qui sont fendues ou coupées au moment de la séparation par groupe. Ainsi pour chaque souris, on suit à la fois l'évolution du volume des tumeurs et le temps de survie.

A-5-1-4) Mesure de l'activité Natural Killer- la mesure de l'activité Natural Killer quantifie la capacité des cellules à reconnaître et à lyser "*in vitro*" des cellules cibles sans immunisation préalable. Le test de cytotoxicité utilise le ^{51}Cr libéré par les cellules cibles.

Différents types de cellules tumorales cultivés *in vitro* constituent de bonnes cibles pour le test de cytotoxicité; les lignées les plus utilisées étant les cellules YAC-1 qui proviennent d'un lymphome induit par le virus de Moloney chez la souris A/Sn, (Cikes et al 1973).

Les cellules effectrices - Après 5 jours d'exposition au champ magnétique, les souris sont sacrifiées au 6^{ème} jour par dislocation cervicale et leur rate prélevée. La suspension de cellules splénique est obtenue après perfusion de la rate. Les cellules sont ensuite lysées et lavées. Après la dernière centrifugation, les cellules sont comptées et ramenées à 2×10^7 cellules/ml dans du RPMI complet.

Les cellules cibles - Les cellules cibles (YAC-1) sont mises en suspension 3 à 5×10^6 cellules/ml et incubées avec 200 μ l de ^{51}Cr (chromate de sodium: 2 mCi/ml) pendant 1 heure à 37°C (incubateur à 6% de CO_2 et 94% d'air humidifié à 95-98% sous agitation).

Le Test de cytotoxicité - Dans des plaques de microtitration à 96 puits à fond rond (Nunc), on dépose 100 μ l de cellules cibles (YAC) marquées au chrome et 100 μ l de cellules effectrices (cellules spléniques).

Quatre valeurs de rapport (cellules cibles/cellules effectrices) sont utilisées et chaque point est fait en trois exemplaires:

- 2×10^7 cellules/ml, ce qui correspond à un rapport C/E=1/100
- 10^7 cellules/ml pour un rapport de 1/50
- 5×10^6 cellules/ml pour un rapport de 1/25
- $2,5 \times 10^6$ cellules/ml pour un rapport de 1/12,5

Les puits témoins de la libération spontanée du chrome contiennent 100 μ l de cellules cibles et 100 μ l de RPMI 1640 complet. Les puits témoins de la libération maximale ^{51}Cr contiennent 100 μ l de cellules cibles et 100 μ l d'acide chlorhydrique 2N ou de dodécyl sulfate de sodium SDS à 1%.

Les plaques sont mises à 37°C dans un incubateur humide pendant 4 à 5 heures.

Analyse - Après incubation, les surnageants sont prélevés dans chaque puits et placés dans des tubes de comptage. La moyenne des 3 valeurs correspondant à des conditions identiques est calculée. Le pourcentage de lyse est calculé suivant la formule :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \frac{\text{CPM test} - \text{CPM mini}}{\text{CPM maxi} - \text{CPM mini}}$$

A-5-2) Expositions *in vitro*

A-5-2-1) Test colorimétrique MTT - Il existe de nombreux tests pour mesurer la prolifération et l'activation des cellules. Mosmann en 1983 a mis au point un test basé sur la capacité des enzymes mitochondriales des cellules viables à transformer le MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) en formazan (cristal bleu). Ce test permet d'analyser facilement et rapidement un grand nombre d'échantillons; il a l'avantage de pouvoir quantifier indépendamment, dans certaines conditions, l'activation et la prolifération des cellules (D. Gerlier et N. Thomasset 1986).

La solution stock de MTT est préparée par dissolution de 5mg/ml de MTT dans du tampon phosphate, puis la solution est filtrée (filtre 0,22 μ m) et stockée dans le noir, à 4°C. Au temps choisi, la solution de MTT est ajoutée au 1/10^{ème} du volume (10 μ l pour 100 μ l de milieu, pour les lymphocytes) pendant une ou plusieurs heures suivant les cellules, à 37°C, puis le même volume de 10% de SDS-0,01 N HCl est ajouté à chaque puits pour arrêter la réaction et dissoudre les cristaux (100 μ l de solution SDS dans le cas des lymphocytes); il faut attendre au moins une nuit à 37°C pour avoir une bonne dissolution (H. Tada et al 1986). L'absorbance à 570 nm est mesurée par spectrophotométrie, la longueur d'onde de référence étant 630 nm.

A-5-2-2) Prolifération des lignées tumorales - Les cellules HeLa ont été choisies car elles présentent les avantages suivants :

- elles sont bien caractérisées et utilisées pour de nombreux tests biochimiques,
- elles se multiplient rapidement, leur concentration doublant toutes les 16 heures,
- elles ne sont pas fragiles;

Etant adhérentes, les cellules HeLa sont remises en suspension par incubation avec 5 ml de trypsine 5% EDTA 2% (GIBCO). Ce passage est effectué 4 heures avant l'expérience afin qu'elles aient le temps de retrouver leur adhérence au moment de l'exposition. Les cellules sont diluées à 10⁵ cellules/ml. Les conditions sont choisies pour avoir une bonne prolifération sans être gêné ni par la confluence ni par l'appauvrissement du milieu.

Les mélanocytes B16 sont utilisés suivant le même protocole que les cellules HeLa.

A-5-2-3) Prolifération des lymphocytes spléniques - L a prolifération de lymphocytes est étudiée sur une population hétérogène : cellules provenant de la rate (lymphocytes spléniques) des souris ou rats (dont 90% sont en phase de repos G0). C'est un organe intéressant puisqu'il comporte une quantité très importante de différentes sous-populations de lymphocytes.

Les cellules sont prélevées sur des souris C57bl/6 mâles de 6 semaines environ (IFFA CREDO). Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les rates prélevées le plus stérilement possible, les rates sont lavées et les cellules détachées de la capsule splénique par perfusion à l'aide d'une seringue. Ainsi, nous obtenons une suspension cellulaire sans débris tissulaires. Les cellules sont lavées dans du milieu RPMI 1640. La lyse des globules rouges se fait par choc hypotonique: remise en suspension du culot dans 2 ml d'eau distillée stérile; quelques secondes après, on ajoute 10 ml de RPMI. Après 2 lavages, les lymphocytes sont comptés (cellule de Malassez) et resuspendus dans du milieu complet à la dilution de 2×10^6 cellules/ml. 50 μ l de cette solution sont déposés dans chacun des 96 puits des plaques de microtitration (NUNC), ainsi on aura 1×10^5 cellules par puits. On ajoute à ces 50 μ l la même quantité de milieu contenant ou pas des lectines.

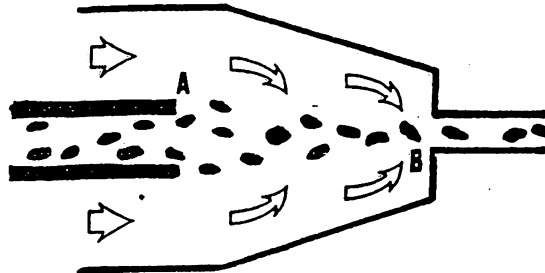
L'étude de la concentration de lectine - Ce sont des glycoprotéines polymériques d'origine animale ou végétale formant des liaisons non covalentes avec des résidus osidiques. Elles peuvent se fixer par pontage à des glycoprotéines sur des populations cellulaires différentes, mais seules certaines catégories de cellules vont être activées.

Nous avons choisi la Con A ou concanavalin A lectine du haricot qui active et fait proliférer les lymphocytes T. Cette lectine est un polyvalent tetramérique formé de 4 sous-unités stabilisées par des ions Ca^{2+} et Mn^{2+} . La con A peut se fixer dans les proportions de 10^6 , 10^7 molécules/cellules.

Dans nos expériences, quatre concentrations de lectines ont été utilisées couramment : 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$. Certains puits sont conservés sans lectine afin de déterminer le bruit de fond sachant que les lymphocytes sans activateur ne prolifèrent pas.

A-5-2-4) La cytométrie en flux - Le cytomètre en flux fait une focalisation hydrodynamique des cellules dans un faisceau laser (Figure 10a). Les signaux lumineux émis sont recueillis sur des photomultiplicateurs qui les transforment en signaux électriques. L'échantillon préparé sous forme de suspension cellulaire peut être analysé et les paramètres qui identifient chaque cellule sont mesurés. Un système électronique effectue la mise en forme et la conversion de ces signaux qui sont repris par l'informatique afin d'être rendus interprétables par l'utilisateur (Figure 9 b).

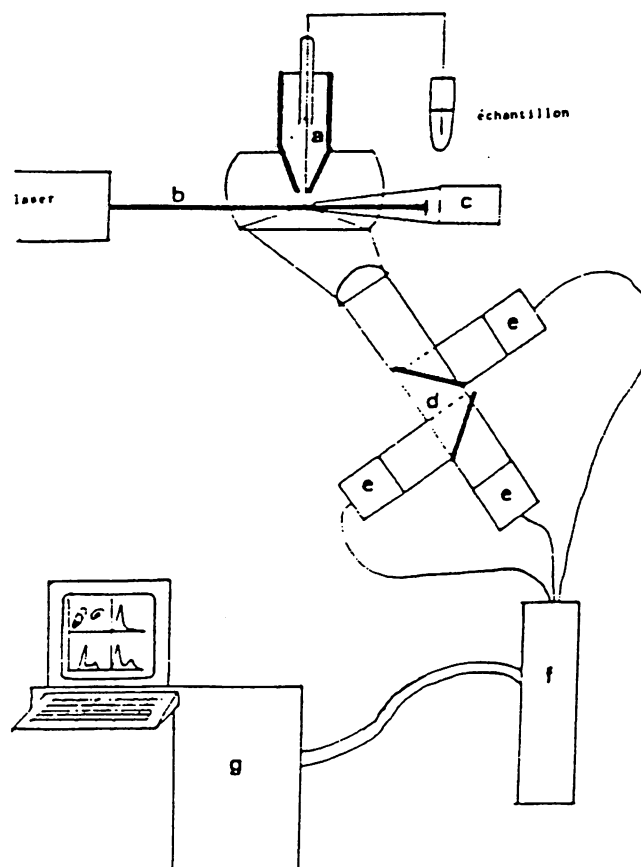
Figure 9 a : Représentation schématique de la focalisation hydrodynamique



Le flux de liquide accélère les cellules à la sortie de A et les oblige à passer une par une par l'orifice B.

Figure 9 b : Représentation schématique d'un cytomètre en flux (Belloc 1991)

- a : buse de centrage hydrodynamique;
- b : faisceau laser;
- c : photodiode de diffusion dans l'axe;
- d : filtres séparateurs;
- e : photomultiplicateurs;
- f : convertisseur analogique-digital;
- g : unité informatique.



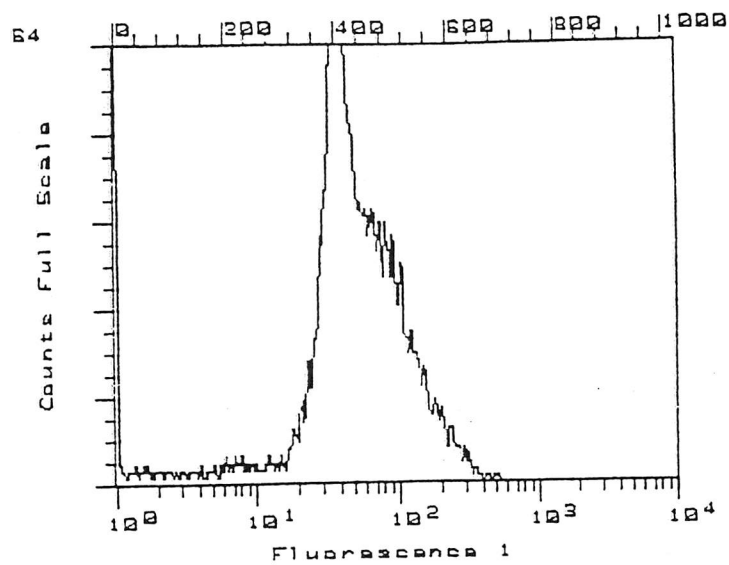


figure 10 : Histogramme de distribution de la fluorescence du Fluo-3 conditionné sur la population des lymphocytes

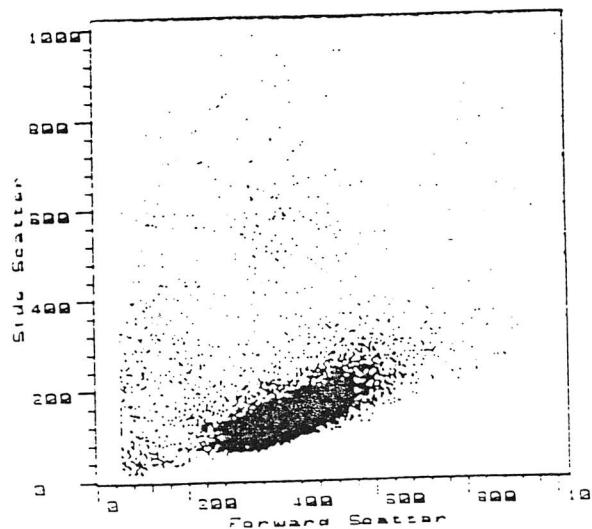


figure 11 : Histogramme biparamétrique des lymphocytes spléniques

Les mesures effectuées, cellule par cellule, permettent une représentation des résultats sous forme d'histogramme de distribution de fréquence dont l'abscisse (étalonnée de 0 à 255) représente l'amplitude du paramètre étudié (en canaux) et dont l'ordonnée représente le nombre d'évènements (cellules) par canal (voir figure 10). Chaque fois qu'une cellule émet un signal lumineux celui-ci est transformé, digitalisé et incrémenté dans le canal qui lui correspond, le logiciel LYSYS I facilite l'interprétation des données et à partir de modèles mathématiques permet l'interprétation des signaux physiques en termes de propriétés biologiques.

La cytométrie en flux (FACscan, Becton Dickson) permet de mesurer simultanément cinq paramètres. Des renseignements précis peuvent être enregistrés pour un grand nombre de cellules en un minimum de temps : taille relative des cellules, granularité relative, et intensité de trois couleurs de fluorescence. La quantité de lumière diffractée par les cellules ou la fluorescence qu'elles émettent sont quantifiées de façon objective (voir figure 11).

Les caractéristiques cellulaires qui contribuent à la diffraction de la lumière sont : la taille de la cellule, la membrane cellulaire, son noyau et toute granulation se trouvant à l'intérieur de la cellule. La structure de la surface membranaire rugueuse ou lisse et la forme de la cellule contribuent également à la diffraction globale de la lumière.

L'intensité de fluorescence est directement proportionnelle au nombre de sites de fixation existants.

Utilisation de la cytométrie en flux pour la mesure directe des variations du Ca^{2+} libre intracytoplasmique par le fluo-3. L'infime partie du calcium cellulaire total qui n'est ni enfermée dans des organites de stockage ni liée à des protéines cytoplasmiques, n'est possible que depuis quelques années grâce à la mesure du Ca^{2+} intracellulaire par fluorimétrie avec l'utilisation d'indicateurs fluorescents du calcium libre. Ces indicateurs, appelés sondes, ont été développés par Tsien 1989; ces sondes sont des dérivés fluorescents de l'EGTA (chélateur du Ca^{2+}) et il en existe 4 principales : quin-2, indo-1, fura-2, fluo-3. Des outils très intéressants car :

- il est possible de les introduire dans les cellules sans dommage grâce aux radicaux acétoxyméthylester qui leur permettent de traverser les membranes. Les radicaux sont ensuite coupés par des estérases cellulaires.
- Ils peuvent être utilisés à des concentrations faibles sans interférer avec la régulation du Ca^{2+} ,

- les indicateurs fluorescents sont sensibles aux variations de Ca^{2+} en raison de la valeur de leur constante de dissociation assez élevée (de 300-400 nM). La constante de dissociation du fluo-3 est de 400 nM, ce qui permet de mesurer des variations de la concentration intracellulaire en calcium de 100 nM à 1 μM . La longueur d'onde d'excitation est de 488 nanomètres, permettant d'utiliser un laser à argon présent dans le cytomètre de flux et de travailler sur population cellulaire.

A-5-2-5) Mise au point du protocole - Les expériences sont effectuées toujours à la même heure : les animaux sont sacrifiés vers 9 heures le matin. L'âge ainsi que le poids sont choisis pour être le plus stable possible, soit un âge de 5 semaines et un poids compris entre 200-250 grammes. Après anesthésie à l'halothane pendant 5 minutes, les animaux sont tués par dislocation cervicale; puis la rate est prélevée et les cellules sont détachées de la poche par perfusion douce à l'aide d'une seringue dans du RPMI à 37°C. Après centrifugation des cellules, les globules rouges sont éliminés par un rapide choc osmotique. Après deux lavages les cellules sont resuspendues dans du milieu complet et mises à 37°C pendant 1 heure. Les cellules (10 ml à 10^6 cellules/ml) sont ensuite incubées avec le fluo-3 (5 μM) pendant 30 minutes à 37°C. Tous les milieux utilisés sont gardés à 37°C. Après un rapide lavage, les cellules sont reprises dans 1 ml (10^7 cellules/ml) et 450 μl sont déposées dans 4.5 ml de milieu contenant 5 $\mu\text{g/ml}$ de conA, ce tube 1 étant déjà dans le bain circulant à 37°C; donc pour le tube 1, le temps $t=0$ correspond à la mise en présence des cellules avec le mitogène. Puis, 1 minute plus tard, les autres 450 μl de cellules sont déposés dans le second tube contenant également la ConA (qui sera l'exposé ou le témoin, l'ordre changeant au cours des expériences), donc pour ce tube 2 le temps $t=0$ sera décalé d'une minute. Les 100 μl de cellules restantes ne sont pas activées et servent de ligne de base pour la concentration de calcium intracellulaire. Les cellules restent dans le bain circulant et sous exposition pendant toute la durée de l'expérience. Les tubes utilisés pour l'acquisition des cellules sont également conservés dans le bain. Un bûcher contenant de l'eau du bain à 37°C permettra de conserver le tube contenant l'échantillon à analyser à cette température pendant l'acquisition. Le protocole est mis au point pour que les cellules exposées ou témoins subissent exactement le même processus. Toutes les 2.5 minutes, un échantillon de 300 μl est prélevé après remise en suspension des cellules par pipetage et cette opération est répétée pendant 30 minutes.

A la fin des prélèvements, la température du milieu où se trouve les cellules restantes, soit 1.5 ml, est vérifiée pour les exposées et témoins.

Il a été possible, dans certaines expériences, d'avoir plusieurs conditions avec des cellules provenant d'un même animal. J'ai donc fait varier les paramètres physiques ou fait des expériences contrôles sur des cellules sœurs; dans ces cas, la réponse à la conA est identique ainsi que la ligne de base du fluo-3 avant activation.

A-6) Outils statistiques

Nous avons choisi le test non paramétrique U de Mann et Whitney, car le nombre de souris utilisées par lot est faible (notamment inférieur à 30); de plus, il arrive souvent que la distribution des valeurs n'obéisse pas à une loi normale, ce qui empêche l'utilisation d'un test paramétrique. Nous avons également utilisé le test de Wilcoxon qui est comparable.

CHAPITRE 2

B) Résultats et Discussion

B-1) Effets de champs magnétiques intenses pulsés (120 mT) *in vivo*

Les champs utilisés sont tous pulsés à la fréquence de 0,8 Hz. Cette fréquence est l'une des fréquences physiologiques basses que l'on retrouve au sein de certains organismes biologiques, par exemple au niveau du battement du cœur.

B-1-1) Etude de l'effet sur la croissance de tumeurs

B-1-1-1) Choix et description du modèle de tumeurs chimio-induits - La plupart des modèles expérimentaux de tumeurs nécessitent plusieurs injections de carcinogène (Becci et al., 1981), et souvent l'incidence de cancer est faible et ne peut être déterminée avant le sacrifice de l'animal, en dehors des cancers mammaires et de la peau (Moon and Mehta, 1990). Cependant les premières observations d'Huggins et al. (1961) ont montré que des tumeurs mammaires pouvaient être induites chez des rates Sprague-Dawley (SD) après administration d'une seule dose de carcinogène, en l'occurrence, le DMBA. En revanche, des rates de souche Wistar ne développaient jamais de tumeurs (Huggins et al., 1961). Le DMBA devait être administré aux rates SD âgées de 50 à 60 jours si l'on voulait obtenir l'apparition de tumeurs dans 100% des cas (Huggins et al., 1961 ; Dao, 1962; Kerdelhué and El Abed, 1979).

Un modèle expérimental de tumeurs chimio-induites, par une autre voie d'injection et un autre carcinogène, a été développé. Le choix s'est porté sur ce modèle de tumeurs chimio-induites chez la rate SD après injection en sous cutanée de benzopyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique hautement carcinogène.

Dans les conditions expérimentales définies pour ce modèle, injection sous cutanée de 2 mg de benzopyrène, les animaux traités ont développé dans 100% des cas des tumeurs au niveau du site d'injection (cuisse) environ 100 à 120 jours après l'administration du benzopyrène (Faiderbe et al., 1992).

Les analyses histologiques ont révélé qu'il s'agissait de sarcomes à cellules fusiformes présentant un haut grade de malignité (Analyses effectuées par le service d'Anatomo-Pathologique du Dr Trojani, Fondation Bergonié, Bordeaux). Dans ce modèle, on note une apparition précoce d'un taux sérique en autoanticorps anti-Phosphatidylinositol-like" qui devient significativement élevé par rapport aux contrôles dès 40 jours après injection du carcinogène et atteint un optimum bien avant le stade de détection clinique des tumeurs (100-120 jours)

I) Cancer chimio-induit chez les rates Sprague-Dawley

Notre étude s'est effectuée tout d'abord sur quelques rates Sprague-Dawley. Les tumeurs ont été induites par l'injection de benzopyrène, 100% des rates ont formé des tumeurs qui sont apparues entre 100 et 120 jours après l'injection, quand celle-ci a été faite à l'âge de 55-60 jours. Le temps de survie des animaux a été de 150 jours au maximum à partir de l'injection du benzopyrène, soit un temps de survie entre 20 et 30 jours à partir du moment où la tumeur est devenue décelable. Le développement des tumeurs a été assez lent au départ, avant de s'accélérer à partir d'un volume de 10 cm³ avec mort des animaux 8 jours plus tard. Ce sont nos collaborateurs du laboratoire de M. Geffard à l'université de Bordeaux II, qui ont fourni ces données et décrit la mise au point de ce modèle. Ils ont mis en évidence un signal anti-Phosphatidyl Inositol (PI), quantifiables par ELISA, (Faiderbe et al 1992) qui permet de suivre la progression du développement tumoral. Le taux d'auto-anticorps anti-phosphatidyl inositol augmente et atteint un plateau 60 jours après l'injection de benzopyrène, soit avant toute prolifération tumorale.

Toutes les expériences avec les rates ont été faites sous champ magnétique intense non uniforme, c'est à dire au dessus des bobines, là où le champ varie en chaque point de l'espace. Ce gradient spatial de champ, inhomogène, est moins facile à caractériser au niveau physique, mais des contraintes pratiques nous l'ont imposé, en raison de la taille des rates. Les animaux ont été exposés un maximum de temps compatible avec l'activité du laboratoire.

Exposition dès la détection de la tumeur - Rate N°1 : L'apparition de la tumeur, dans le cas de cette rate, s'est faite au 90ème jour post-injection. L'exposition a commencé dès la détection et jusqu'au 155ème jour.

Pendant toute cette période, il n'y a pas eu d'évolution de la tumeur, elle est restée de petite taille. La rate a été ensuite laissée au repos (elle n'a plus été confinée ni exposée). La tumeur est restée alors intacte pendant les 54 jours suivants, et c'est seulement après cette période qu'elle a commencé à se développer, soit le 209^{ème} jour, et cette fois de façon très rapide : la rate était morte le 227^{ème} jour. Le temps de survie a été de 137 jours après l'apparition de la tumeur avec une période d'exposition de 65 jours (la fermeture du laboratoire pendant l'été est la raison pour laquelle il y a eu arrêt de l'exposition). Il y a eu un effet, dans ce cas, qui a persisté malgré l'arrêt de l'exposition pendant une période aussi longue que le temps exposé.

Rate N°2 : Pour cette rate, l'apparition de la tumeur s'est située au 109^{ème} jour. Pendant l'exposition qui a suivi, le développement a été lent et la mort est survenue au 173^{ème} jour, soit 64 jours de survie alors que la rate était toujours exposée. On peut comparer cette durée à celle du temps de survie moyen des animaux témoins qui dans cette série est de 33 jours $\pm$ 7 sur 11 animaux. Les deux cas cités ci-dessus sont intéressants, car les durées de vie semblent très prolongées. Ces expériences isolées ne nous ont pas permis de prouver l'efficacité du champ magnétique utilisé elles nous ont seulement donné des pistes à explorer.

La comparaison entre la rate 1 et la rate 2 a montré que dans le premier cas le développement de la tumeur a commencé 19 jours avant la deuxième. La tumeur qui s'est développée le plus rapidement semble donc avoir été plus sensible au champ magnétique.

Exposition d'une rate présentant une tumeur de taille déjà conséquente- Rate N°3 : L'apparition de la tumeur a eu lieu au 115^{ème} jour, celle-ci s'est développée de façon analogue aux témoins, elle a atteint une taille de 25 cm³ en 10 jours. La rate portant la tumeur a été exposée le 125^{ème} jour, il n'y a pas eu alors de différence avec les rates témoins dans le cours du développement, car elle est morte au 140^{ème} jour, soit un temps de survie de 25 jours. Il semble cependant que la rate ait moins souffert, et elle est restée agile malgré la taille importante de sa tumeur.

Exposition couplée à une injection d'anti-idiotype anti anti benzopyrène - Rate N°4 : Un anticorps monoclonal anti-anti-benzopyrène conjugué a été développé. Il a été caractérisé comme étant image interne du benzopyrène conjugué (Chagnaud et al., 1993a). Cet anticorps est appelé anticorps AIB1.

A ce titre il a capacité à se fixer au récepteur au benzopyrène, la protéine 4S (Chagnaud, Thèse de l'Université de Bordeaux II). Des rates SD âgées de 50-60 jours ont été injectées en sous-cutanée au niveau de la cuisse avec des doses de 3 mg d'anticorps (équivalent à 6,6 µg de benzopyrène). Lorsque l'anticorps AIB1 est administré de manière bi-hebdomadaire, à partir de 73 jours après traitement au benzopyrène, c'est-à-dire à un moment où le signal anti-"Phosphatidylinositol-like" est optimum et où aucune tumeur n'est cliniquement décelable, il entraîne une chute de ce signal immunologique de 80%. On constate chez les animaux traités un retard dans l'apparition des tumeurs d'environ 30 jours, un ralentissement de la croissance tumorale et une augmentation significative du temps de survie ($p = 0,004$, log-rank test, Mantel-Cox; Chagnaud et al. 1993b).

L'exposition d'une rate au champ magnétique a été couplée à l'injection de l'anticorps AIB1 dès l'apparition de la tumeur, dans ce cas au 117^{ème} jour. La rate exposée est morte le 210^{ème} jour, soit un temps de survie de 93 jours à comparer avec le temps de survie de 69 ± 10 jours après l'apparition de la tumeur pour 5 animaux témoins. L'injection d'anti-idiotype (2 injections / semaines) anti-benzopyrène a donc ralenti le développement des tumeurs et a augmenté le temps de survie des rates, l'exposition au champ a amplifié l'effet dans ce cas.

Conclusion pour le modèle rate : voir Figure 12 - Les expositions à un champ magnétique intense ont ralenti le développement des tumeurs et ont augmenté le temps de survie des rates. Cet effet dépendrait de la période d'exposition, car si le développement de la tumeur est trop avancé l'exposition n'a plus d'effet. Lorsque l'on a exposé la rate, dès l'apparition de la tumeur, on a observé un ralentissement, et même dans un des cas une absence de développement. Ces effets ont semblé dépendants de la vitesse d'apparition de la tumeur, et je reviendrai sur cet aspect dans la discussion des modèles chimio-induits chez les rates et souris. L'addition aux champs d'un traitement anti-idiotype a semblé provoquer un effet encore plus important.

Nous avons utilisé ce modèle de rates uniquement à titre indicatif dans la mesure où, dans notre dispositif d'exposition, un seul animal pouvait être exposé à la fois. Au vu de ces résultats préliminaires intéressants, nous avons développé ce modèle de cancer chimio-induit chez la souris, car la petite taille de ces animaux permettait d'exposer un nombre satisfaisant pour une analyse statistique.

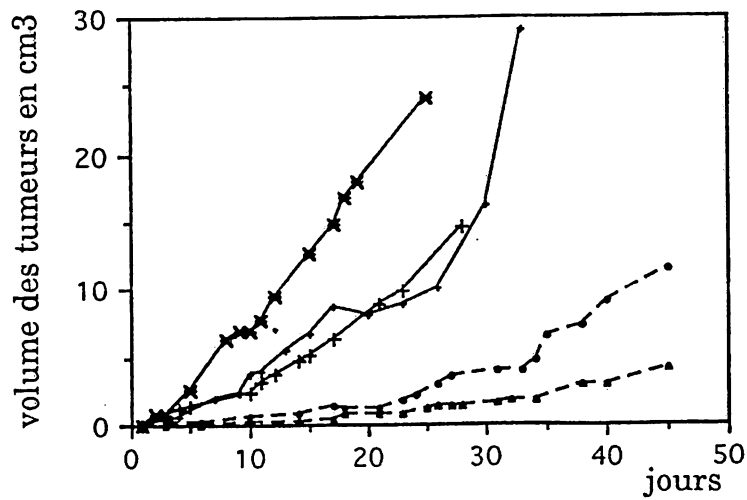


Figure 13a : Représentation linéaire du développement des tumeurs induites par le benzopyrène chez les souris BALB/c. J=0 correspond au jour de détection des tumeurs.
 Traits pleins : souris témoins, traits pointillés : souris exposées dès la détection des tumeurs.

II) Cancer chimio-induit chez la souris - Lors de la mise en route de ces expériences, le choix du sexe des souris s'est porté sur des mâles, dans la mesure où les expériences antérieures faites au laboratoire avaient été pratiquées sur des animaux de ce sexe. L'exposition des animaux s'est déroulée sous champ magnétique uniforme, champ homogène entre les deux bobines, dès que la tumeur a été palpable, et ce jusqu'à la mort des animaux.

Dans toutes les figures, le jour 0 correspond au jour de la détection, c'est à dire quand la tumeur devient palpable.

Exposition des souris BALB/c - Nous avons au départ, en collaboration avec le Dr De Seze, adapté la dose de Benzopyrène à injecter au poids des souris, d'où une diminution de la dose d'un facteur 10 par rapport à celle injectée aux rates. Dans une expérience préliminaire, nous avons choisi les souris BALB/c comme modèle (injection des animaux à 6 semaines), lignée utilisée à l'époque au laboratoire. Cependant, seules 10% des souris ont présenté des tumeurs : sur 50 souris ayant subi l'injection, 2 souris ont été exposées et les 3 autres utilisées comme témoins (Figure 13a). La croissance des tumeurs a été très nettement ralentie chez les animaux exposés et le temps de survie très augmentée. Les animaux exposés ont été sacrifiés au 45^{ème} jour d'exposition en raison de contraintes techniques. Les animaux témoins ont eu un temps de survie en moyenne de 25 jours; celui des souris exposées dépasse donc 45 jours (Figure 13b).

Exposition des souris C3H - D'après le producteur IFFA CREDO, la souris C3H est une lignée qui se trouve prédisposée aux tumeurs induites par le benzopyrène. Sur 78 souris qui ont subi l'injection, 15 ont formé des tumeurs, soit 20%. Les souris ont été prises au hasard et réparties en 2 groupes : 7 souris comme témoins et 8 souris exposées dès l'apparition de la tumeur (Figure 14a). On observe un ralentissement de la croissance des tumeurs uniquement durant les 25 premiers jours, puis il y a juxtaposition des courbes des souris témoins et exposées.

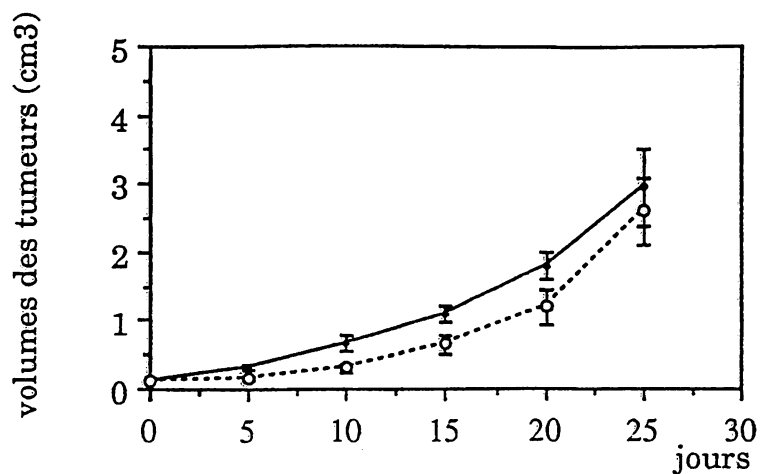


Figure 14a : Moyenne du développement des tumeurs induites par le benzopyrène chez les souris C3H, avec les erreurs standards. Evolution jusqu'aux 25 premiers jours à partir de la détection des tumeurs. Traits pleins : souris témoins, traits pointillés : souris exposées dès la détection des tumeurs.

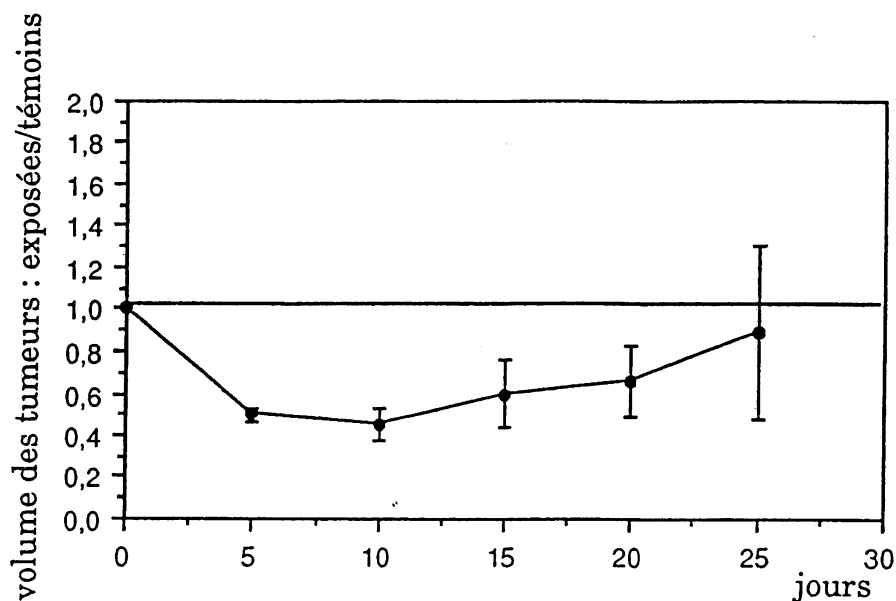


Figure 14b : Autre représentation classique mettant en évidence l'amplitude de l'effet. En ordonnée, est représenté le rapport des volumes des tumeurs des 8 souris C3H exposées sur celles des 7 souris témoins en fonction du temps avec les erreurs standards.

Dans la Figure 14b, nous avons représenté les mêmes résultats sous une autre forme. D'après les toxicologistes qui utilisent ce type de représentation, les effets sont considérés comme intéressants lorsque le rapport du volume des tumeurs des souris traitées sur le volume des tumeurs des souris témoins est de l'ordre de 0,5; nous obtenons cet ordre de grandeur vers le 10^{ème} jour d'exposition. Le temps de survie des animaux ne présente pas de différence : pour les souris témoins, elle est de 37 ± 9 jours, et de 35 ± 7 jours pour les souris exposées.

De façon générale, au cours du vieillissement, les souris C3H développent des tumeurs mammaires. Cette prédisposition pourrait être en relation avec une déficience des cellules du système immunitaire luttant contre le cancer. Dans cette hypothèse, on peut imaginer que les champs magnétiques ne seraient pas assez efficaces pour stimuler des cellules trop déficientes au départ. Le système immunitaire luttant contre la multiplication des cellules cancéreuses ne serait plus efficace quand la tumeur atteint un certain volume, une explication possible de l'absence d'effet du champ magnétique au bout de 25 jours.

Exposition des souris C57 Bl/6 - Cette lignée de souris a été utilisée dans le deuxième modèle de cancer étudié, les tumeurs greffées du mélanome B16. Ce modèle est bien établi, très utilisé et publié antérieurement. Nous avons donc voulu utiliser la même lignée pour le modèle de tumeurs chimio-induites. Etant donné que le produit injecté reste concentré à l'endroit d'injection, la concentration de benzopyrène disponible aux cellules environnantes est indépendante du poids de l'animal. Il nous a paru alors logique d'augmenter les doses de benzopyrène. Nous avons pour cela conservé la même dose que celle utilisée avec les rates et ainsi obtenu 50% de tumeurs développées sur 40 souris mâles. Les expériences avec les rates exposées au champ magnétique non uniforme ont présenté des résultats inexploitable pour l'analyse statistique, mais sont restées à titre indicatif très intéressantes.

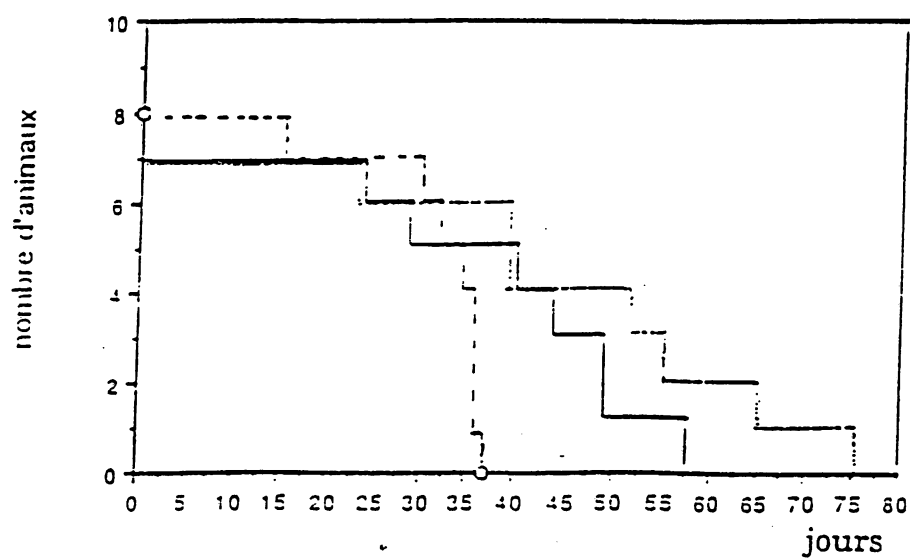


Figure 15a: Survie des souris C57Bl/6: le trait en gros pointillé représente les 8 souris témoins, le trait plein les 7 souris exposées au champ magnétique uniforme et le petit pointillé les 7 souris exposées au champ non uniforme.

Cela nous a incité à tester l'évolution des tumeurs sous exposition à la fois aux champs magnétiques intenses non uniforme et uniforme sur un même lot de souris. Un ralentissement du développement des tumeurs est observé, les temps de survie sont allongés, voici les moyennes avec leur erreurs standards :

les témoins présentent un temps de survie de 30 ± 2 jours

les souris exposées au champ uniforme de 43 ± 4 jours $p=0,034$

les souris exposées au champ non uniforme 48 ± 6 jours $p=0,03$

Les (p) sont déterminés d'après le test statistique de Wilcoxon.

Si on regroupe les souris exposées en champs uniforme et non uniforme, le temps de survie par rapport aux témoins est augmenté de 50% (voir la représentation du temps de survie des animaux Figure 15a).

Les courbes individuelles de la croissance des tumeurs nous renseignent sur les évolutions qui peuvent être différentes selon les individus. La croissance sous forme exponentielle nous a amené à choisir l'échelle des abscisses en échelle logarithmique qui permet de mieux visualiser les courbes sans trop de superposition. Pour les 8 souris témoins, on a observé une évolution de la croissance des tumeurs qui est assez groupée (voir la Figure 15b). Les courbes de croissance des tumeurs des 7 souris exposées au champ magnétique uniforme (Figure 15c) ont montré 2 lots de souris réagissant différemment à l'exposition au champ magnétique : en effet, il y a 2 souris qui ont présenté un plus grand ralentissement durant les 25 premiers jours (carrés et triangles pleins).

Ce phénomène est retrouvé chez les souris exposées au champ non uniforme, Figure 15d, pour 2 souris également. La différence entre champ uniforme et non uniforme n'est pas très importante, il semble donc que l'uniformité du champ ne soit pas un paramètre déterminant.

B-1-1-2) Discussion - Les effets observés semblent varier en fonction des lignées des souris. Les souris C3H forment des tumeurs de façon spontanée, cette prédisposition génétique pourrait être la raison de l'effet très ponctuel des champs .

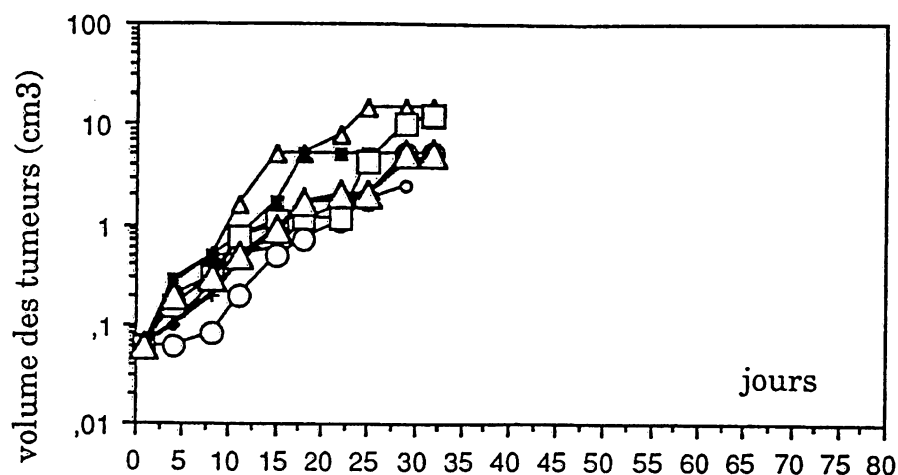


Figure 15b : Courbes individuelles de la croissance des tumeurs des 8 souris C57Bl/6, témoins. T=0 est le jour de la détection des tumeurs.

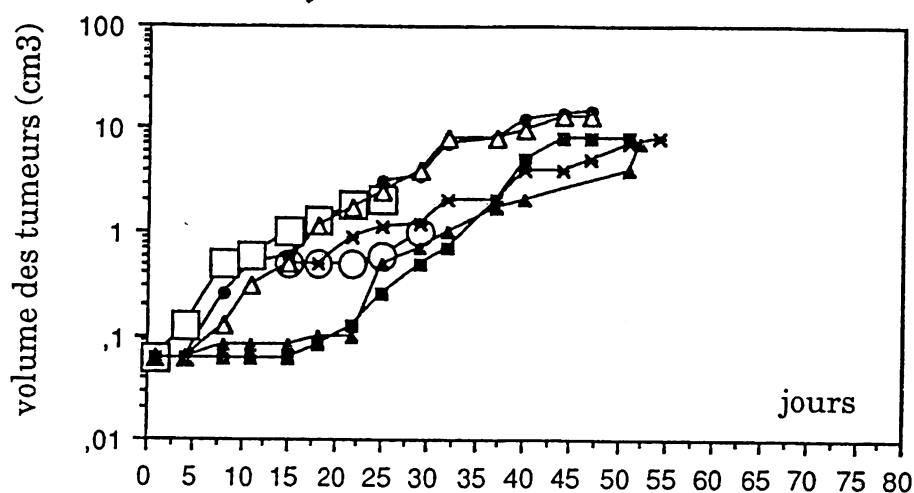


Figure 15c : Les courbes de croissance des tumeurs individuelles des 7 souris C57Bl/6 exposées au champ magnétique uniforme.

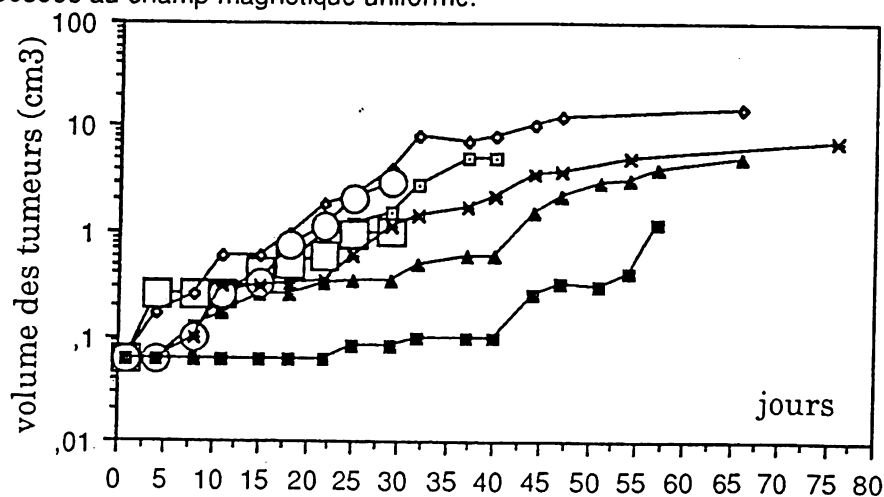


Figure 15d : Les courbes de croissance des tumeurs individuelles des 7 souris C57Bl/6 exposées au champ magnétique non uniforme.

L'effet observé chez la souris BALB/c n'est pas vraiment comparable avec celui observé chez les autres souris, car les doses de benzopyrène ne sont pas les mêmes. Il faut noter que la souris C57Bl/6 appartient à une lignée très utilisée dans les études de vieillissement, et que les processus mis en route au cours du vieillissement de cette lignée sont différents de ceux des BALB/c. La prolifération des cellules tumorales est variable suivant la lignée; en effet, elle est plus rapide pour les BALB/c que pour les C57Bl/6 et encore plus que pour les C3H. Par exemple, au 25^{ème} jour, on a un volume de 10 cm³ chez les souris témoins BALB/c qui est de 5 cm³ chez les C57Bl/6 et de 3 cm³ chez les CH3. L'effet du champ varie donc suivant les lignées. Un effet plus important quand les cellules tumorales se développent rapidement est observé. Cela pourrait être révélateur d'une action directe sur les cellules tumorales; le champ influencerai d'autant plus les cellules se trouvant dans des états d'activations intenses. Nous reviendrons sur cet aspect dans la conclusion.

Les principaux inconvénients du modèle de tumeurs chimio-induites sont le temps de latence d'environ 4 mois et la variabilité du moment d'apparition de la tumeur. Nous n'avons donc pas pu utiliser ce modèle pour faire varier les conditions physiques afin de déterminer quels sont les paramètres importants dans les effets observés.

Notre modèle de tumeurs chimio-induites par le benzopyrène chez la souris présente d'autres imperfections. Le choix des animaux de sexe mâle est critiquable, car les phénomènes de stress et les réactions inflammatoires post-traumatiques sont en fait plus porteurs d'artefacts que les perturbations hormonales chez les femelles. En outre, il s'avère que le taux d'apparition des tumeurs avec le benzopyrène chez les souris femelles est de 100%, comme cela a été expérimenté par le Dr de Seze.

Il est connu que l'immunité des animaux est modifiée par l'injection d'une substance cancérogène, telle que le benzopyrène. Les mécanismes, responsables de la surveillance immunologique, modifiés dans ce cas, ne sont pas encore bien définis. Ces déficiences pourraient être compensées par l'action du champ magnétique, mais ces effets ne sont pas assez importants pour empêcher l'apparition des tumeurs. Le ralentissement de la croissance des tumeurs et l'augmentation du temps de survie sont des effets intéressants et encourageants pour la poursuite d'une étude ayant un objectif d'applications médicales.

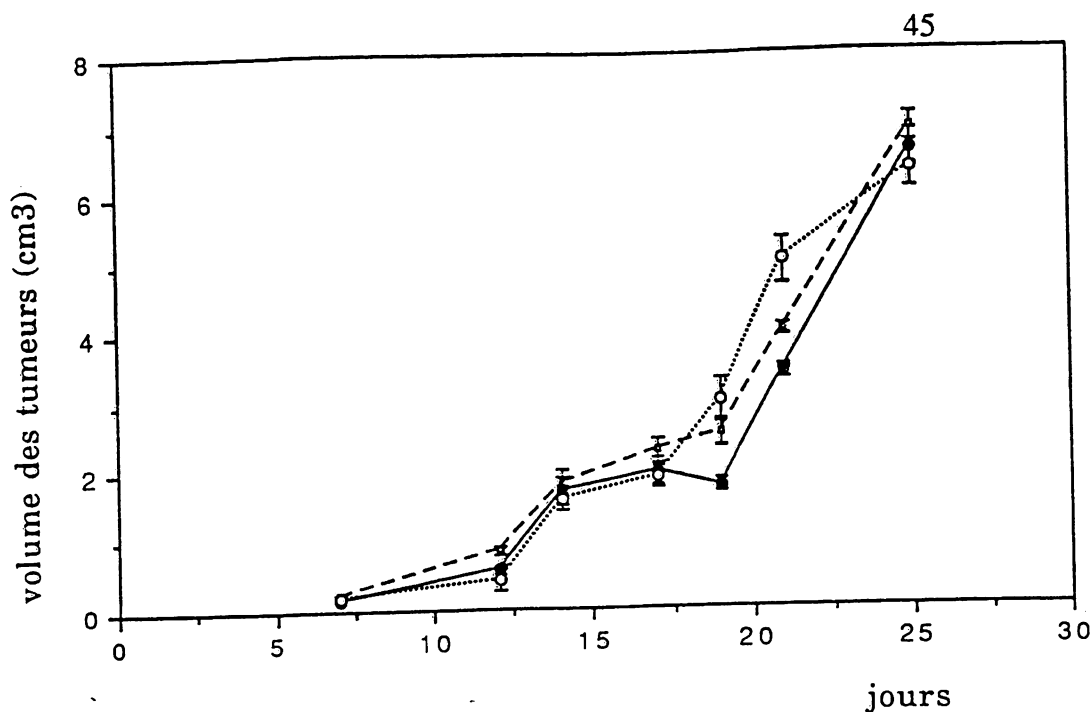


Figure 16a : Moyenne du développement des tumeurs greffées du mélanome B16 chez les souris C57Bl/6, le trait en gros pointillé représente les 10 souris témoins, le trait plein les souris exposées au champ magnétique uniforme et le petit pointillé les 10 souris exposées au champ non uniforme, exposition avant l'injection de la greffe.

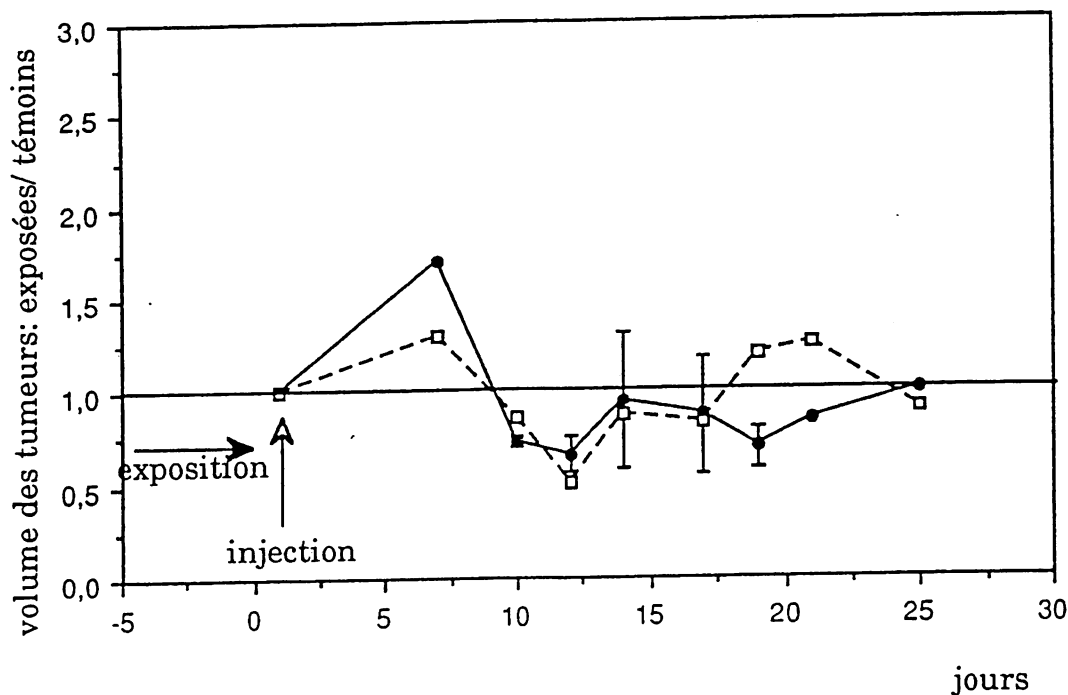


Figure 16b: Evolution des rapports des volumes des tumeurs des 10 souris C57Bl/6 exposées sur 10 souris témoins avec leurs erreurs standards. Des souris du même lot sont exposées soit au champ magnétique uniforme (trait plein), soit au champ non uniforme (trait pointillé).

Nous nous sommes ensuite intéressés à un autre type de tumeur qui présente des caractéristiques très différentes, en comparaison avec les tumeurs chimio-induites, au niveau des processus cellulaires mis en route, le modèle du mélanome B16; ce modèle est très utilisé en recherche dans des domaines variés.

B-1-1-3) Tumeurs greffées : mélanome B16 - La greffe du mélanome B16 est intéressante, car l'incidence de la prise de la greffe dans de bonnes conditions d'expérience est de 100%, ce qui permet d'avoir des groupes homogènes dans l'apparition des tumeurs et le temps de survie. Les mélanocytes peuvent également être cultivés *in vitro* dans la perspective d'expériences de prolifération. Cette lignée cellulaire conservée sur l'animal est stable, diminuant ainsi les problèmes de reproductibilité liés aux mutations fréquentes des lignées en culture.

Une exposition très longue ne nous a pas semblé obligatoirement nécessaire pour observer un effet des champs magnétiques. Un temps identique à celui des expositions des souris pour l'étude de l'activité des cellules NK a été choisi, soit une exposition de 5 jours pour toutes les expériences avec le mélanome B16. Ce temps court d'exposition a été choisi pour pouvoir plus aisément changer le moment de l'exposition par rapport à la greffe; en effet nous avons choisi d'exposer les animaux avant l'injection de la greffe, juste après l'injection et enfin après la prise de la greffe.

Nous avons exposé les souris pendant 5 jours. Les souris sont palpées tous les trois jours et leur tumeur mesurée. La précision de la mesure est fonction de la taille des tumeurs : elle va de $\pm 0,5$ mm, quand la tumeur est petite, à ± 2 mm, quand elle est plus grosse.

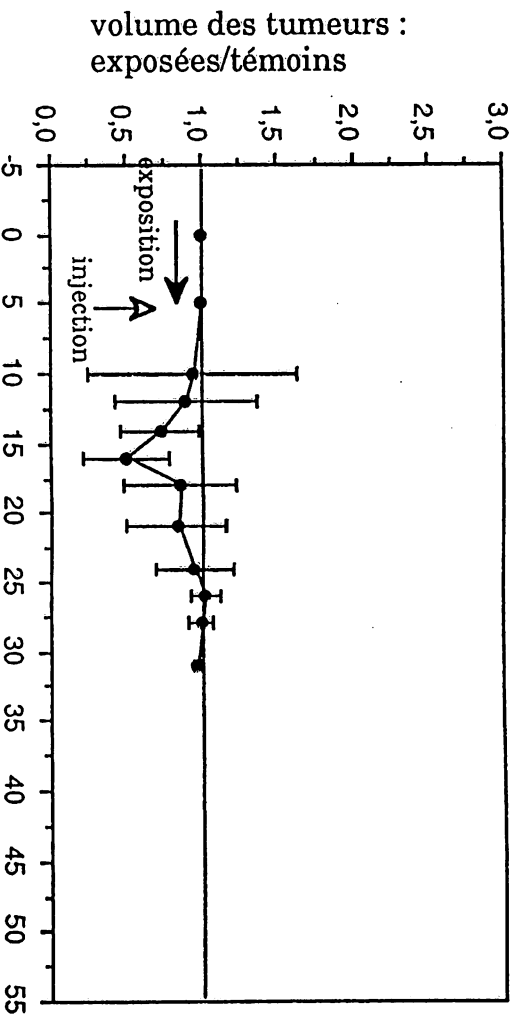


Figure 16c : Evolution des rapports avant l'injection avec erreurs standards. (8 souris C57BL/6 témoins et 8 souris exposées)

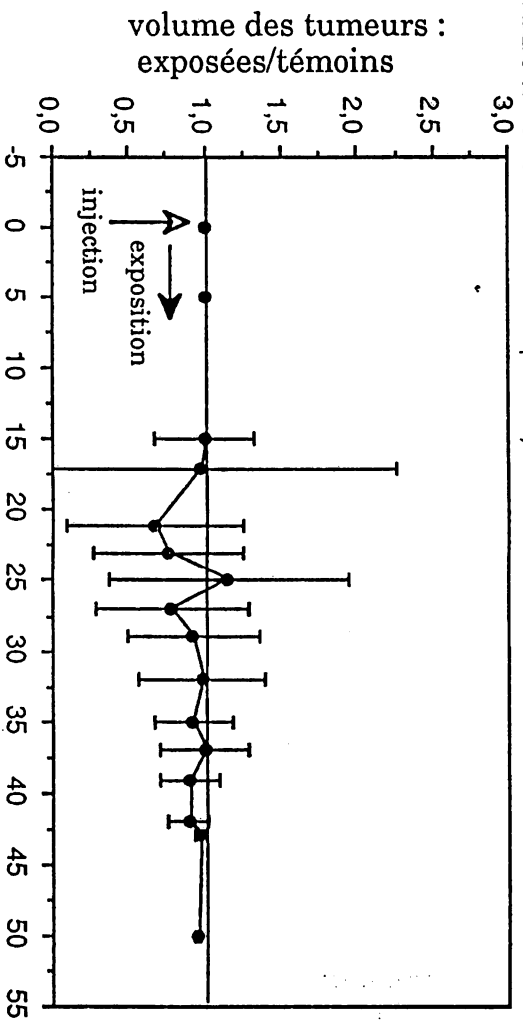


Figure 16d : Evolution des rapports dès l'injection de la greffe. (7 souris témoins C57BL/6 et 7 souris exposées)

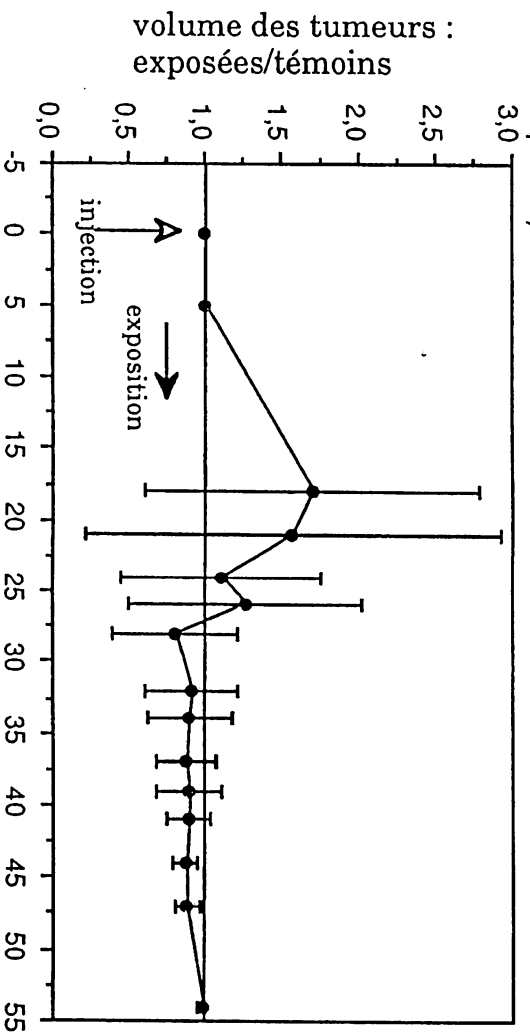


Figure 16e : Evolution des rapports des volumes après la prise de la greffe. (7 souris C57BL/6 témoins et 7 souris exposées)

Exposition avant l'injection du mélanome avec variation du champ

L'exposition avant l'injection du mélanome nous permettait de savoir si les champs magnétiques pouvaient avoir une action sur la préparation du système immunitaire des souris pour lutter contre les cellules cancéreuses injectées. Une série d'expériences a été faite sur un même lot de souris en exposant au champ non uniforme et au champ uniforme. La Figure 16a représente la moyenne du développement des tumeurs greffées du mélanome B16 chez les souris C57 Black. L'effet global sur la croissance des tumeurs étant faible, nous avons choisi une autre représentation, soit l'évolution du rapport du volume tumoral des souris exposées sur celui des souris témoins en fonction du temps (Figure 16b). Les premiers effets observés à 7 jours correspondent à des volumes très faibles, comme nous pouvons le voir sur la figure précédente. Il paraît donc difficile d'en tenir compte, car les erreurs de mesures dépassent la précision des valeurs entre les différents animaux. On observe, 12 jours après la fin de l'exposition et pour les 2 groupes exposés, une diminution significative de 30 à 50% du volume des tumeurs. Cet effet est fugace puisque les valeurs deviennent progressivement identiques puis non significatives. Ensuite, les effets des expositions s'inversent pour le champ non uniforme aux jours 19 et 21, alors que pour l'exposition au champ uniforme, la croissance reste toujours un peu ralentie jusqu'à la mort des animaux. Il n'y a pas de différence entre exposées et témoins dans les temps de survie des animaux.

Une deuxième expérience identique a été faite avec un nouveau lot de souris pour une exposition en champ uniforme avant l'injection du mélanome. Le champ uniforme est choisi, car il peut être plus facilement caractérisé. La Figure 16c montre une diminution significative de la croissance des tumeurs, de l'ordre de 50%, 15 jours après l'exposition, qui revient progressivement à un effet nul. Cette diminution est intéressante, mais non suffisante pour entraîner un allongement du temps de survie des animaux. Cette deuxième série d'expériences confirme les résultats de la première.

Le ralentissement de la croissance tumorale observé 15 jours après le début de l'exposition au champ magnétique uniforme semble reproductible, cependant il est d'une efficacité ponctuelle et ne modifie pas les temps de survie des animaux.

Exposition dès l'injection du mélanome - Afin d'étudier l'action des champs magnétiques directement lors de la prise de la greffe, nous avons exposé les animaux aussitôt après l'injection du mélanome (soit environ 30 minutes après l'injection). Seule une légère diminution, de l'ordre de 20%, non significative, est observée 17 jours après la fin de l'exposition (voir la Figure 16c). Il n'y a pas de différence observée dans les temps de survie des animaux.

Exposition après la prise de la greffe - L'exposition des animaux à ce moment pouvait laisser espérer que les cellules de défense, se trouvant sur le site et luttant contre la greffe, bénéficient des éventuels effets stimulants du champ. L'expérience ne montre pas d'effet significatif, une augmentation non significative observée au départ correspond à de petits volumes. Cependant, 17 jours après l'exposition, on observe à nouveau ce léger ralentissement de la croissance (de l'ordre de 15%) chez les animaux exposés qui persiste jusqu'à la mort. voir Figure 16e. Il n'y a pas de différence non plus dans les temps de survie des animaux.

B-1-1-4) Discussion - Les effets observés sont de faible amplitude. La diminution de la croissance de tumeurs chez les animaux exposés semble reproductible, mais reste passagère puisqu'elle ne persiste que quelques jours. Cet effet est observé dans tous les cas 15 jours environ après l'exposition. Est-ce un effet direct sur les cellules tumorales qui modifierait partiellement leur prolifération ou un effet indirect sur d'autres cellules qui aurait une interférence sur la prolifération tumorale ?

Le résultat le plus intéressant est une exposition avant l'injection des tumeurs. Ce qui peut laisser supposer d'une action du champ magnétique sur la préparation de l'organisme à lutter contre la prolifération massive des cellules tumorales, peut-être donc une préstimulation des cellules luttant contre la tumeur.

Bien que le rôle des cellules NK envers les tumeurs solides soit assez flou, il a été montré en revanche que la sensibilité à la cytotoxicité des cellules NK envers les cellules des tumeurs greffées est dépendante du mode de conservation de la lignée. En effet, les lignées conservées sur l'animal sont souvent insensibles à la cytotoxicité des cellules NK (Kiessing et al., 1975).

Des auteurs l'ont bien étudié dans le cas des mélanocytes B16 (Talmadge et al., 1980). Cette lignée restée *in vivo* est insensible à l'activité NK. Toutefois, un temps de culture suffisant lui fait acquérir la sensibilité à la lyse des cellules NK (après environ 1 mois de culture). Le passage *in vitro* de cette lignée augmente l'activité Natural Killer des animaux greffés, et cela entraîne un ralentissement de la croissance des tumeurs (réduction d'un facteur 4 du volume des tumeurs). L'incidence des métastases spontanées est également réduite avec les cellules tumorales B16 "passée" *in vitro*.

Dans nos expériences, la lignée B16 que nous avons utilisée a toujours été conservée sur l'animal. L'activation des cellules NK par les mélanocytes B16 "passées" en culture nous a semblé trop importante pour la coupler aux effets des champs magnétiques. Nous n'avons pas voulu prendre le risque que cette activation cache un éventuel effet du champ.

Le choix de ce type de tumeurs peu antigéniques est critiquable dans notre contexte de travail. Une orientation vers d'autres types de tumeurs greffées antigéniques permettra de mieux cerner une éventuelle action du système immunitaire spécifique couplée aux champs magnétiques. Cette orientation semble préférable, surtout au vu des résultats observés dans la littérature.

Il a été observé depuis longtemps des effets des champs sur différents types de tumeurs greffées. Cros (1964) a testé des champs magnétiques uniformes constants (qui ne varient pas dans le temps, d'intensité de 0,4 T) sur des adénocarcinomes. Il a observé une augmentation du temps de survie des animaux, celui-ci passant de 7 à 30 jours pour les souris exposées 7-10 jours avant la transplantation des cellules tumorales. Batkin et collaborateurs (1977) observent qu'avec un champ magnétique alternatif (60 Hz, 1,2 mT) l'évolution de neuroblastomes implantés à des souris était différente de celle des témoins : il y a un ralentissement du développement des tumeurs et une augmentation du nombre de cellules qui infiltrent la tumeur. Plus récemment, Omote et collaborateurs (1990) combinent champs magnétiques pulsés (200 Hz, 4 mT) et médicaments anti-tumoraux (la mitomycine C) sur deux modèles de tumeurs greffées : KMT-17 qui sont des cellules très antigéniques et KDH8 qui, elles, sont peu antigéniques. Le taux de survie des animaux pour les témoins est de 0% dans les 2 types de tumeurs. Avec le champ magnétique, le taux de survie est de 47% pour KMT-17 et de 8% pour KDH8. Quand les auteurs associent au champ le médicament anti-tumoral, les taux de survie sont alors respectivement de 77% et 18%.

Dans le but d'observer si le champ magnétique étudié pouvait avoir une action sur le système immunitaire, et ayant en outre des contacts avec une équipe de biologiste maîtrisant bien le modèle NK chez la souris, nous avons étudié cette activité après 5 jours d'exposition.

B-1-2) Etude de l'effet sur l'activité Natural Killer

En collaboration avec une équipe de biologistes du laboratoire du Professeur Deschaux à Limoges, il a été fait une étude de l'activité NK chez des souris BALB/c exposées aux champs magnétiques pulsés à 0.8 Hz pendant une durée de 5 jours (10 heures/jour).

Il faut noter que la mesure de l'activité NK des souris saines exposées *in vivo* au champ magnétique se fait *in vitro*. L'activité oncolytique des cellules NK non stimulées, comme c'est le cas lors de la mesure *in vitro*, peut être sous-estimée en comparaison avec les cellules *in vivo* qui sont sous stimulation continue par l'interleukine2, l'interféron et/ou d'autres cytokines.

L'activité NK des cellules spléniques est testée chez les souris BALB/c d'âges différents. Des résultats différents sont observés suivant l'âge des souris et suivant l'intensité du champ magnétique. Les résultats sont décrits dans l'article suivant :

Effects of Time-Varying Uniform Magnetic Fields on Natural Killer Cell Activity and Antibody Response in Mice *Sowri*

R. de Seze, C. Bouthet, S. Tuffet, P. Deschaux, A. Caristan, J.M. Moreau, and B. Veyret

Laboratoire de Bioélectromagnétisme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire PIOM, URA 1506 CNRS, ENSCPB, Université Bordeaux I, Talence (S.T., A.C., J.M.M., B.V.), Laboratoire d'Immuno-Physiologie, Université de Limoges (C.B., P.D.), and Service Central de Médecine Nucléaire, Centre Hospitalier Universitaire, Nîmes (R.d.S.), France

Natural Killer cell activity and antibody response were studied in Balb/c mice which were exposed in vivo to uniform pulsed magnetic fields (square-wave, 0.8 Hz, 120 mT maximum field strength, 0.1 s rise-time) for 5 days, 10 h/day. No effects were found in antibody response to sheep red blood cell (SRBC) immunization as assayed by counting the plaque-forming cells (PFC) in the spleens of animals on the sixth day. Following 5-day exposures, the activity of Natural Killer (NK) cells was measured in vitro by challenge with YAC-1 cells, in experiments in which mice were not immunized. An increase of NK cytotoxic activity due to exposure was found which depended on the age of the mice (effect observed above 12 weeks) and on the strength of the applied field (effect observed above 30 mT). ©1993 Wiley-Liss, Inc.

Key words: in vivo exposure, plaque-forming cells, cytotoxic activity, square-wave magnetic fields

INTRODUCTION

on d. 12/10/92
Effects of exposure to time-varying magnetic fields have been studied in the last twenty years in a wide variety of biological systems. Most laboratory studies are concerned presently with effects produced by extremely low frequency (ELF) fields present in either electricity production and transmission (50 or 60 Hz, below 100 μ T) or therapeutic applications (pulsed or sinusoidal, below 1,000 Hz and below 10 mT).

Paru Among the biological systems that are most sensitive to electromagnetic fields are the neuroendocrine and immune systems. We began exploring effects on the immune system by using two well-established immunological tests: measurements

Received for review August 5, 1992; revision received January 4, 1993.

Address reprint requests to Dr. B. Veyret, Laboratoire PIOM, ENSCPB, Université Bordeaux I, 33405 Talence Cedex, France.

of antibody response to sheep red blood cells (SRBC) using the plaque-forming cells technique (PFC), and evaluation of Natural Killer (NK) cell activity. Since NK cytotoxic activity is known to vary with the age of the animal, the effect of the field was assayed on 6-, 12-, and 24-week-old mice.

Among the mechanisms hypothesized for bioeffects of time-varying magnetic fields, the production and action of induced currents is a major one. Therefore, we used high-intensity pulsed magnetic fields up to 120 mT. The frequency of 0.8 Hz was chosen in the middle of the available range for the square-wave modulation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Balb/c mice (Iffa Credo, L'Arbresle, France, aged 6, 12, or 24 weeks) were used in all experiments. Standard exposure conditions were as follows: animals (between 7 and 10 animals/run) were exposed for 5 days, 10 h/day (from 0800 to 1800). They were housed in a cylindrical plexiglas cage (16 cm diameter, 20 cm²/animal) and received no food or water during exposure. The control group (between 7 and 10 animals/run) was placed in an identical cage without food and water, away from the exposure system at a distance greater than 3 m, where the coils' field peak-strength was less than 50 μ T. Following daily exposure, all animals were placed in standard cages with food and water ad libitum. The temperature of the room was controlled (22 ± 2 °C) but the humidity was not. During exposure, the temperature inside the animal cage was monitored with an alcohol thermometer and never exceeded room temperature by more than 2 °C while the difference was below 1 °C for the control cage. The room where the animals were exposed and kept overnight was set on a 14/10 h light/dark cycle. Noise level was similar for both groups of animals. Animals were sacrificed by cervical dislocation on the sixth day.

Preparation of Spleen Lymphocytes

Spleens were removed aseptically and dissociated in RPMI-1640 medium (Gibco, Glasgow, UK). Erythrocytes were lysed and, after three washes, cell numbers were adjusted in RPMI-1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum and 1% antibiotic solution (Gibco).

Evaluation of the Antibody Response

SRBC immunization. In each run of the SRBC experiment, each of the 6-week-old exposed and control mice was immunized i.p. immediately before exposure, with 0.4 ml of SRBC (Institut Pasteur, Paris, 20% dilution in RPMI).

Plaque-forming cell (PFC) assay. In each run, on the sixth day, the spleens from exposed and control mice were collected and splenic cells were prepared and diluted to 10^6 cells/ml in RPMI. To 600 μ l of the cell suspension were added 75 μ l of a 20% SRBC suspension and 75 μ l of complement (C', Biomérieux). The resulting mixture was placed in a Cunningham chamber and incubated at 37 °C for 30 min [Cunningham and Szenberg, 1968]. The plaques were then counted and the number of plaque-forming cells (PFC) was calculated per 10^6 cells. In all experimental runs, the PFC count was performed on the sixth day when the number of PFC is known to be close to its maximum [Veyret et al., 1991].

Natural Killer Cell Activity

NK cell cytotoxic activity was measured by a ^{51}Cr release assay using YAC-1 cells, a Maloney virus-induced lymphoma, as target cells. Cultured YAC-1 cells were labelled by incubating 5×10^6 cells with 200 μCi ^{51}Cr (sodium chromate) for 1 h at 37 °C, and washed. Spleen lymphocytes were prepared and adjusted to 20×10^6 cells/ml. Cytotoxicity was measured in triplicate 200 μl samples at effector to target (T/E) ratios from 1/100 to 1/25 using 2×10^5 YAC-1 target cells. After 4 h of incubation at 37 °C, 100 μl aliquots of the supernatants were removed and radioactivity measured in a gamma counter. Spontaneous-release (SR) or total-release (TR) counts in cpm were obtained by incubating labelled target cells in medium alone or with 3 M HCl respectively.

NK activity was expressed as the ratio R :

$$R = (\text{cpm} - \text{SR cpm})/(\text{TR cpm} - \text{SR cpm}).$$

Magnetic Field Exposure

A Plexiglas cage (cylindrical shape, vertical axis, 16 cm internal diameter, 7.5 cm internal height) containing the 10 exposed mice was placed between two air-gap water-cooled coils placed in the Helmholtz position (16 cm inner diameter, 8 cm separation, vertical axis). The two coils, wired in parallel, had a resistance of 2.7 ohms. The intensity of the magnetic field was measured using a Hall-effect gaussmeter (F.W. Bell 4048). The magnetic field was uniform within 5% in a range of 6 cm around the coils' axis and over the 8 cm height between coils. The maximum intensity that could be reached was 120 mT, corresponding to a 44 A current produced by a solid-state power supply (Sodilec SDR TH 110-100). A 0.8 Hz square-wave signal was fed into this power supply in order to pulse-modulate its output. The square-wave signal was produced by a standard signal generator (Enertec 4430). Rise-time and fall-time of the magnetic field, measured with an oscilloscope, were 0.1 s (10–90%) which corresponds to a time-derivative of 1 T/s.

Statistical Analysis

Because of the small size of the samples, the Mann Whitney test was used in the analysis of all runs.

RESULTS

SRBC Experiment

Field exposure. Seven exposure runs were performed at the laboratory in Limoges at various field strengths with 6-week-old mice. Results of the PFC counts are given in Table 1. None of the measured differences between exposed and control groups is statistically significant.

Confinement. In order to see whether stress induced by confinement could inhibit the effect of the field, three runs were performed in the two laboratories: mice were placed under standard exposure conditions for 5 days with the magnetic field off. The control group was placed in a standard cage with food and water. In these three runs performed in two different laboratories (Table 2), there was no statistically significant difference in PFC count between confined and control groups.

TABLE 1. Change in PFC Number as a Function of Field Strength (Units Are PFC Number $\times 10^{-1}/10^6$ Cells)

Field strength (mT)	PFC _{control} mean $\pm$ S.E.M.(n)	PFC _{exposed} mean $\pm$ S.E.M.(n)	PFC exposed/control ratio	
10	42 $\pm$ 4 (8)	52 $\pm$ 3 (9)	1.24	NS
15	38 $\pm$ 4 (9)	43 $\pm$ 3 (8)	1.14	NS
30	50 $\pm$ 3 (9)	49 $\pm$ 2 (10)	0.99	NS
30	47 $\pm$ 4 (6)	46 $\pm$ 3 (7)	0.98	NS
60	68 $\pm$ 5 (9)	57 $\pm$ 5 (8)	0.84	NS
120	71 $\pm$ 4 (7)	90 $\pm$ 8 (7)	1.27	NS
120	92 $\pm$ 11 (7)	95 $\pm$ 8 (8)	1.02	NS

n, number of animals.

TABLE 2. Effect on PFC Change of Confining Animals (Units Are PFC Number $\times 10^{-1}/10^6$ Cells)

PFC _{control} mean $\pm$ S.E.M. (n)	PFC _{confined} mean $\pm$ S.E.M. (n)	PFC confined/control ratio	
82 $\pm$ 7 (10) ^a	89 $\pm$ 10 (10)	1.09	NS
71 $\pm$ 14 (5) ^b	74 $\pm$ 12 (5)	0.96	NS
83 $\pm$ 10 (10) ^b	82 $\pm$ 10 (10)	0.99	NS

n, number of mice.

^aRun performed at the University of Limoges.^bRun performed at the University of Bordeaux.

NK Experiment

Dependence on the age of the animals. Two series of runs were performed under the same exposure conditions (30 or 60 mT) with animals which were 6, 12, or 24 weeks old at the start of exposure. Table 3 shows the dependence on the age of the absolute NK activity and of its change due to exposure. NK activity was increased with respect to controls when exposed animals were 12 or 24 weeks old at the start of exposure. However, for 6-week-old animals, when NK activity is known to be at its maximum [Kiessling et al., 1975], the increase was not statistically significant. This phenomenon was observed at both field strengths as shown in Figure 1.

Dependence on field strength. The results of additional runs performed with 12 week-old mice are given in Table 4 where the absolute NK activity and its change due to exposure are given as a function of magnetic field strength between 10 and 60 mT. There seems to be a threshold at 30 mT for the appearance of the effect.

Interlaboratory comparison. All runs in Table 4 had been carried out in the laboratory in Limoges. When the apparatus was moved to the laboratory in Bordeaux, an additional run was performed there at 120 mT and compared to one that had been performed in the laboratory in Limoges under the same conditions. The results of the two runs are given in Table 5. The statistical significance of these results is not as high as in the previous runs in which greater numbers of animals were used.

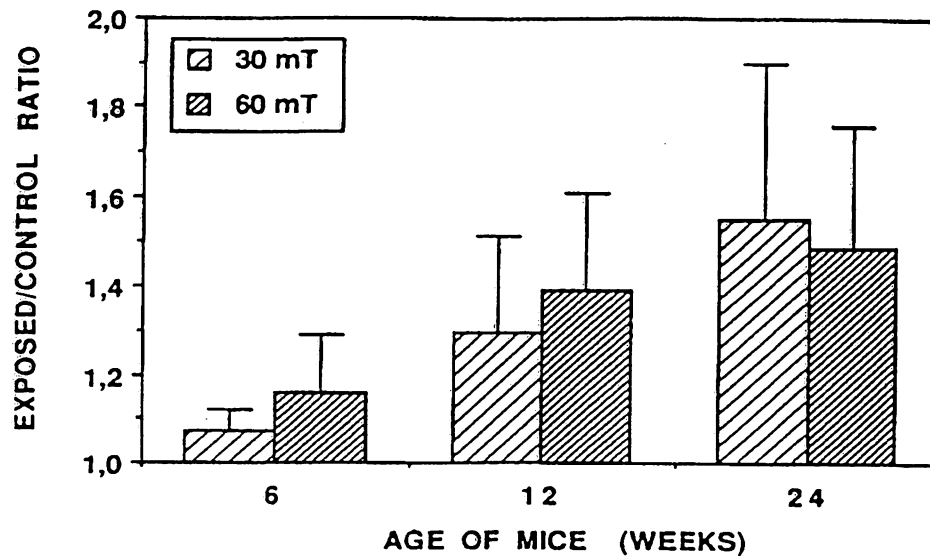


Fig. 1. NK cell cytotoxic activity change as a function of the age of the mice for runs at 30 and 60 mT. Average of the pooled cytotoxic data for the 3 T/E ratios for each run. Error bars correspond to standard errors.

The results of NK activity measurements performed in the two different laboratories cannot be compared on an absolute scale because of inevitable slight differences in procedures for handling of animals, spleen cells, and target cells. However, it can be seen in Table 5 that, within uncertainty, the amplitude of the effect is similar in the two laboratories and equivalent to that measured at 60 mT.

TABLE 3. NK Experiment: Change of Activity as a Function of the Age of Mice (Runs Performed in Limoges)

Field strength (mT)	Number of animals exp/cont	Age (weeks)	Target/effector ratio	R_{control} $\pm$ S.E.M. (%)	R_{exposed} $\pm$ S.E.M. (%)	Cytotoxicity change exposed/control ratio	
30	8 exp/ 8 cont	6	1/100	26.7 ± 0.8	28.8 ± 0.5	1.08	NS
			1/50	26.6 ± 0.9	28.1 ± 0.5	1.05	NS
			1/25	23.7 ± 0.6	25.9 ± 0.8	1.09	NS
30 ^a	15 exp / 16 cont	12	1/100	22.0 ± 1.5	30.6 ± 1.4	1.39	$P < .005$
			1/50	19.0 ± 2.3	25.8 ± 2.6	1.36	$P < .05$
			1/25	17.4 ± 2.2	19.6 ± 1.8	1.13	NS
30	6 exp / 7 cont	24	1/100	9.7 ± 0.9	14.6 ± 0.9	1.51	$P < .005$
			1/50	7.8 ± 1.0	11.9 ± 1.2	1.52	$P < .05$
			1/25	5.5 ± 0.9	8.9 ± 1.1	1.62	$P < .05$
60	9 exp / 9 cont	6	1/100	31.8 ± 3.5	36.4 ± 1.8	1.14	NS
			1/50	30.4 ± 1.5	36.7 ± 1.3	1.17	$P < .05$
			1/25	29.0 ± 1.6	32.8 ± 1.1	1.13	NS
60	10 exp / 10 cont	12	1/100	19.1 ± 1.5	25.0 ± 1.0	1.31	$P < .05$
			1/50	16.7 ± 2.3	25.5 ± 2.5	1.52	$P < .05$
			1/25	16.3 ± 0.9	21.6 ± 1.0	1.32	$P < .01$
60	8 exp / 8 cont	24	1/100	8.2 ± 1.0	13.1 ± 0.7	1.59	$P < .01$
			1/50	7.2 ± 0.5	10.6 ± 0.9	1.48	$P < .05$
			1/25	5.5 ± 0.6	7.7 ± 0.9	1.38	NS

$R = (\text{sample cpm} - \text{spontaneous release cpm}) / (\text{Total release cpm} - \text{spontaneous release cpm})$.

^aAverage of two runs.

TABLE 4. NK Experiment: Change of Activity as a Function of Magnetic Field Strength (12 Week-Old Mice)*

Field strength (mT)	Number of animals exp/cont	Target/effector ratio	R_{control} $\pm$ S.E.M (%)	R_{exposed} $\pm$ S.E.M (%)	Cytotoxicity change exposed/control ratio
10	16 exp / 17 cont	1/100	18.1 $\pm$ 2.8	21.3 $\pm$ 6.8	1.18 NS
		1/50	17.9 $\pm$ 3.9	19.4 $\pm$ 5.0	1.08 NS
		1/25	12.4 $\pm$ 2.4	12.7 $\pm$ 3.8	1.02 NS
15	16 exp / 18 cont	1/100	23.4 $\pm$ 4.0	24.4 $\pm$ 3.5	1.04 NS
		1/50	18.5 $\pm$ 3.9	16.6 $\pm$ 2.6	0.90 NS
		1/25	10.8 $\pm$ 2.5	11.2 $\pm$ 3.5	1.03 NS
30	15 exp / 16 cont	1/100	22.0 $\pm$ 6.0	30.6 $\pm$ 5.6	1.39 $P < .005$
		1/50	19.0 $\pm$ 9.3	25.8 $\pm$ 10.1	1.36 $P < .05$
		1/25	17.4 $\pm$ 8.7	19.6 $\pm$ 6.9	1.13 NS
60	19 exp / 19 cont	1/100	19.1 $\pm$ 4.1	24.5 $\pm$ 8.6	1.29 $P < .005$
		1/50	16.7 $\pm$ 7.4	24.0 $\pm$ 6.3	1.44 $P < .01$
		1/25	16.3 $\pm$ 2.6	21.6 $\pm$ 3.1	1.32 $P < .01$

*At each field strength, average of the results of two runs performed at the University of Limoges. $R = (\text{sample cpm} - \text{spontaneous release cpm}) / (\text{Total release cpm} - \text{spontaneous release cpm})$.

DISCUSSION

Antibody Response

In previous work, we had shown effects on the antibody responses in 6-week-old mice of pulsed low-power microwaves (9.4 GHz, 1 μ s pulses, 1,000 pps, amplitude modulated at 10–41 MHz, 30 μ W/cm² average incident power) [Veyret et al., 1991]. The antibody response of mice is known to be fully effective at 6 weeks. Thereafter, there is no great variation of the humoral response with age. Using the

TABLE 5. NK Experiment: Change of Activity Induced by a 120 mT Magnetic Field (12-Week-Old Mice)

Number of animals exp/cont	Target / Effector ratio	R_{control} $\pm$ S.E.M (%)	R_{exposed} $\pm$ S.E.M (%)	Cytotoxicity change exposed/control ratio
9 exp / 7 cont ^a	1/100	24.1 $\pm$ 5.1	38.5 $\pm$ 8.0	1.60 $P < .01$
	1/50	21.9 $\pm$ 4.7	28.8 $\pm$ 11.0	1.32 NS
	1/25	19.0 $\pm$ 3.7	26.3 $\pm$ 9.7	1.38 NS
				average of pooled results: 1.4 $\pm$ 0.4
10 exp / 10 cont ^b	1/100	17.5 $\pm$ 3.5	22.4 $\pm$ 3.9	1.28 NS
	1/50	11.6 $\pm$ 6.6	15.6 $\pm$ 9.3	1.34 NS
	1/25	8.0 $\pm$ 5.9	10.1 $\pm$ 6.8	1.26 NS
				average of pooled results: 1.3 $\pm$ 0.3

^aExperiment performed at the University of Limoges.

^bExperiment performed at the University of Bordeaux.

En suite, same biological model, we now demonstrate that there is no significant change in antibody response caused by exposure to a particular type of pulsed magnetic field. Moreover, confining the animals had no discernable effect on antibody response to SRBC, which could have biased the effect of the fields.

NK Activity

There have been a few published results on effects of time-varying magnetic fields on Natural Killer cell (NK) activity. Malter et al. [1987] exposed rats to 2 or 50 Hz pulsed fields (26.2 and 13.5 mT, respectively) for 8 days, and they observed an increase in number and/or activity of NK cells from the liver of the rats but not from their spleen. McLean et al. [1991] also performed exposures of mice to magnetic fields (60 Hz, 2 mT) and examined the effects of the field on NK activity in spleen and blood of mice injected with a carcinogen. They found no difference between field-exposed and sham-exposed animals but observed a decrease in NK cytotoxic activity due to field exposure when a tumor promoter had been added. Natural Killer cells are known to play a role in tumor control [Wright and Stacey, 1991] and we have recently observed that our specific pulsed fields can elicit a decrease of the rate of tumor growth in animals [Tuffet et al., 1993].

The present results show a major increase of NK activity of spleen cells of Balb/C mice that have been exposed for 50 h. This increase is globally significant and occurs above a threshold of 30 mT. There seems to be a plateau of the amplitude of the effect up to 120 mT. The effect is observed only when the activity of NK cells has started to normally decrease with the age of the animals (after 6 weeks). It then can be brought up to the original maximum level measured at 6 weeks. It is not yet possible to state whether the biological response to the field has reached saturation or the physical interaction has reached its maximum. In these experiments the value of dB/dt is independent of the intensity of the field.

The biological mechanism for this effect can only be speculated at: either the number of NK cells is increased following exposure or the individual activity of the cells is increased. Experiments are being planned to determine which mechanism is predominant. Further work will be performed to determine earlier events triggering an increase in NK activity (e.g., increase in interleukin II production).

The effect cannot be explained by overheating of the animals since temperature at the site of exposure was at most 2 °C above room temperature and since an increase in body temperature of the mice would lead to a decrease of NK activity [Johnston et al., 1986]. This increase in NK activity was observed in two different laboratories using the same biological model and apparatus.

CONCLUSIONS

No effect of a pulsed magnetic field was found on antibody response in mice.

In contrast, an increase in NK cell cytotoxic activity was found within the test exposure conditions which leads to the suggestion that such type of exposure could be of some help in tumor control. This is being explored in separate experiments in which tumor bearing mice are exposed to the same pulsed magnetic field. Preliminary in vivo results point towards an effect of the fields on tumor growth, and these effects are consistent with an increase of the activity of anti-tumor cells such as NK.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Regional Research Council of Aquitaine. The authors thank Mrs. O. Nardou in Limoges for her technical assistance and P. Neveu and S. Vitiello in Bordeaux for their participation in the NK assays.

REFERENCES

- Cunningham AJ, Szenberg A (1968): Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology* 14:599-601.
- Johnston RL, Rama Rao G, Tompkins WAF, Cain CA (1986): Effects of in vivo ultrasound hyperthermia on natural killer cell cytotoxicity in the hamster. *Bioelectromagnetics*, 7:283-294.
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H (1975): Natural Killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Maloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. 5:112-117.
- Malter M, Schriever G, Kuhnlein R, Suss R (1987): Tumoricidal cells increased by pulsating magnetic field. *Anticancer Res* 7:391-394.
- McLean JRN, Stuchly MA, Mitchel EJ, Wilkinson D, Yang H, Goddard M, Lecuyer DW, Schunk M, Callary E, Morrison D (1991): Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60 Hz magnetic field: II. Tumor development and immune response. *Bioelectromagnetics* 12:273-288.
- Tuffet S, Veyret B, de Seze R, Moreau JM (1993): Effects of pulsed magnetic fields on the proliferation of tumor cells in vitro. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 30:151-160.
- Veyret B, Bouthet C, Deschaux P, de Seze R, Geffard M, Jousset-Dubien J, le Diraison M, Moreau JM, Caristan A (1991): Effects of pulsed and amplitude-modulated low intensity microwaves on the antibody response of mice. *Bioelectromagnetics* 12:47-56.
- Wright PFA, Stacey NH (1991): A species/strain comparison of hepatic natural lymphocytotoxic activities in rats and mice. *Carcinogenesis* 12:1365-1370.

B-1-2-1) Réplication des expériences faites à Limoges - Les détails de la mesure du test de l'activité NK, activité anti-tumorale, sont décrits dans matériels et méthodes. La reproduction de cette expérience a été faite dans notre laboratoire dans les mêmes conditions. Les augmentations ont été retrouvées dans notre expérience (voir Figure 17a). La réponse, variable suivant chaque souris, entraîne des erreurs standards importantes, rendant l'analyse statistique non significative.

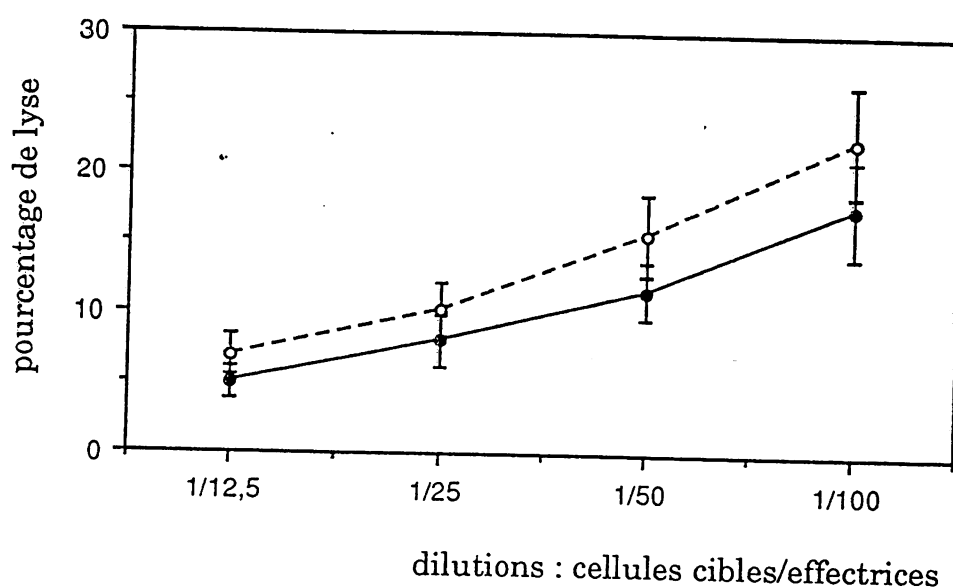


Figure 17a: Réplication d'expériences faites initialement à Limoges : Pourcentage de lyse des cellules Natural Killer en fonction des différentes dilutions, cellules cibles/cellules effectrices, avec les erreurs standards. Traits pleins 10 souris Balb/C témoins, traits pointillés 10 souris exposées au champ magnétique pulsé (0,8 Hz) intense (120 mT).

Un champ magnétique de même intensité, mais cette fois constant, a été testé avec exactement le même protocole. Le résultat de la Figure 17b montre l'absence d'effet du champ constant sur l'activité NK.

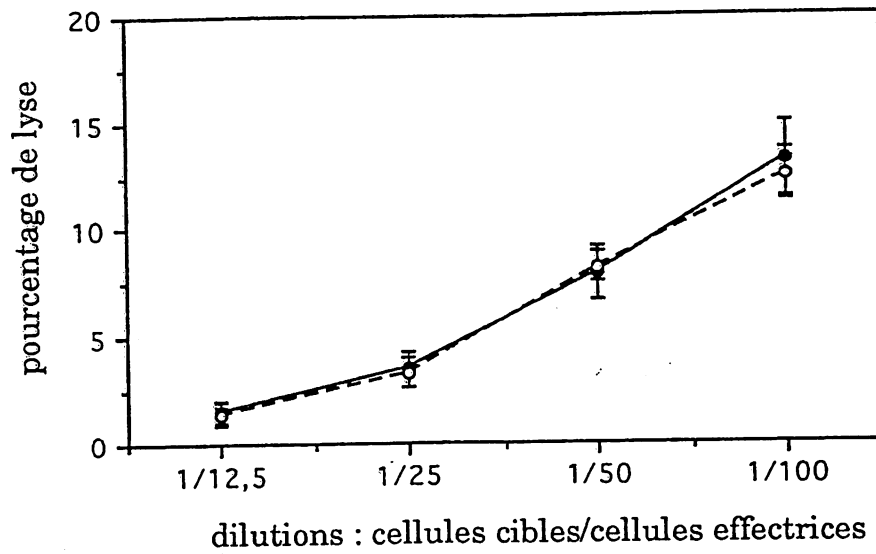


Figure 17b: 10 souris BALB/c sont exposées au champ magnétique constant de 60 mTet
10 souris témoins

B-1-2-2) Etude sur une autre lignée de souris - Suite à l'exposition des souris C3H de 12 semaines, pendant 5 fois 10 heures au champ magnétique, on observe une augmentation de l'activité NK en moyenne de 25% (Figure 18).

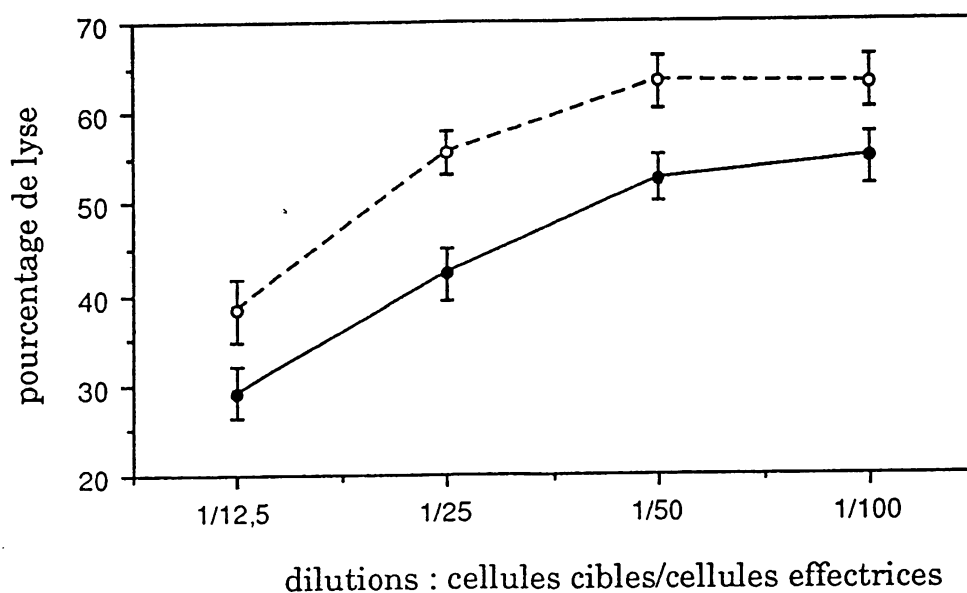


Figure 18 : Pourcentage de lyse des cellules Natural Killer en fonction des différentes dilutions, cellules cibles sur cellules effectrices, avec les erreurs standards. Les traits pleins sont les 10 souris C3H témoins, les traits pointillés les 10 souris exposées au champ magnétique intense.

Cette forte augmentation de l'activité peut-être due soit à une augmentation du nombre des cellules NK, soit à une augmentation de leur activité. Les deux hypothèses existent, et une façon de les tester c'est de mesurer le nombre de cellules en cytométrie de flux. Or, on observe d'après la Figure 18 que l'effet est à peu près le même quelle que soit la dilution des cellules cibles sur cellules effectrices. On pourrait alors suggérer qu'il s'agit d'une augmentation de la proportion de cellules NK dans la suspension splénique.

Wright et Stacey (1991) étudient l'activité NK chez plusieurs lignées de souris et observent une nette différence dans cette activité : l'activité NK des souris C3H est bien supérieure à celle des souris B6C3F1 qui est supérieure à l'activité des souris CBA qui est elle-même supérieure à l'activité des BALB/c. Nous avons confirmé ces différences entre C3H et BALB/c dans le pourcentage de lyse. Les souris BALB/c ont une activité NK qui n'est pas très importante, puisque le pourcentage de lyse est autour de 20% dans le meilleur des cas (au 1/100), alors qu'il passe à 50% pour les C3H.

B-1-2-3) Discussion - Il faut savoir que les agents capables de stimuler dans cette proportion l'activité anti-tumorale des cellules NK testée *in vitro* sont assez rares (nous ne parlons pas bien sûr des autres fonctions des cellules NK qui, elles, peuvent être stimulées dans de nombreuses occasions). L'âge des animaux est un paramètre très important pour observer l'effet du champ magnétique. Il est connu maintenant que les réponses immunitaires varient beaucoup chez la souris en fonction de l'âge (Guillaumin et al 1983) et ceci dans des intervalles de temps très courts (quelques semaines). L'intensité des réponses est à son optimum en général vers 6-8 semaines, moment de la maturation immunologique. Pendant cette période, la synthèse d'anticorps et la réponse aux mitogènes, par exemple, sont à leur maximum. Dans l'article de de Seze et al 1993, on note des différences du pourcentage de lyse des cellules NK chez les souris BALB/c en fonction de l'âge : on passe de 25-30% chez les souris de 6 semaines à 15-20% chez les souris de 12 semaines et 10% environ chez les souris de 24 semaines. Or, l'effet du champ magnétique est observé surtout à 12 semaines, quand la réponse commence donc à décroître.

Ceci est en accord avec la tendance observée par les autres équipes travaillant dans ce domaine de recherche, soit un effet plus important des champs magnétiques quand le système biologique ciblé n'est pas à son maximum.

L'étude de l'effet du champ magnétique faite par nos collègues à Limoges montre une augmentation significative au dessus d'un certain seuil d'intensité du champ : 30 mT, avec un plateau à 120 mT (voir de Seze et al., 1993).

Des expériences complémentaires sont nécessaires pour savoir s'il s'agit bien d'une augmentation du nombre de cellules NK. On peut envisager en cytométrie de flux d'utiliser un anticorps, dirigé contre des antigènes spécifiques des cellules NK, qui nous permettrait de quantifier et d'approfondir le mécanisme de l'effet observé.

D'autres travaux tirés de la littérature font état d'effets sur ces cellules. Malter et collaborateurs (1987) montrent une augmentation de l'activité NK des cellules hépatiques chez le rat, d'un facteur 2, après exposition pendant 8 jours (1 heure/jour) à des champs magnétiques pulsés à 2 et 50 Hz et d'intensité de 13 et 26 mT.

Mc Lean et collaborateurs (1991) s'intéressent également à l'activité NK splénique et périphérique. Dans leur étude, ils n'observent pas d'effet du champ sinusoidal à 60 Hz 2 mT sur cette activité. Néanmoins ils observent une diminution de l'activité NK due aux champs quand un initiateur de tumeur chimique, le dimethyl-benzanthracène (DMBA), a été ajouté.

Tremblay et collaborateurs (1993) étudient aussi l'activité NK splénique chez le rat après exposition au champ magnétique sinusoidal de 60 Hz : +38% à 200 μ T, +55% à 2000 μ T. Ces augmentations sont du même ordre de grandeur, voire un peu supérieures à nos résultats, mais dans leur cas, les auteurs exposent les animaux beaucoup plus longtemps (20 heures/jour pendant 4-5 semaines). Les auteurs utilisent un dB/dt (c'est à dire un temps de montée du champ) analogue au nôtre, de l'ordre de 1 T/s mais existant pendant chaque alternance à 60 Hz.

B-2) Effets de champs magnétiques *in vitro*

Nous avons montré le ralentissement de la croissance des tumeurs *in vivo*. Nous avons voulu expérimenter s'il s'agissait d'une action directe sur les cellules tumorales par l'étude de leur prolifération en culture *in vitro*.

B-2-1) Etude des effets du champ magnétique intense (180 mT) lors d'une exposition de longue durée

B-2-1-1) Prolifération de lignée tumorale - L'effet du champ magnétique intense a été testé sur la lignée cellulaire HeLa. Nous avons choisi d'exposer les cellules pendant un cycle, de 16 heures. La population étant asynchrone, les différentes phases du cycle cellulaire sont représentées. Dans la mesure où l'on ne savait pas s'il y avait une phase du cycle plus sensible à un éventuel effet du champ, j'ai travaillé avec une population asynchrone où toutes les phases du cycle sont représentées. La synchronisation est possible, mais elle implique l'adjonction de substances chimiques qui perturbent biochimiquement les cellules. Rajouter cette sélection à l'effet des champs nous a semblé trop artificiel.

Nous avons commencé nos expériences dans des boîtes de culture de cellules hermétiques de 25 cm² qui permettaient l'immersion dans le système de régulation thermique à circulation d'eau (voir matériels et méthodes). Cependant ces boîtes avaient l'inconvénient de limiter le nombre d'échantillons pour chaque expérience. Nous avons donc amélioré notre système de régulation thermique afin de pouvoir utiliser les plaques de culture, ce qui a permis d'augmenter le nombre de points, de faire varier la concentration cellulaire de départ et également de tester la prolifération à des moments différents par rapport à l'exposition.

Le système de régulation thermique a été rigoureusement mis au point pour permettre une prolifération identique à celle des cellules résidant dans l'étuve. Des expériences contrôles ont été faites, sans exposition, pour tester la prolifération cellulaire dans notre appareillage : l'article suivant présente les résultats :

Effects of a strong pulsed magnetic field on the proliferation of tumour cells *in vitro*

S. Tuffet, R. de Seze, J.-M. Moreau and B. Veyret

Laboratoire PIOM, ENSCPB, Université Bordeaux I, 33405 Talence Cedex (France)

ABSTRACT

The effect of a pulsed magnetic field was studied on proliferation of HeLa cells in culture. The uniform magnetic field was pulsed (square-wave, 0.8 Hz). Its intensity was 0.18 T at the maximum. HeLa cells were cultured in either flasks or multiple well micro plates with an initial concentration of 10^5 cell/ml. Exposure to the field led to a 15 % decrease of cell proliferation measured 24 h following exposure.

INTRODUCTION

Effects of time-varying magnetic fields have been studied in the last twenty years on a wide variety of biological systems. At the present time, most of the laboratory studies concern the effects produced by ELF fields present in either electricity production and transport (50 or 60 Hz, below 100 μ T), or therapeutic applications (pulsed or sinusoidal, below 1000 Hz and below 100 mT).

Some studies of the effects of static magnetic fields on cell proliferation are reported indicating that fields of sufficiently high intensity can affect the growth of tumour cells. Halpern and Greene [1] found no effect on proliferation of exposed HeLa cells to 0.12 T for up to 7 days. But Mulay and Mulay [2] reported that exposing Sarcoma 37 cells to 0.4 T leads to a complete degeneration of the exposed cells. More recently, Xiao-yun Zhang *et al.* [3] observed a marked decrease of proliferation of HeLa cells exposed to 0.4 or 0.6 T.

Our work deals with the use of square-shaped magnetic fields at low frequencies (a few Hz) and intensities in the range of 0.1 and 0.2 T, of the same order of magnetitude as the one described above. In a preliminary work we have demonstrated *in vivo* that this type of exposure can affect the activity of Natural Killer cells (Bouthet [4] and De Seze [5]) and the growth of chemically-induced or grafted tumours in mice [6].

In this paper, we describe results obtained *in vitro* on the proliferation of HeLa cells under exposure to such pulsed magnetic fields. These experiments were performed as a first step in an attempt to correlate effects on tumours in animals and on tumour cells in culture, using the same exposure conditions.

EXPERIMENTAL

Cells and culture medium

Human cell lines were maintained in standard growth medium (RPMI-1640) containing 10% inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 1% hepes, 1% penicillin/streptomycin (Gibco).

HeLa cells (ATCC CCL² 2.2) in culture are adherent cells. Cells were stripped from the growth surface with a solution of 0.05% trypsin and 0.01% EDTA in Hank's balanced salt solution at 36°C for 2 min. They were then suspended in the growth medium described above and cultured at 36°C. Since our aim was to examine the effects of magnetic field exposure on cell proliferation only, cells were left in the incubator for 4 hours before exposure in order to avoid affecting the attachment and spreading processes. The viability of control and exposed cells was assayed by trypan-blue-dye exclusion.

Experimental conditions

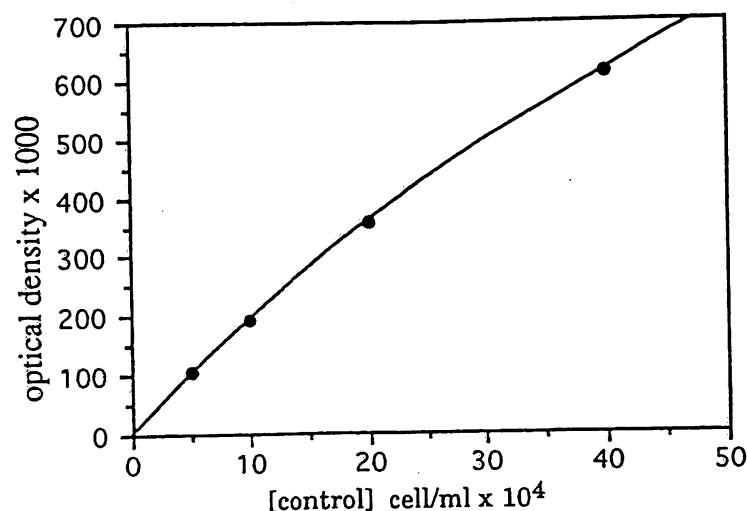
Cells were cultured in sterile 25 cm² flasks or in 24-well micro culture plates (NUNC). They were suspended in culture medium at a density of 10⁵ cells/ml in standard experiments described below (10 ml/flask or 0.8 ml/well). This density was optimized after preliminary experiments were carried out to find the conditions of maximum sensitivity to the magnetic field.

Culture flasks were placed in temperature-controlled water-baths maintained at $36.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ during the 16 hours exposures. One of the water-baths was placed in the magnetic field, the other at a location where stray fields from the coils fell below 10 μT . In some experiments, culture flasks were housed in gas-tight plastic containers placed inside mini-incubators. Temperature control of these incubators was achieved by circulating water from cryo-thermostats (Huber Ministat, temperature stability of $36.00 \pm 0.02^\circ\text{C}$) through an outer wall.

In all experiments with micro culture plates, mini-incubators were used. The plastic gas-tight containers housing the plates were sterile and water saturated. Use of multi-well plates allowed the exposure of various cell samples under the same magnetic field conditions. The mini-incubator containing the exposed plate was placed between the magnetic coils while the control plate was placed inside a second identical plastic container in a standard incubator maintained at 36°C.

Colorimetric MTT (tetrazolium) assay

The standard colorimetric method of Mosmann [7] was used to determine the concentration of cells: MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium



$$R = 100 \times ([\text{exposed}] - [\text{control}]) / ([\text{control}] - [\text{control}]_0)$$

Fig. 1 : Calibration curve of optical density vs. cell concentration.

bromide (Sigma) was dissolved in PBS at 5 mg/ml and sterilized by filtration. Following 20 or 40 h of culture, 1 ml of the MTT solution was added to each flask, or 80 μ l of the MTT solution per 800 μ l medium in each well (i.e. 10% v/v). Flasks or plates were then incubated at 36°C for 8 h and 10 ml of 20 % SDS-0.01 N HCl per flask, or 800 μ l per well were added to dissolve the dark blue crystals (modified method by Tada [8]). The resulting mixture was incubated overnight at 36°C. The absorbances at 570 nm were then measured by spectrophotometry, the reference wavelength being 630 nm. Calibration curves were obtained, giving the optical density at 570 nm as a function of the concentration of viable cells measured using trypan-blue-dye exclusion (Fig 1). The accuracy on each concentration measurement was estimated at 2 % for both flask and plate culture conditions.

Four hours after plating, cells were allowed to grow in the magnetic field or under control conditions for 16 h, then assayed for proliferation, immediately or after 20 h of further incubation (Fig 2). The proliferation was measured by MTT colorimetric assay.

Exposure apparatus

The magnetic field was generated between two air-gap water-cooled coils placed in the Helmholtz position (16 cm inner diameter, 8 cm separation, vertical Fig. 3). The two coils, wired in parallel, had a resistance of 2.7 ohms.

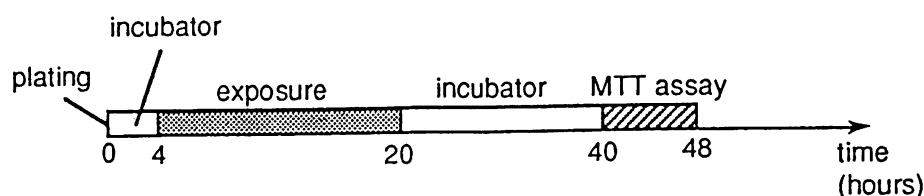


Fig. 2 : Time sequence of cell culture and exposure in a standard experiment.

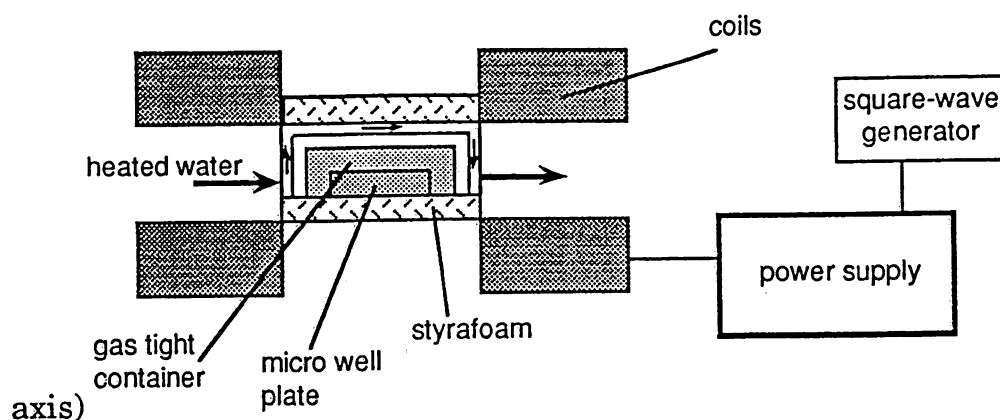


Fig. 3 : Schematic of the exposure set-up.

The intensity of the magnetic field was measured using a Hall-effect gaussmeter (F.W. Bell 4048). In the plane where the samples were positioned, at the center of the coils, the field was uniform within 5% in a range of 6 cm around the coils axis. The maximum intensity that could be reached was 0.18 T corresponding to a 160 A current produced by a solid-state power supply (Sodilec SDR TH 40-250). A square-wave signal was sent to this power supply in order to pulse-modulate its output. The square-wave signal was produced by a standard signal generator (Enertec 4430). Rise-time and fall-time of the magnetic field current were 0.2 s (10–90%). The time-profile of the magnetic field is depicted in Fig. 4. The maximum frequency which could be reached without attenuating the upper level was 1.6 Hz.

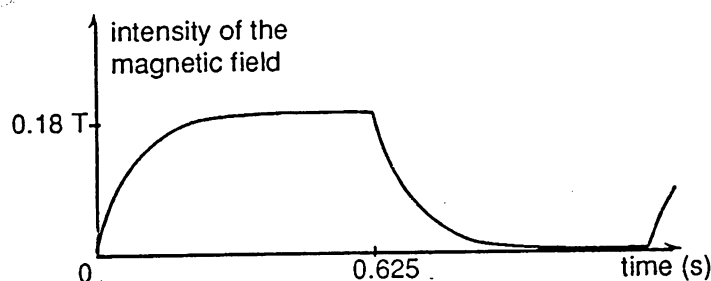


Fig. 4 : Time profile of the magnetic field intensity.

Statistical method

Students "t" test, of common use in many statistical studies is often misused since in order to be applicable two hypotheses must be satisfied :

- the variate being measured must have a normal distribution in the parent population,
- the variances of the two samples being compared are assumed to be equal.

If these hypotheses are not satisfied, then one cannot use the test. Not knowing whether we were in the condition of application of the "t" test we preferred to use the test of Mann and Whitney which is a non-parametric test i.e it is not necessary that the above two hypotheses be true and for which we have a large experience in our studies (9-11).

PROCEDURE

Expression of cell proliferation

The change in the cell concentration was expressed as:

$$R = 100 \times ([\text{exposed}] - [\text{control}]) / ([\text{control}] - [\text{control}]_0)$$

$[\text{control}]_0$ being the initial cell concentration, the others bracketed quantities, the cell concentration after proliferation.

Determination of the most opportune time for the colorimetric test

Proliferation of the cells was first assayed at the end of 16 h exposure, by introducing MTT at the start in order to test the effect of the exposure on the colorimetric assay. No difference was observed between exposed and control populations ($R = 0$). R was also closed to zero when MTT was introduced just after exposure and the colorimetric test performed during the following 8 hours. A kinetic study of the amplitude of the population difference between exposed and control showed that the largest amplitude of the effect was observed 24 h after exposure and that the effect disappeared 72 h after exposure (Fig 2).

Sham-exposures

Control experiments were performed with sham-exposed cultures placed in the exposure apparatus with the field off. Results of nine such independent experiments are given in Table 1. These experiments were done at regular intervals among standard experiments described below. The mean value of the amplitude R of the effect was $-1.1 \pm 5.7 \%$. Using data from the six experiments for which $[\text{control}] \leq 2.8 \times 10^5$ cell/ml (justified below), the mean value of R was $0.8 \pm 5.4 \%$.

TABLE 1

Results of control experiments under standard conditions without exposure
mean $R \pm \text{SD} = -1.1 \pm 5.7$

date	container	thermostat	control cell conc 10^5 cell/ml	sham-exposed cell conc 10^5 cell/ml	R
	WB-MI				
3/91	F	WB	2.82 ± 0.06	2.92 ± 0.06	5
6/91	F	WB	3.12 ± 0.06	3.11 ± 0.06	-4
9/91	F	WB	3.40 ± 0.07	3.27 ± 0.07	-5
10/91	F	WB	2.62 ± 0.05	2.60 ± 0.05	-1
10/91	F	WB	2.75 ± 0.06	2.70 ± 0.05	-3
11/91	F	WB	3.40 ± 0.07	3.25 ± 0.07	-6
11/91	P	MI	2.10 ± 0.02	2.15 ± 0.04	4
2/92	P	MI	2.12 ± 0.02	2.20 ± 0.02	7
2/92	P	MI	2.07 ± 0.02	1.99 ± 0.02	-7

N : numbers in the first column refer to a chronological order; F: flask; P: micro culture plate; WB: water-bath; MI: mini-incubator; $R = 100 \times ([\text{sham-exposed}] - [\text{control}]) / ([\text{control}] - [\text{control}]_0)$

Effect of temperature on cell cultures

In all of the standard experiments, cells were exposed at a constant temperature of 36°C in either water-baths or mini-incubators. In view of the importance of the temperature stability for proper cell cultures, the effect of small variations of temperature on the result of sham-exposures was assessed. The temperature of the sham-exposed cells was varied between 35 and 38°C while that of the controls was kept at 36°C. An increase of temperature leads to an increase in cell proliferation as shown in figure 5.

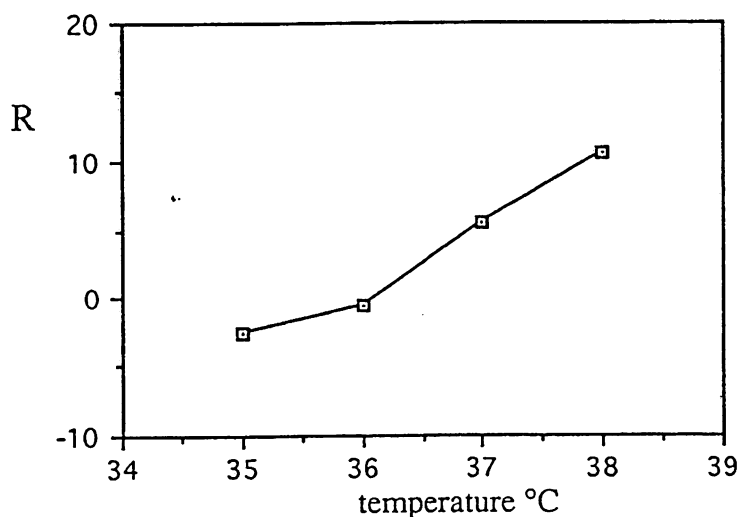


Fig. 5 : Effect of temperature variations on sham-exposed cultures: average of the results of two experiments at each temperature.

Standard experiments

In view of the preliminary results, standard conditions were chosen for a series of experiments to assess the effects of pulsed magnetic fields on the proliferation of HeLa cells: -the initial concentration of both exposed and control cells ($[control]_0$) was 1×10^5 cell/ml,

-cells were exposed for 16 hours from 18:00 to 10:00 next morning,

-the colorimetric assay was started 20 hours later to measure the concentration of cell (Fig.1),

-the frequency of pulses was 0.8 Hz, in the middle range of the apparatus, and the intensity of the field was 0.18 T.

TABLE 2
Results of standard experiments

date	container WB-MI	thermostat cell conc.	control cell conc. 10 ⁵ cell/ml	exposed <i>R</i> 10 ⁵ cell/ml	
3/91	F	WB	2.80±0.06	2.30±0.05	-28
4/91	F	WB	2.20±0.05	2.00±0.04	-17
5/91	F	WB	2.52±0.05	2.25±0.05	-18
5/91	F	WB	3.35±0.07	3.00±0.06	-15
6/91	F	WB	3.00±0.06	2.77±0.06	-12
6/91	F	WB	2.97±0.06	2.77±0.06	-10
7/91	F	WB	3.77±0.08	3.77±0.08	0
7/91	F	WB	3.85±0.08	3.85±0.08	0
9/91	P	MI	2.60±0.05	2.37±0.05	-14
9/91	F	MI	2.92±0.06	2.90±0.06	-1
9/91	P	MI	2.22±0.04	2.30±0.05	-6
10/91	P	MI	3.35±0.07	3.40±0.07	2
10/91	P	MI	2.60±0.05	2.22±0.04	-24
11/91	F	MI	2.05±0.04	1.87±0.04	-17
11/91	P	MI	2.37±0.05	2.42±0.05	4
11/91	P	MI	2.87±0.06	2.87±0.06	0
11/91	P	MI	2.20±0.04	1.92±0.04	-23
11/91	P	MI	2.50±0.05	2.05±0.04	-30
11/91	P	MI	2.72±0.06	2.40±0.05	-18
11/91	P	MI	2.02±0.04	1.92±0.04	-10
12/91	P	MI	2.00±0.04	1.87±0.04	-13
12/91	P	MI	1.87±0.04	1.72±0.04	-17
12/91	P	MI	2.70±0.06	2.30±0.04	-23
12/91	P	MI	1.92±0.04	1.85±0.04	-8
12/91	P	MI	2.32±0.05	2.02±0.04	-23

N : numbers in the first column refer to a chronological order; F: flask; P: micro culture plate;

WB: water-bath; MI: mini-incubator; $R = 100 \times ([\text{exposed}] - [\text{control}]) / ([\text{control}] - [\text{control}]_0)$

RESULTS

In 5% of the experiments and for some uncontrolled reasons, there was no proliferation of either control or exposed cells (data not included in Table 2). In these cases, there was no difference between exposed and control cell concentrations after exposure.

In standard experiments in which cells did normally multiply, exposure to the magnetic field led to a decrease in proliferation (Table 2). The average value of R was -13 % (N.S., 25 experiments). The large spread in the values of [control] indicates that the status of the cells varied greatly between experiments. In order to consider more homogeneous populations, values of [control] smaller than the middle of the concentration range (2.87×10^5 cell/ml) were selected and the average of R thus became equal to -15 %

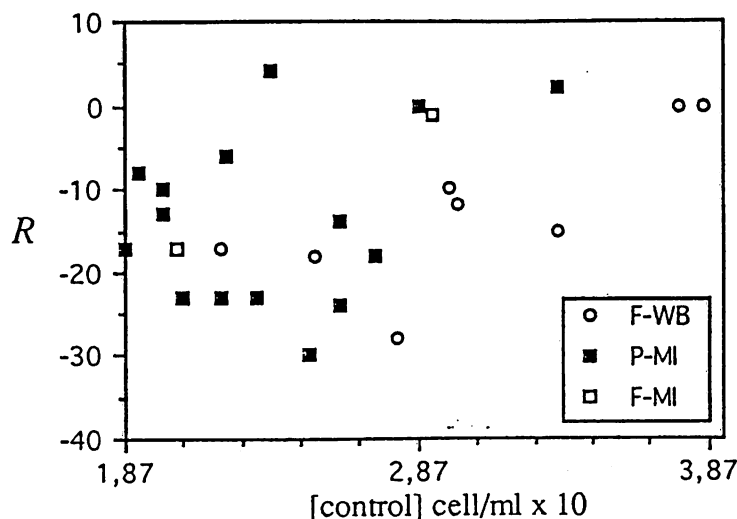


Fig. 6 : Amplitude R of the effect as a function of $[\text{control}]$ and of the nature of the container and thermostat. F: flask; P: micro culture plate; WB: water-bath; MI: mini-incubator; $R = 100 \times ([\text{exposed}] - [\text{control}]) / ([\text{control}] - [\text{control}]_0)$

($P < 0.05$, Mann-Whitney, 17 experiments), indicating that the large rates of proliferation correspond to weaker effects of the fields (average value of R for the 8 rejected experiments = -4.5% , N.S.) (Fig 6).

Dependence on initial cell concentration

Since the rate of proliferation depends upon the initial concentration, experiments were performed for different values of $[\text{control}]_0$. Results of these experiments are given in Fig. 7 which shows that indeed the amplitude of the effect is large for values of $[\text{control}]_0$ above 0.75×10^5 cell/ml.

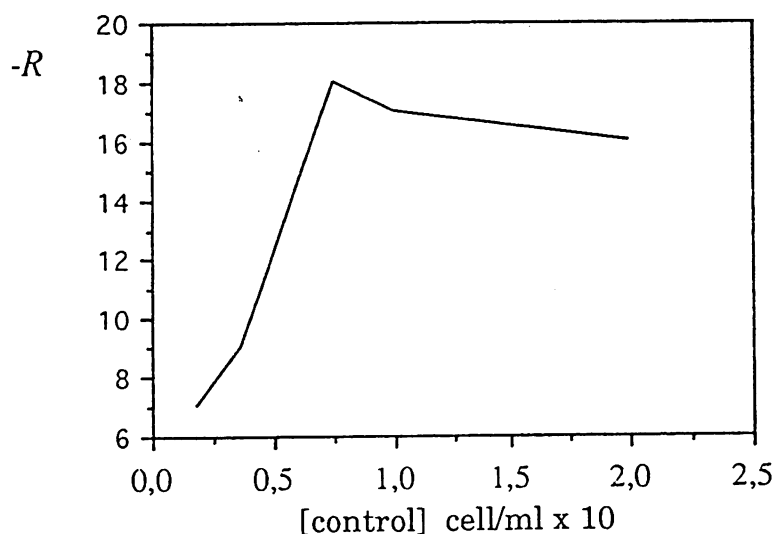


Fig. 7 : Amplitude R of the effect of the field vs $[\text{control}]_0$. $R = 100 \times ([\text{exposed}] - [\text{control}]) / ([\text{control}] - [\text{control}]_0)$

DISCUSSION

Proliferation studies using HeLa cells are not facile because of the large variability in rate of growth from one experiment to another. Moreover, in any given experiment it is difficult to affect the rate of growth of the cells. Indeed these cells are not very sensitive to the composition of the culture medium or the state of confluence. They are not very sensitive either to changes in temperature, and it should be noted that any failure of the temperature control of our apparatus would have led to an increase of temperature of the cell cultures which would have caused an increase in cell proliferation, the opposite of the effect reported here.

Since the effect of the pulsed magnetic field does not seem to depend upon the size of the culture container, it is likely that ionic currents produced by the time-varying magnetic fields are not the main cause behind the effect. However, according to the literature quoted in the introduction, static magnetic fields with intensities below 0.4 T do not seem to elicit the type of change in HeLa proliferation that is described in this paper using pulsed fields. Further experiments will be needed using static and time-varying fields to resolve this issue and increase the amplitude of the effect.

In our experimental condition there is an optimum time, at around 24 h post exposure, for the observation of the effect following a 16 h exposure. This would indicate that only a small proportion of the cell population in a given phase of the cell cycle is affected by the field. The effect can then be observed only after non-affected cells had time to multiply in the incubator.

It would be more interesting to determine the effect of longer exposures. Preliminary experiments in this direction (40 hour exposure) seems to show that the effect is indeed cumulative, but further work is needed to confirm this result.

It is noteworthy that when cells are in a survival state, there is no effect of the field. The question of whether the field affects a particular phase of the cell cycle must be addressed and we shall use the flow-cytometry technique on non-adherent U937 cells for that purpose.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J. Jousset Dubien and B. Lesourd for helpful discussion, W. Ellison for his help in the statistical treatment of the data, and M. Le Diraison for her literature search.

REFERENCES

- 1 M.H. Halpern and A.E. Greene, *Nature*, 4933 (1964) 717.
- 2 I.L. Mulay and L.N. Mulay, *Nature*, 4780 (1961) 1019.
- 3 Xiao-yun Zhang and Xiao-e Zhang, *Chinese Science Bulletin* 36, (1991) 414.
- 4 C. Bouthet, (1991) PhD dissertation, Clermond-Ferrand, France.
- 5 R. de Seze, (1991) PhD dissertation, Bordeaux, France.
- 6 results to be published (1992).
- 7 T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1983) 55.
- 8 H. Tada, *Journal of Immunological Methods*, 93 (1986) 157.
- 9 W. Ellison, M. Minard, *l'information psychiatrique* n°6 juin (1991)
- 10 S. Schor, I. Karten, *JAMA* vol. 195, (1966), 1123.
- 11 D. Altman et al. *British Medical journal*, vol 286, (1983), 1489

Expérience A (0.8 Hz)	témoins ± D.S.	exposées ± D.S	temps de culture (heures)	(exp-te) / te
1 : Incorporation de Thymidine	48300±5000	48600±7000	24	0% NS
2 : Test colorimétrique MTT	2,5 10 ⁵ ±0,2	2,7 10 ⁵ ±0,2	48	+8% NS
3 : Incorporation de Thymidine	89000±12000	83000±10000	48	-7% NS

Tableau 19a : influence de la composante électrique induite par le champ magnétique de 0.8 Hz, 180 mT sur la prolifération des cellules HeLa; 8 points par test.

Expérience B (5 Hz)	témoins ± D.S	exposées ± D.S	temps de culture (heures)	(exp-te) / te
1 : Test MTT	2,2 10 ⁵ ±0,4	2,4 10 ⁵ ±0,3	24	+4% NS
2 : Test MTT	4,3 10 ⁵ ±0,5	4,5 10 ⁵ ±0,5	48	+5% NS
3 : Incorporation de Thymidine	97000±17000	93000±19000	48	-5% NS

Tableau 19b influence de la composante électrique induite par le champ magnétique de 5 Hz, 180 mT sur la prolifération des cellules HeLa; 8 points par test

Expérience C (60 Hz)	Témoins ± D.S	exposées ± D.S	temps de culture (heures)	(exp-te) / te
1 : Test MTT	2,2 10 ⁵ ±0,3	2,3 10 ⁵ ±0,4	24	+4% NS
2 : Test MTT	5,6 10 ⁵ ±0,4	5,4 10 ⁵ ±0,5	48	-4% NS
3 : Test MTT	6,8 10 ⁵ ±0,4	5,8 10 ⁵ ±0,6	48	-14% NS
4: Test MTT	4,6 10 ⁵ ±0,3	4,5 10 ⁵ ±0,é	48	-2% NS
5 : Test MTT	5 10 ⁵ ±0,6	5,2 10 ⁵ ±0,2	48	+4% NS
6: Incorporation de Thymidine	91000±15000	88000±14000	48	-3% NS

Tableau 19c influence de la composante électrique induite par le champ magnétique sinusoïdal à 60 HZ; 8 points par test.

La prolifération des cellules au cours des différentes expérimentations varie beaucoup lorsque l'on travaille avec des lignées cellulaires. L'effet du ralentissement de la prolifération des cellules exposées à ce champ, varie avec la vitesse de la prolifération. Si cette dernière est rapide, il n'y a pas d'effet du champ, de même que lorsqu'il y a peu ou pas de prolifération. L'effet se trouve donc dans un intervalle de concentration cellulaire qui correspond à une certaine capacité proliférative des cellules. Ceci est en accord avec les effets modulateurs des champs observés, en général.

D'autres auteurs ont utilisé les cellules HeLa pour tester la prolifération cellulaire sous champ magnétique. Zhang et Zhang (1991) observent une diminution des cellules exposées aux champs constants de 0,4 et 0,6 T. Récemment Yamaguchi et collaborateurs (1993) n'observent aucun effet sur l'influx de Rb^+ (analogue de K^+) dans les cellules HeLa, avec un champ constant de 0,5-1,7 T. Par contre, avec un champ intermittent de 0,07-1,7 T, ils observent une inhibition de cet influx. Ils émettent l'hypothèse que cette inhibition serait due à une augmentation des charges négatives à la surface des cellules.

Nous sommes partis de l'hypothèse que le champ électrique induit par le champ magnétique n'agirait que peu ou pas dans l'effet observé. Nous n'avons donc pas hésité à changer le système de régulation de température afin de pouvoir utiliser des plaques de culture à la place des boîtes. Le diamètre des puits des plaques de culture étant beaucoup plus petit, en comparaison avec celui des boîtes, les courants électriques induits sont plus faibles pour les puits. Les résultats ne présentent pas de différences apparentes entre les puits et les boîtes de culture.

Au cours d'un séjour dans un laboratoire américain (laboratoire dirigé par Stephen F. Cleary Physiology department, Medical college of Virginia, Richmond), il m'a été possible de tester l'effet de la composante électrique ($0,2 \mu A/cm^2$ dans des impulsions bipolaires de 0,1 s à 0,8 Hz) sur la prolifération des cellules HeLa. Ce laboratoire étant agréé pour l'utilisation des radioéléments, j'ai utilisé deux tests pour quantifier la prolifération : l'incorporation de thymidine tritiée et le test colorimétrique MTT. Les résultats sont résumés dans le Tableau 19a : il semble qu'il n'y ait pas d'effet de la composante électrique que ce soit tout de suite après l'exposition, 24 heures après l'exposition, ou à 48 heures de culture. J'ai testé dans les mêmes conditions une autre fréquence du champ d'exposition : 5 Hz, (Tableau 19b) il n'existe pas non plus d'effet statistiquement significatif.

Expérience D	concentration cellulaire de départ/ml T=0	concentraion cellulaire chez les témoins/ml après le temps de culture	concentration cellulaire chez exposées/ml après le temps de culture	(exp-te) / te
24	$5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5 \pm 0,05$	$1 \cdot 10^5 \pm 0,07$	- 9% NS
48	$5 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^5 \pm 0,09$	$2,9 \cdot 10^5 \pm 0,1$	-25% $p = 0$
24	$5 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^5 \pm 0,1$	$1,3 \cdot 10^5 \pm 0,09$	-7% NS
48	$5 \cdot 10^4$	$4,06 \cdot 10^5 \pm 0,15$	$3,44 \cdot 10^5 \pm 0,12$	-17% $p = 0$
48	$1 \cdot 10^5$	$5,76 \cdot 10^5 \pm 0,2$	$5,24 \cdot 10^5 \pm 0,15$	-11% $p < 0,01$
24	$1 \cdot 10^5$	$3,25 \cdot 10^5 \pm 0,05$	$3,3 \cdot 10^5 \pm 0,08$	0 NS
48	$1 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^5 \pm 0,21$	$9 \cdot 10^5 \pm 0,1$	-5% NS

Tableau 19d : les expériences sont montrées dans l'ordre chronologique. Dans tous les cas les mélanocytes B16 sont exposées pendant 16 heures. la prolifération est quantifiée par le test MTT et le résultat est converti en concentration de cellules par comparaison avec une courbe étalon. Il y a 10 puits par conditions. Test statistique Mann et Whitney.

Il faut toutefois rester prudent, car le nombre d'expériences est faible. De plus, bien qu'il s'agisse de la même lignée HeLa, le nombre de passages des cellules étant différent de celui des cellules utilisées à Bordeaux, on ne peut pas être véritablement sûr que l'on est en présence de cellules ayant les mêmes caractéristiques. Mon laboratoire d'accueil aux USA était intéressé par l'effet du champ électrique de l'environnement, j'ai donc testé dans les mêmes conditions le champ sinusoïdal à 60 Hz avec une densité de courant de 100 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Tableau 19c); il semble se produire une légère diminution qui reste cependant non significative.

Quelques expériences ont été effectuées à Bordeaux avec le même champ magnétique (0,8 Hz, 180 mT), sur une lignée différente : les mélanocytes B16 prélevés des tumeurs portées par les souris C57 Bl/6. Le Tableau 19d montre les résultats obtenus. On n'observe très peu d'effet immédiatement après l'exposition (en dessous de 10%). Par contre, 24 heures après l'exposition, soit 48 heures de culture, il y a une diminution de la prolifération plus importante (soit 15% en moyenne), de l'ordre de celle observée pour les cellules Hela. Au cours de ces expériences, la prolifération des cellules s'accélère, une accélération probablement due au nombre de passages qui augmente. Quand les cellules prolifèrent très vite l'effet du champ magnétique diminue. Il faut remarquer que lorsque les cellules proviennent de tumeurs fraîches, la culture peut être contaminée par des fibroblastes; ces derniers peuvent s'adapter aux conditions de culture *in vitro* et aux cours de passages successifs, devenir majoritaires par rapport aux mélanocytes. Cette éventuelle présence de cellules normales peut être source d'artéfacts, donc il faut rester prudent; cependant nous avons observé le même type d'effet avec la lignée des mélanocytes B16 qu'avec la lignée des cellules HeLa, quand les cellules se multiplient très vite, soit un cycle tous les 5-6 heures au lieu d'un cycle toutes les 16 heures habituellement, l'effet du champ disparaît. Cette inhibition de la prolifération dans les divisions qui suivent l'exposition, comparé aux effets plus mineurs immédiatement après l'exposition nous amène à poser les questions suivantes :

Faut-il un certain nombre de divisions pour observer l'effet ? Ou alors, l'arrêt du champ serait-il essentiel pour observer l'effet ?

L'effet étant observable uniquement dans une vitesse de prolifération cellulaire, il semble peu probable qu'il faille un certain nombre de divisions pour l'observer. Nous n'avons pas pu tester la deuxième hypothèse.

Des auteurs se sont intéressés à des effets de champs intermittents sur les cellules HeLa. Les japonais (Yamaguchi et al., 1993) observent une inhibition de l'influx de K^+ sur les cellules HeLa, ils suggèrent que cela serait dû à une augmentation des charges négatives à la surface de ces cellules. Smith et ses collaborateurs (1991) montrent eux aussi une augmentation des charges négatives à la surface de la lignée tumorale U937 suite à l'exposition d'un champ magnétique pulsé de 0,6 mT.

Ces observations seraient-elles faites uniquement dans le cas de lignées tumorales ? ou c'est un effet plus générale sur toutes les cellules ?

Après avoir observé une action du champ magnétique que nous étudions sur les cellules tumorales sous certaines conditions de prolifération, nous avons voulu étudier l'effet de ce champ sur les cellules du système immunitaire afin de savoir si ces effets étaient dépendants du type de cellules exposées.

B-2-1-2) Etude des effets sur les lymphocytes - L'effet du même champ magnétique, soit 180 mT a été étudié sur des cellules normales. Le choix s'est porté sur les cellules du système immunitaire : les lymphocytes spléniques des souris C57BL/6. Ces cellules de la rate, constituées de différentes sous-populations de lymphocytes, sont à 90% au repos, et sont donc activables en présence de substances mitogènes. Nous avons utilisé le mitogène le plus courant : la Concanavaline A (ConA). L'action de ce mitogène est différente selon qu'il s'agit des lymphocytes T ou des lymphocytes B. En effet, la Con A entraîne les lymphocytes T dans des processus d'activation et aboutit à la division, donc à une prolifération de ces cellules. Par contre, pour les lymphocytes B, la ConA n'entraîne pas de prolifération bien qu'elle entraîne ces cellules dans des processus d'activation (Hawrylowicz 1984). En fait, la Con A conduit les lymphocytes B dans un état transitoire entre l'état de repos (G_0) et la première étape d'activation (G_1).

Effet sur l'activation - Lorsque l'on expose les lymphocytes spléniques, juste après avoir ajouté la ConA, pendant 24 heures, on peut observer l'effet sur les processus d'activation. Nous avons choisi cette durée car elle correspond à la durée du cycle des lymphocytes.

Le test MTT permet de savoir si l'activation est plus ou moins importante. En effet la transformation en formazan se fait par des enzymes deshydrogénases mitochondriales qui reflètent le degré d'activation cellulaire (voir matériels et méthodes pour les détails de ce test).

La variation de la concentration en mitogène (ConA) permet de moduler l'activation. On a alors une plus grande probabilité de se trouver dans des conditions susceptibles d'être sensibles aux champs. Les figures 21a et 20b montrent, pour chacune des souris, l'activation à différente concentration de ConA. On note qu'à 24 heures, l'activation est maximale à la concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ on travaille donc dans ce cas avec des cellules en hyperactivation; à 1 $\mu\text{g/ml}$, on a une activation plus modérée. Il n'y a aucun effet du champ observé au bout de 24 heures quelque soit le degré d'activation.

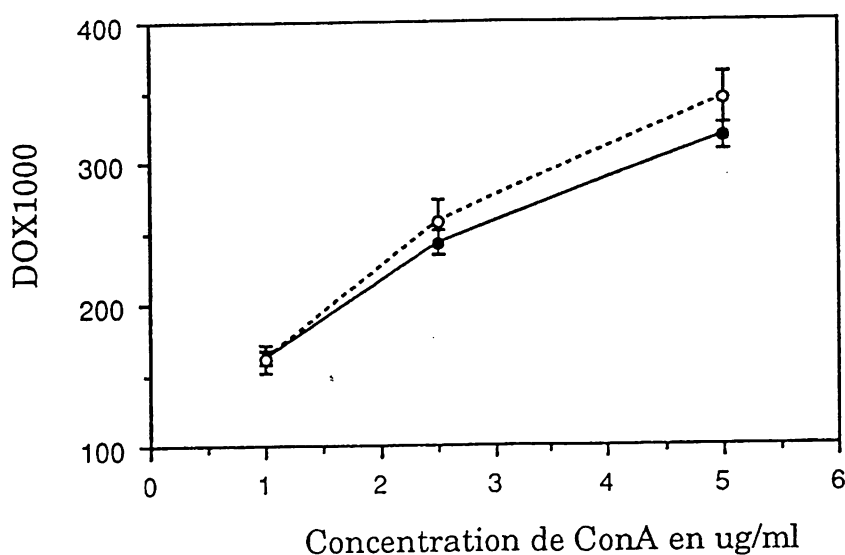


Figure 20a : Traits pointillé : souris C57BL/6 témoins, trait pleins : souris exposées pendant 24 heures (100 mT, 0,8 Hz), test de prolifération MTT aussitôt après. 10 puits par conditions, Souris S1.

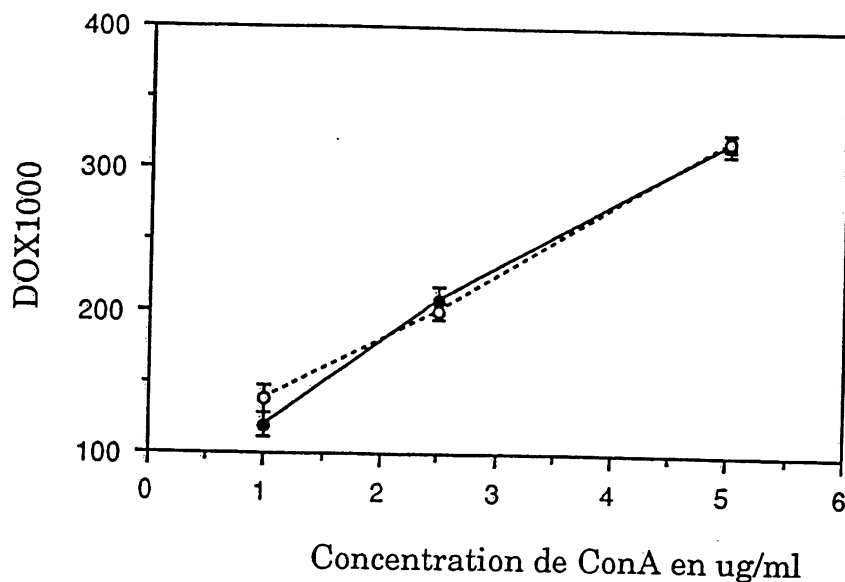


Figure 20b : Même expérience, même condition; Souris C57BL/6 S2

Effets sur la prolifération : Si les cellules sont exposées pendant les 24 premières heures et le test de prolifération effectué 24 heures après, soit à 48 heures de culture, on peut prétendre observer l'effet du champ sur la prolifération des lymphocytes. Les lymphocytes se sont divisés et commencent leur deuxième cycle cellulaire. La transformation du MTT en formazan étant liée au nombre de cellules, on aura ainsi une densité optique représentative du nombre de cellules qui sont en cours de division.

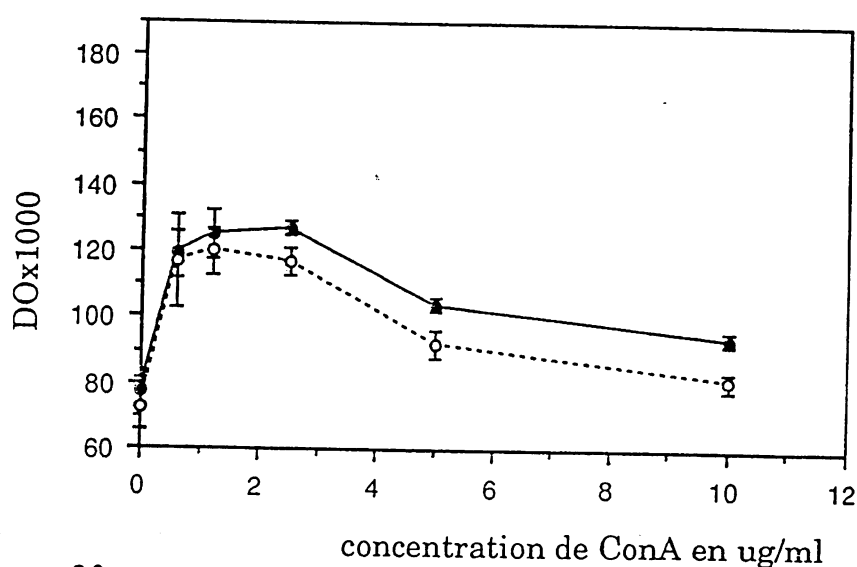


Figure 20c Exposition (100 mT, 0,8 Hz) pendant 24 heures, test MTT 24 heures après soit à 48 heures de culture. Souris C57BL/6 S1

Les figures 20c, 20d, 20e, 20f, 20g, 20h ne montrent aucune différence entre la prolifération des lymphocytes exposés et celle des témoins pour différentes souris à plusieurs concentrations de ConA. On note que la concentration optimale pour la prolifération se situe entre 0,6 et 2,5 $\mu\text{g/ml}$ suivant les animaux, que la concentration suboptimale est à 0,6 $\mu\text{g/ml}$ et la concentration supraoptimale à 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$. Donc, quelque soit la concentration de mitogène, il n'y a aucun effet de ce champ sur la prolifération des lymphocytes.

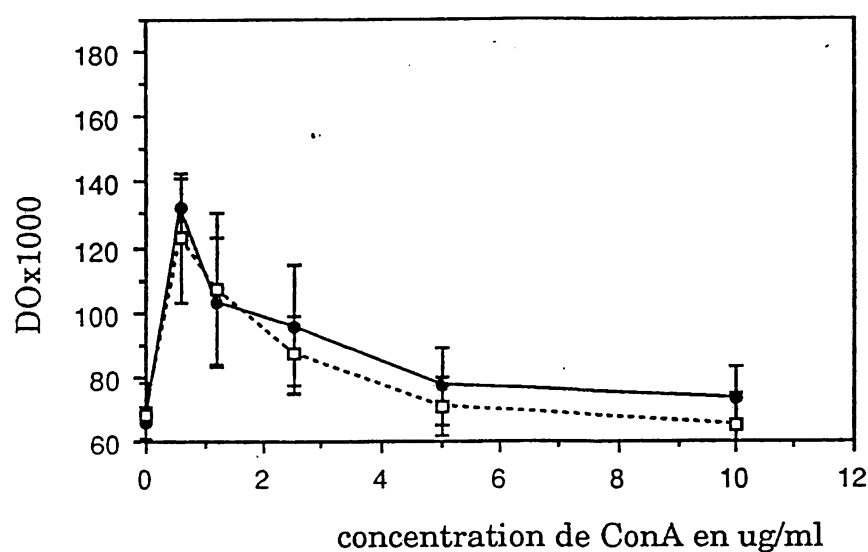


Figure 20d : Mêmes conditions, même expérience, souris sC57BL/6 S2

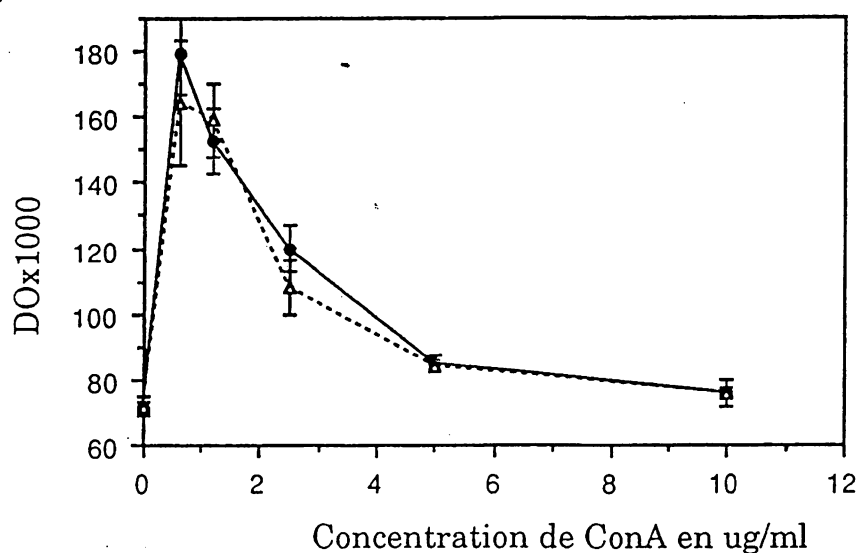


Figure 20e : Mêmes conditions, même expérience, souris C57BL/6 S3

Nouvelle expérience avec des conditions identiques sur 3 souris

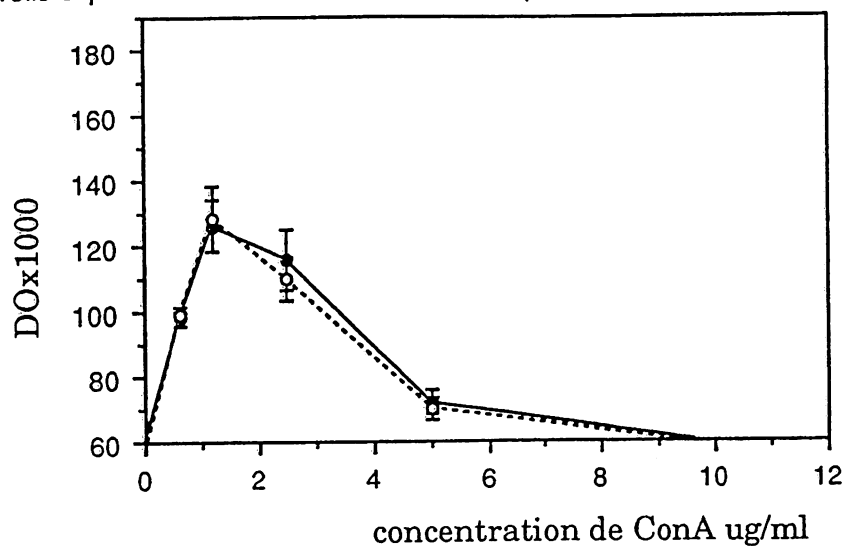


Figure 20f : souris C57BL/6 S4

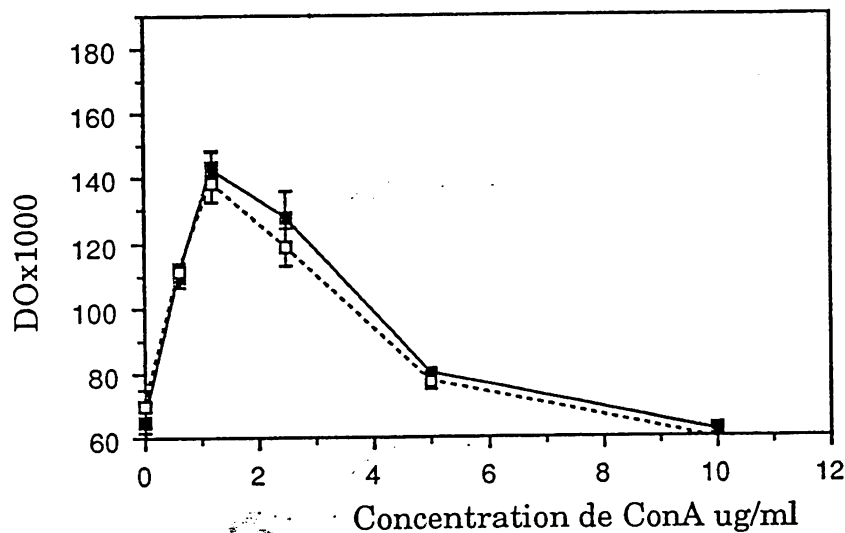


Figure 20g: Souris C57BL/6 S5

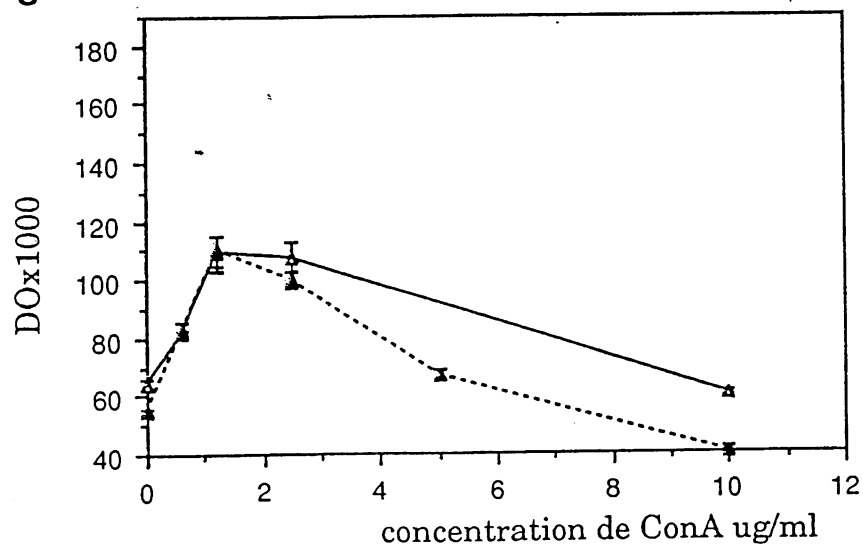


Figure 20h: Souris C57BL/6 S6

B-2-2) Etude des effets du champ magnétique faible de 5mT pendant une exposition courte (30 minutes) sur la réponse calcique

Dans les lymphocytes, comme dans toutes les cellules, le fonctionnement au repos exige le maintien d'une concentration du calcium cytosolique à un niveau très bas ($0,1 \mu\text{M}$) et les cellules dépensent de l'énergie pour maintenir cette concentration. La régulation du niveau de calcium dans le cytoplasme est un élément fondamental pour le maintien des fonctions cellulaires. L'augmentation du calcium intracytoplasmique est utilisée comme signal dans de nombreuses fonctions biologiques.

La fixation de Con A sur les lymphocytes entraîne l'activation de ces derniers qui est suivie par l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. C'est le résultat d'abord d'un relargage de calcium provenant de compartiments internes. Nous n'avons pas eu la possibilité technique d'étudier ce phénomène car il est trop rapide pour que l'on puisse l'étudier en cytométrie de flux. Après cette augmentation de calcium provenant de compartiments internes, suit une augmentation de la concentration de calcium due à l'entrée massive de calcium extracellulaire dans la cellule, et c'est ce processus qui nous a intéressé. L'étude de cette augmentation de calcium sous exposition, fait l'objet de ce chapitre.

Durant l'été 1993 en collaboration avec nos collègues américains (D. Lyle et M. Swicord) du groupe de Bioélectromagnétisme de la FDA (Food and Drug Administration) à Rockville aux USA, nous avons eu l'occasion de développer ce sujet, ayant des compétences complémentaires des nôtres et les équipements nécessaires pour reproduire des expériences identiques. J'ai travaillé dans ce laboratoire durant l'été 1993.

La mise au point du protocole permettant de suivre l'augmentation du calcium des lymphocytes en temps réel par cytométrie en flux, suite à l'addition d'activateur, a été faite dans des conditions rigoureuses. Les premières expériences ont été faites à Rockville. Nos collègues américains utilisant le rat comme modèle, dans ce cadre collaboratif, j'ai également utilisé cet animal comme source de cellules.

Ces expériences ont été ensuite reproduites à Bordeaux durant l'automne 1993.

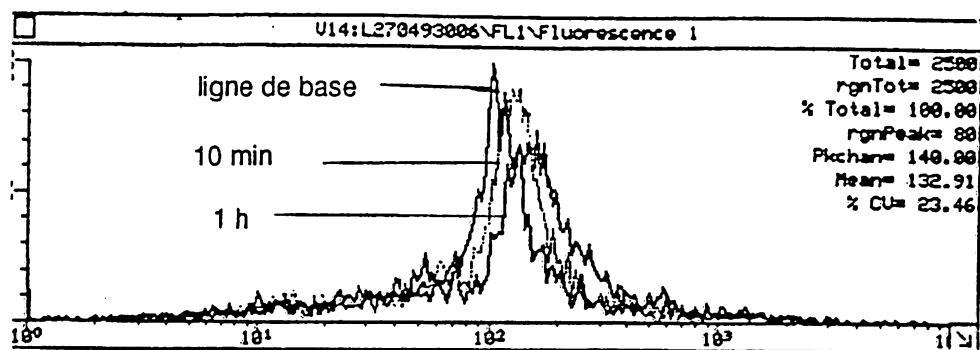


figure 21a: Les lymphocytes chargés en fluo-3 sont transférés d'un bain à 25°C à 37°C : 10 minutes après, il y a déjà un décalage de la courbe vers la droite, 1 heure après ce phénomène est encore plus accentué. Il y a donc un influx de calcium vers l'intérieur de la cellule qui entraîne une augmentation du signal fluo-3.

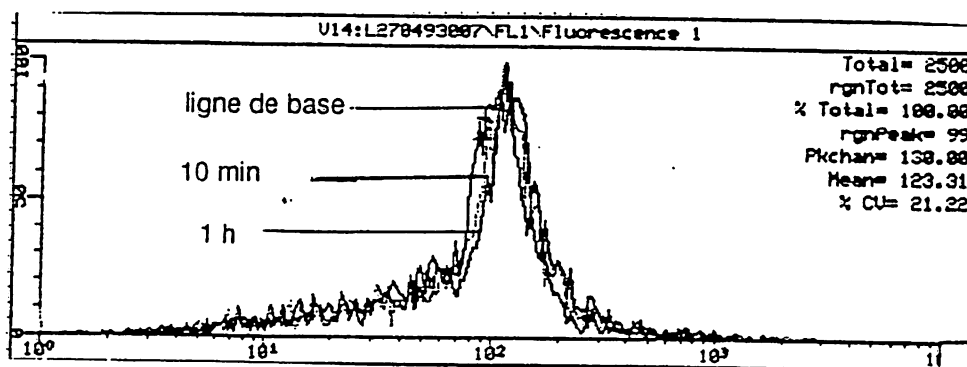


figure 21a' : Cette fois les lymphocytes sont dans un milieu sans calcium, ce phénomène n'est pas retrouvé : donc cette variation dans le signal fluo-3 observé dans la figure 21a dépend bien de l'influx du calcium vers la cellule.

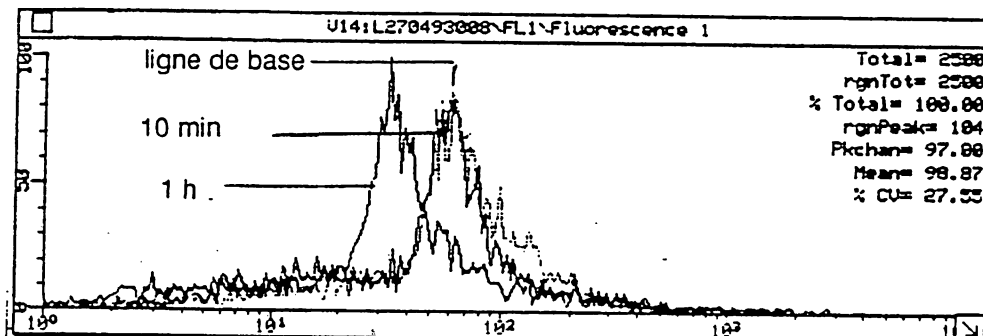


figure 21b : Les lymphocytes chargés en fluo-3 sont transférés d'un bain de 37°C à 25°C: 10 minutes après, il n'y a pas de changement, 1 heure après il y a un décalage de la courbe vers la gauche.. Il y a donc un efflux de calcium vers l'extérieur de la cellule qui entraîne une diminution du signal fluo-3.

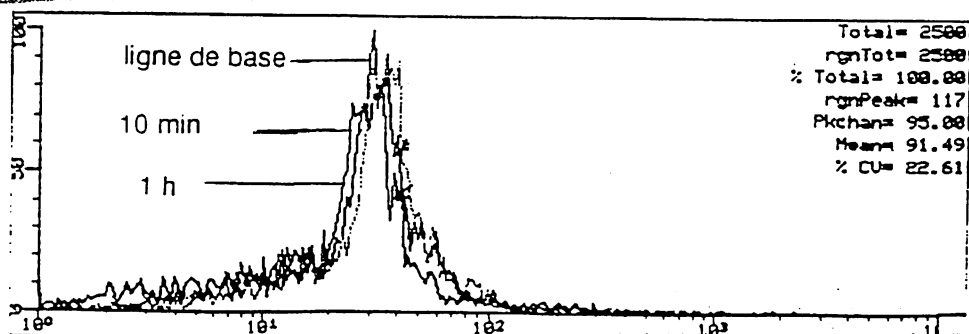


figure 21b' : Cette fois les lymphocytes sont dans un milieu sans calcium, ce phénomène n'est pas retrouvé : donc cette variation dans le signal fluo-3 observé dans la figure 21b dépend bien de l'efflux du calcium.

B-2-2-1) Contrôle de la température- Le contrôle de la température est très important dans ce type d'expériences; les écarts de température modifient les flux calciques des lymphocytes. Le maintien de la température est d'autant plus délicat que l'acquisition des cellules au cytomètre demande quelques secondes. Nous avons préféré travailler à la température physiologique de 37°C malgré les problèmes que posent le maintien des cellules à cette température. La mise au point a montré que des variations de température entraînaient des mouvements de calcium à travers la membrane, ceci indépendamment de l'activation, d'où la nécessité de travailler toujours à 37°C sans variation de température au cours de l'expérience. Le passage de 37°C à 25°C entraîne une sortie de calcium de la cellule, et vice et versa, le passage de 25 à 37°C entraîne une rentrée de calcium qui ne se fait pas si les cellules sont placées dans du milieu sans calcium, voir figures 21a et 21b. A la suite de ces observations, nous avons fait en sorte que les lymphocytes ne subissent aucune fluctuation de température pendant l'expérience, pour éviter les artefacts.

La plupart des expérimentateurs mesurent la concentration de calcium intracellulaire en utilisant le fluo-3 (1 μ M) à 25°C (Vandenberghe et al 1990), pour éviter sûrement les écarts de température et les problèmes de la stabilité du fluo-3 qui au bout d'un moment a tendance à sortir des cellules. Cette stabilité du fluo-3 a été étudiée et il se trouve qu'elle dépend de sa concentration. Après une étude de différentes concentrations de fluo-3, j'ai pu constater qu'à 37°C, le fluo-3 à la concentration de 5 μ M est stable dans le temps. En effet, le taux de cellules qui perd le colorant est de 3% à la concentration de 5 μ M. Ce pourcentage est stable pendant 30 minutes, ensuite la proportion augmente progressivement. Cette concentration initiale est donc satisfaisante car nous avons choisi d'étudier le calcium pendant les premières 30 minutes de l'activation des lymphocytes, moment le plus intéressant pour étudier ces phénomènes de flux calciques.

B-2-2-2) Concentration du mitogène - Le choix de la concentration de l'activateur, ici la ConA, s'est fait en fonction de l'activité d'un lot mais aussi en fonction de la réponse des cellules à ce lot de mitogène. A une concentration élevée de ConA (20 μ g/ml), correspond un pourcentage de cellules activées important, mais à long terme, c'est à dire 24 heures ou 48 heures après, il y a un taux de mortalité cellulaire élevé. Une concentration trop faible de ConA, (1 μ g/ml) correspond un pourcentage de cellules trop faible pour permettre l'analyse en cytométrie.

Le choix s'est donc fait sur les concentrations de 5 $\mu\text{g/ml}$ et parfois 10 $\mu\text{g/ml}$ qui ne produisent pas de toxicité à long terme et qui activent un nombre suffisant de cellules spléniques. Le pourcentage de cellules activées par la ConA en fonction des rats se situe entre 8-18%. J'ai utilisé le même lot de ConA pour les expériences faites à Rockville puis à Bordeaux.

B-2-2-3) Calibration

Après prélèvement des lymphocytes, ceux-ci sont incubées dans du milieu complet pendant au moins une heure à 37°C. Ce temps de repos après prélèvement semble important pour avoir une activation très reproductible des cellules; sans ce temps de repos, les cellules ne répondent pas toujours de façon systématique ou ont une réponse réduite.

Une fois l'acquisition des cellules faite par cytométrie en flux, celles-ci sont analysée à l'aide d'outils informatiques. La concentration de calcium intracellulaire libre est visualisée par sa fixation au fluo-3 en excès (figure 22). Plus il y a de calcium libre plus l'intensité de fluorescence est élevée. La représentation sous forme d'histogramme de fluorescence nous montre la courbe obtenue des lymphocytes avant et après activation par la ConA.

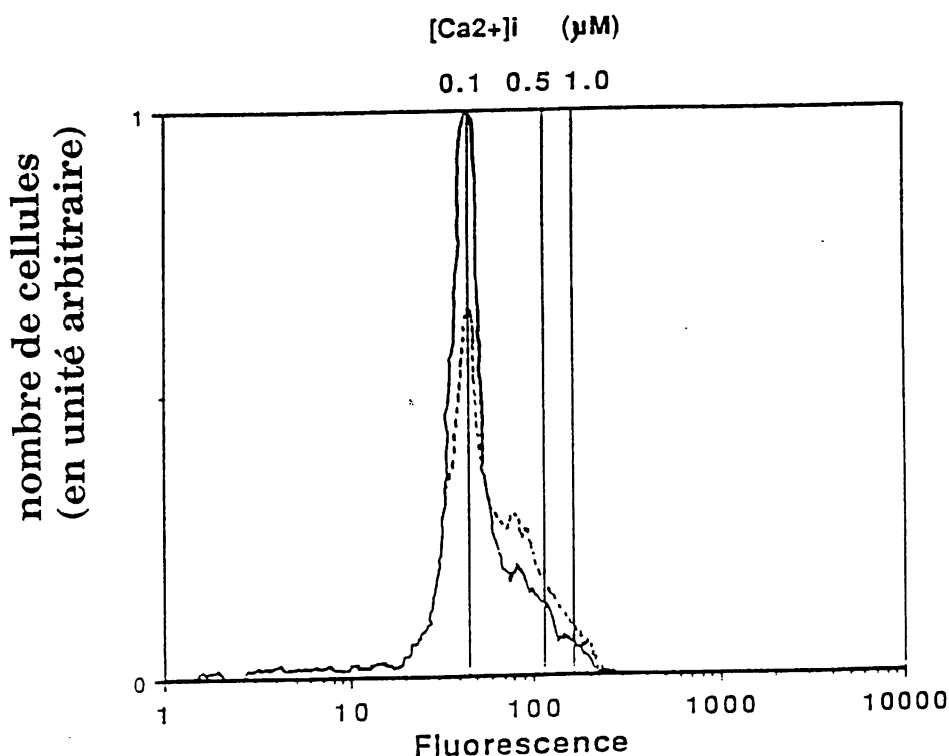


FIGURE 22 : analyse de cytométrie en flux. Les traits pleins sont le nombre de lymphocytes au temps $t=0$ en fonction de l'intensité de fluorescence du fluo-3. Les traits en pointillés représentent les lymphocytes après activation à la ConA au temps de 20 minutes (temps pris comme exemple).

Les lymphocytes incubés avec le fluo-3 permettent de définir la ligne de base : correspondant au temps $t=0$ visualisé sur la figure en traits pleins. Il y a deux populations différentes de lymphocytes : - au premier pic, les lymphocytes sont à une concentration de calcium intracellulaire basse ($0,1 \mu\text{M}$) qui représente les cellules au repos; - au deuxième pic on trouve des lymphocytes ayant une concentration de calcium intracellulaire plus élevée, cellules qui ont été préalablement activées *in vivo*. Cette dernière population augmente après adjonction de ConA (courbe en traits pointillés), c'est à cette population que nous nous intéressons dans cette étude et que nous appelons lymphocytes activés. La soustraction entre les deux courbes : (lymphocytes activés) — (ligne de base) c'est à dire (lymphocytes au temps t) - — (lymphocytes au temps $t=0$). nous indique ainsi le pourcentage de lymphocytes activés par la ConA. Ces pourcentages sont ensuite représentés en fonction du temps.

Les intensités de fluorescence données directement sur les histogrammes sont calibrées suivant la méthode décrite par Hesketh et al (1985). Les lymphocytes sont traités avec un ionophore (la ionomycine). Après quelques minutes, tous les lymphocytes présentent une fluorescence très élevée indiquant une rentrée massive du calcium. Puis l'adjonction de MnCl_2 déplace le calcium du fluo-3, ramenant ainsi la courbe à gauche de l'histogramme. Par cette méthode, il est possible de connaître dans quels intervalles de concentration en calcium nous travaillons. Sur la figure 22, nous avons indiqué les ordres de grandeur de concentration en calcium et il est remarquable de noter qu'après activation à la ConA, la majorité des cellules se situe entre $0,1$ et $0,5 \mu\text{M}$, mais une partie non négligeable présente des concentrations de calcium intracellulaire au dessus de $0,5 \mu\text{M}$ et même au dessus de $1 \mu\text{M}$.

B-2-2-4) Expériences contrôles - Pour être sûr du contrôle de la température, et donc maîtriser les variations du signal calcium de façon non artefactuelle, mais aussi pour connaître la variabilité intrinsèque entre les échantillons, 5 expériences contrôles indépendantes ont été faites, (3 à Rockville et 2 à Bordeaux);

Dans ces expériences contrôles les bobines ne sont pas alimentées. La plus grande différence entre les échantillons dans une même expérience est de 5% : figure 23.

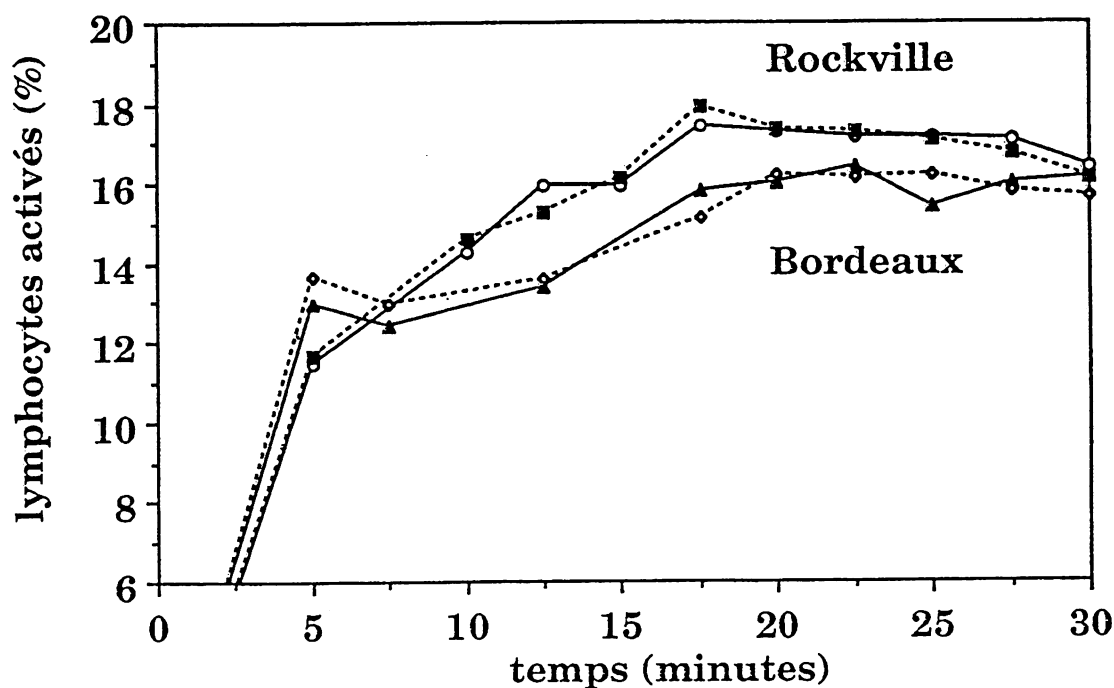


FIGURE 23 : 3 expositions contrôle à Rockville et 2 expériences sham-exposées à Bordeaux.

Globalement les pourcentages de lymphocytes activés sont plus élevés à Rockville qu'à Bordeaux. Est-ce dû au vieillissement du lot de ConA ? ou à la différence dans les lots d'animaux ? Cet écart est conservé lors de toutes les expériences.

B-2-2-5) Analyse statistique

Le nombre d'expériences effectuées dans les mêmes conditions étant faibles, nous avons utilisé le test de Wilcoxon (une queue) pour déterminer les différences significatives pour un temps t entre lymphocytes exposés et sham-exposés. Les résultats sont exprimés dans les figures d'après la notation suivante : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

B-2-2-6) Expériences à 5 mT, 0,8 Hz - Les lymphocytes spléniques des rats âgés de 5 semaines présentent, après exposition, une augmentation globale de la concentration de calcium intracellulaire donc du nombre de lymphocytes activés. La figure 24 montrent les résultats.

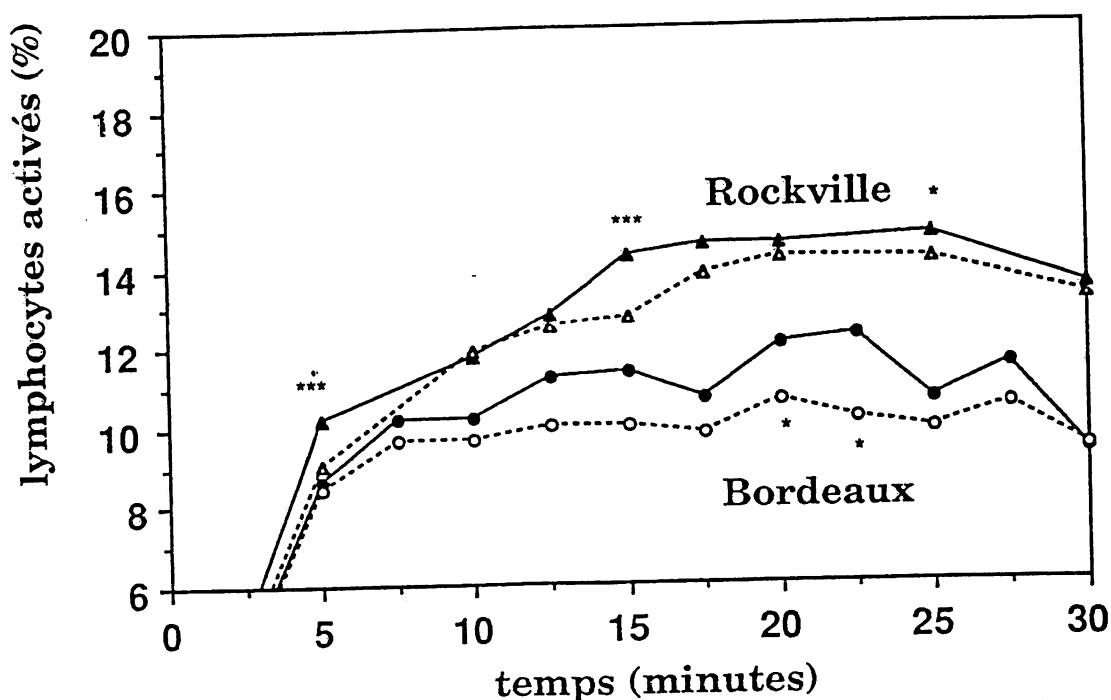


FIGURE 24 : Expériences sous exposition à 5 mT, 0,8 Hz. Les trait pointillés correspondent aux 9 expériences sham-exposées à Rockville et aux 5 expériences sham-exposées à Bordeaux. Les traits pleins correspondent aux échantillons exposés.

Dans la figure 24 est montrée les moyennes pour les 9 expériences faites à Rockville et les 5 expériences faites à Bordeaux. Ces augmentations, dues à l'exposition, sont observées à certains temps qui ne sont pas les mêmes à Rockville et à Bordeaux.

L'analyse statistique ne présente pas une augmentation significative si elle est faite sur l'ensemble de la courbe; cependant au vu des oscillations de calcium dans les lymphocytes activés par la conA (cf B-2-2-12) il nous semble correct de pouvoir comparer les pourcentages de lymphocytes activés pour les sham-exposés et les exposés à chacun des temps. Avec cette nouvelle analyse des points significatifs apparaissent : les points à 5, 15, 25 minutes à Rockville et 20 et 22,5 minutes à Bordeaux.

Analyse des sous-populations : L'observation des différentes sous-populations dans la suspension splénique, telles que les monocytes et les lymphoblastes, montre que ces dernières ont initialement une intensité de fluorescence au fluo-3 forte.

L'addition de ConA ne change rien à cette situation et l'exposition aux champs magnétiques ne semble avoir aucune action non plus sur ces populations. Ceci nous permet de dire que les cellules affectées par les champs appartiennent à des lymphocytes qui sont sûrement au repos chez l'animal.

B-2-2-7) Expériences à 5 mT, 0,8 Hz sans activation par la ConA

Nous avons étudié l'influence de l'effet du champ magnétique sur des cellules sans mitogène. Deux expériences indépendantes ont été faites, les figures 25a et 25b montrent les résultats.

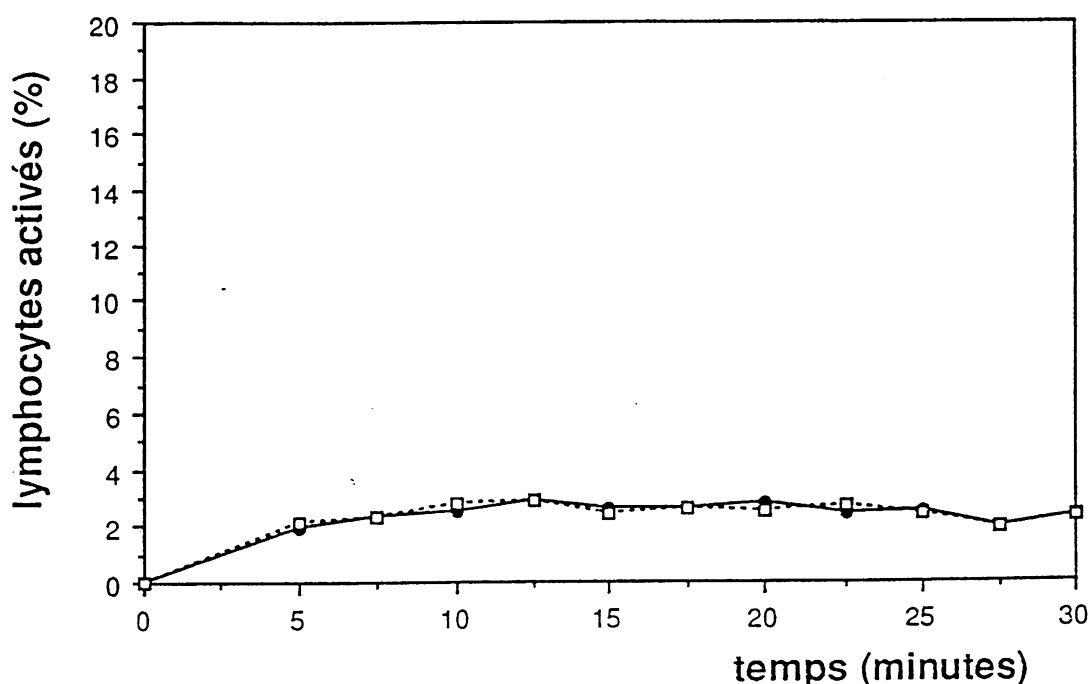


FIGURE 25a : Expérience2 sans mitogène. Les traits pleins représentent les lymphocytes exposés et les pointillés les lymphocytes témoins.

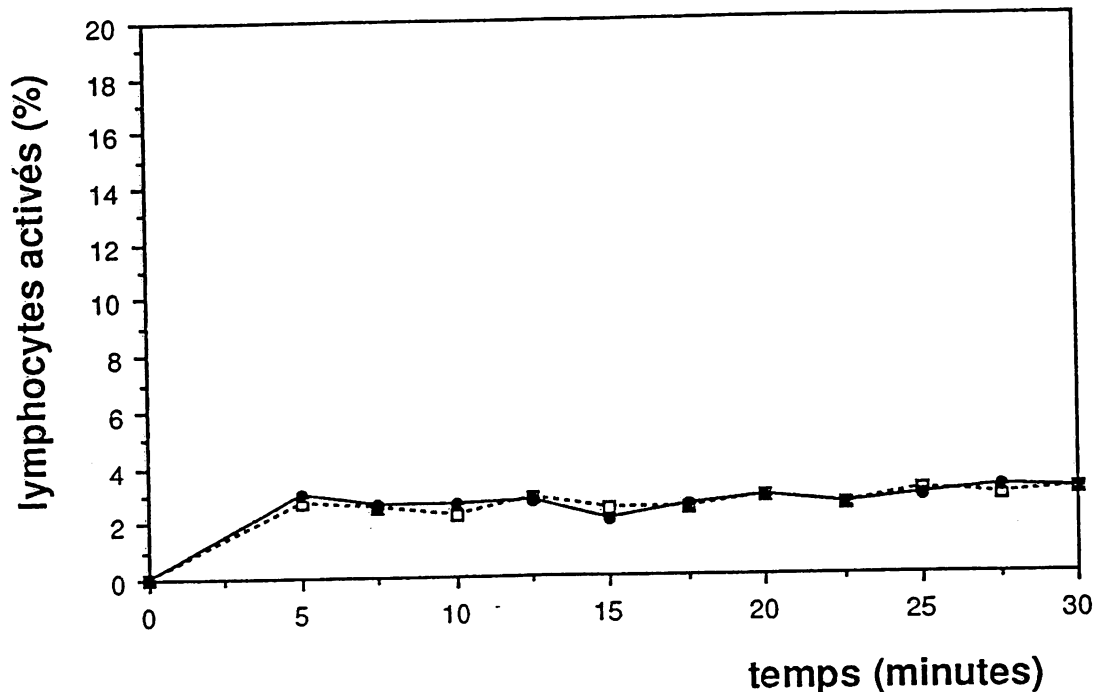


FIGURE 25b : Expérience2 sans mitogène. Les traits pleins représentent les lymphocytes exposés et les pointillés les lymphocytes témoins.

Les courbes entre exposées et témoins sont superposées. Cette très faible activation (3 %) des cellules dans ces conditions est sûrement due aux facteurs qui sont contenus dans le sérum de veau fœtal contenu dans le milieu complet où baignent les cellules. Nous n'avons pas essayé de faire d'autres expériences sans activation car dans la littérature, aucun effet n'a jamais été observé dans ces conditions.

B-2-2-8) Expériences à 5 mT, 16 Hz - Dans une série de 5 expériences faites à Rockville, nous avons fait varier la fréquence à 16 Hz. Les courbes entre exposées et témoins sont superposables, l'effet semble donc dépendant de la fréquence.

B-2-2-9) Expériences à 0,1 mT, 0,8 Hz - Dans une série de 5 expériences faites à Rockville, nous avons fait varier l'intensité à 0,1 mT. Nous n'avons pas observé de différences statistiques à cette intensité. Donc, l'effet semble dépendre également de l'intensité des champs magnétiques.

B-2-2-10) Expériences à 5mT, 0,8 Hz avec une augmentation du champ électrique

Afin d'augmenter dans notre système d'exposition le champ électrique induit par le champ magnétique, nous avons fabriqué un système pour garder les cellules à la périphérie du tube. A l'aide d'agar et d'un tube de 10 ml renversé à l'intérieur du tube de 50 ml, nous avons fabriqué une sorte de colonne annulaire. Dans de telles conditions le champ électrique induit est très augmenté (de l'ordre de 100 %). la figure 25 nous montre les résultats ainsi obtenus.

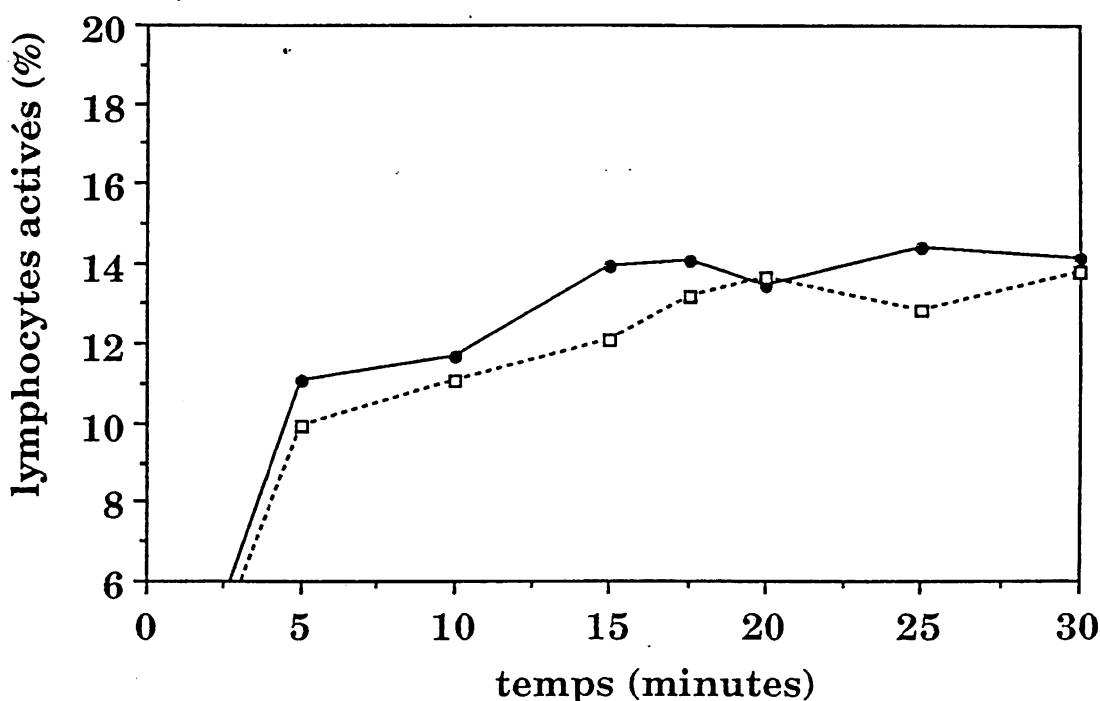


Figure 24 : 5 expériences faite à Rockville avec un champ électrique induit augmenté; les traits pleins représentent les lymphocytes exposés et les pointillés les témoins.

L'amplitude de l'effet observé n'est pas augmenté malgré l'augmentation du champ électrique. les résultats ne sont pas significatifs dans ces expériences.

B-2-2-11) Importance de l'âge des animaux - La ligne de base en intensité de fluorescence varie en fonction de l'âge des animaux. Les rats augmentent considérablement leur poids entre 5 et 10 semaines : les animaux passent d'environ 250 grammes à 400 grammes. La ligne de base en calcium intracellulaire, présentée par l'histogramme de fluorescence, est très différent entre des animaux qui ont quelques semaines d'écart. La quantité de cellules ayant un plus haut signal calcium avant toute activation, est plus importante chez les jeunes animaux. Pendant la période dite de maturation (5-6 semaines), il y a beaucoup de cellules dites "naïves" (en opposition aux cellules mémoires); ces cellules naïves ont une capacité proliférative plus importante, elles sont plus modulables et plus activables, elles ont une perméabilité au calcium plus importante suite à une activation des fonctions membranaires. Ces cellules sont maturées à la suite d'une activation antigénique et le degré d'activation est très important. Tout ceci peut expliquer les différences dans les lignes de bases des animaux de 5-6 semaines par rapport aux animaux de 8-10 semaines, dans les cellules au repos avant toute stimulation.

A Rockville, j'ai utilisé dans 7 expériences des rats entre 10-11 semaines. La figure 26 montrent les résultats obtenus après exposition de ces cellules.

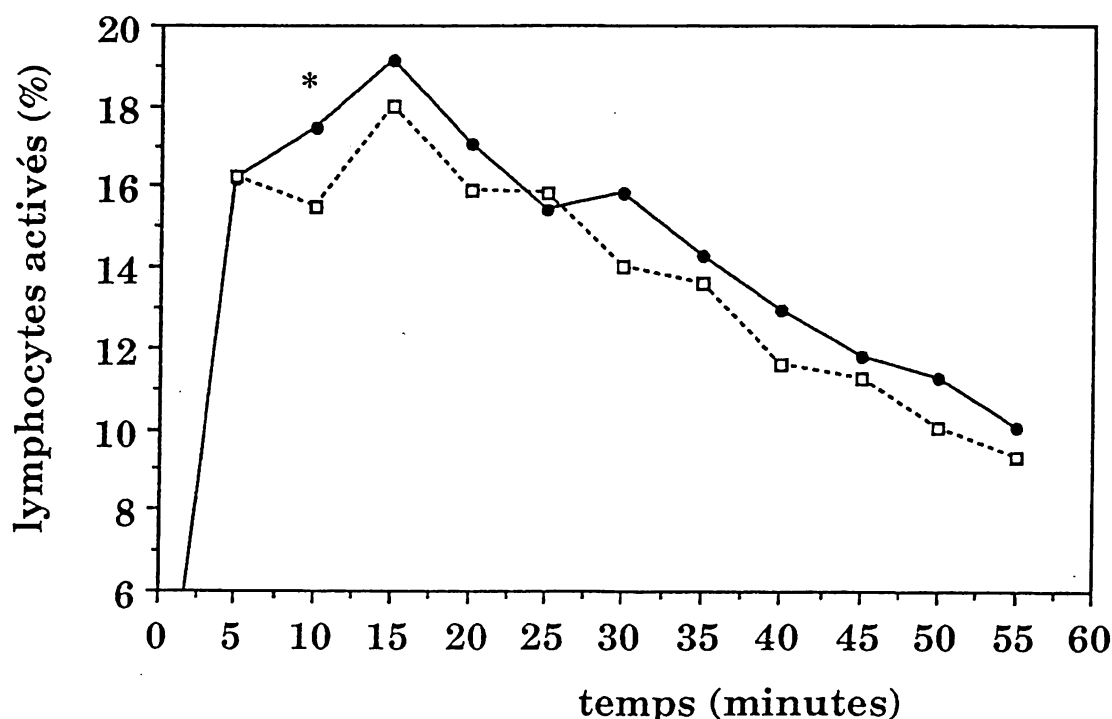


Figure 26 : Expériences à Rockville avec des rats âgés de 10-11 semaines : les traits pleins représentent les lymphocytes exposés et les pointillés les témoins.

Nous avons exposé, dans ces cas, les lymphocytes pendant une heure afin d'observer si l'effet pouvait être reporté. Seul le point à 10 minutes est significatif, alors qu'avec des rats plus jeunes nous n'avons jamais observé un effet à ce temps. Les modifications biologiques liées à ces quelques semaines d'écart peuvent être la cause des variations observées dans les effets du champ magnétique.

B-2-2-12) Les oscillations de calcium - Certains lymphocytes montrent, lors de stimulations, des oscillations de calcium. Ce phénomène a été mis en évidence très récemment mais était déjà suspecté depuis quelques années par Tsien, (1982). Ceci a été montré sur cellules isolées par le fura-2 par des méthodes de microscopie de fluorescence (Donnadieu et al 1992). Ces changements dans la concentration de calcium se font lentement en comparaison avec les cellules excitables ou macrophages (Tsunoda 1991). La fréquence des oscillations semble dépendre de la concentration des substances stimulantes. Les oscillations chez les lymphocytes T semblent être observées uniquement lorsque la concentration d'agoniste est modérée. Ceci a déjà été observé dans d'autres types de cellules.

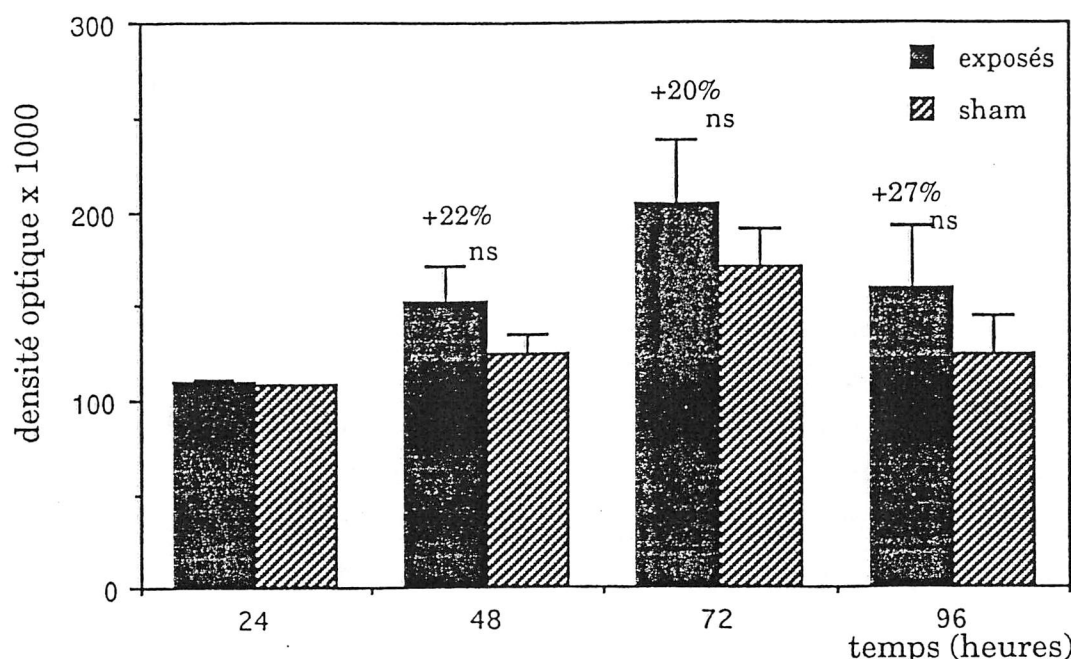
D'après l'histogramme de la ligne de base (fig 22), il y a un nombre important de cellules activées qui ont une concentration de calcium supérieure à 400 nM. Le maximum semble se situer au dessus de 1,5 μ M. Nous sommes donc en présence de lymphocytes ayant des concentrations en calcium très élevées qui seraient toxiques pour les cellules à long terme d'où la forte probabilité d'être en présence d'oscillations de calcium. Remarquons que le pourcentage moyen de lymphocytes activés dans nos expériences est de 15 % ce qui est faible en comparaison avec l'étude de ces lymphocytes dans les heures qui suivent cette activation. Cette différence pourrait être dû en partie à ces oscillations, en effet quand un lymphocyte est au creux de l'oscillation le signal enregistré par cytométrie sera le même que celui des cellules non activées; seuls les lymphocytes pris sur les pentes et au sommet des pics seront considérés comme activés. La présence d'oscillations peut expliquer que l'effet du champ observé ne se situe pas toujours au même temps, ceci peut être dû à un décalage des oscillations, qui ne sont pas contrôlées dans nos expériences. Ces effets, souvent décalés, diminuent la moyenne des effets.

Les oscillations sont aussi dépendantes de la concentration de calcium extra cellulaire. En effet, l'intensité des pics et l'intervalle entre les pics (de l'ordre d'une centaine de secondes) sont augmentés quand on passe de 5 mM à 1 mM, (Donnadieu et al 1992). Ces auteurs proposent le modèle suivant : il y aurait sortie du calcium du stock intracellulaire après stimulation, suivie d'une inhibition des pompes de stockage qui va provoquer l'ouverture des canaux de la membrane. Cette augmentation de calcium favorise un rétroaction positive jusqu'à la fermeture des canaux par une concentration de calcium intracellulaire suffisamment élevée. La fonction de ces oscillations dans les lymphocytes est encore inconnue. On peut supposer qu'elle éviterait une concentration élevée soutenue qui serait toxique pour les cellules à long terme, d'où cette rétroaction permanente. Ces signaux répétitifs pourraient être un mode général de codage de l'information dans les cellules non excitables (Berridge and Galione 1987). Il semble que l'augmentation soutenue de calcium, et donc l'entrée massive dans les lymphocytes T, soit nécessaire à la production de l'interleukine 2 et contribue ainsi au déclenchement de la prolifération cellulaire.

Si l'effet du champ observé sur la concentration de calcium est réel, il est fort probable que cela doit avoir des conséquences sur la prolifération de ces cellules.

B-2-2-13) Effet sur l'activation et sur la prolifération -

Il m'a semblé donc important d'observer l'effet de ces augmentations de calcium au bout de 30 minutes d'exposition à plus long terme. J'ai donc testé après une exposition dans les mêmes conditions, les répercussions sur l'activation des lymphocytes, 24 heures après l'exposition de 30 minutes, et la prolifération soit 48, 72 et 96 heures après. Les histogrammes 27 récapitulent les résultats avec le test MTT révélateur de l'activation et de la prolifération.



Histogrammes 27 : Valeur de densité optique en fonction du temps, avec les erreurs standards, après une exposition à 30 minutes, à 8 Hz, 5 mT. (4 animaux).

Dans ces expériences (4 animaux différents), aucun effet sur l'activation n'a été observé. Par contre, il y a un effet persistant les jours suivants, donc pour les cycles cellulaires suivants. Les différences ne sont pas significatives en raison des écarts importants entre les animaux (les valeurs n'ont pas été normalisées). En augmentant le nombre d'expériences, nous obtiendrons très certainement des valeurs significatives.

Après 30 minutes d'exposition, les lymphocytes spléniques sont incubés dans l'étuve et l'activation ainsi que la prolifération sont observées. Les histogrammes montrent les résultats suivants : on n'observe aucun effet de l'exposition du champ à 24 heures, soit pendant la période d'activation avant toute division.

Cela évoque que l'on pourrait agir sur une petite population particulière qui peut se trouver à un certain stade du cycle cellulaire et le champ pourrait favoriser l'entrée dans le cycle cellulaire, d'où l'augmentation 48, 72 et 96 heures après l'exposition.

B-2-2-14) Etude de différentes populations cellulaires - La mobilisation du calcium dans les lymphocytes T de souris, visualisée par une augmentation de la fluorescence du fluo-3, a été étudiée en premier par Sei et Arora (1991). Ils observent un pic à 10 minutes après adjonction de ConA, et un retour à 20-30 minutes. Il semble que cette augmentation varie en fonction des sous-populations de lymphocytes CD8/CD4.

L'augmentation de calcium ne conduit pas nécessairement à la suite du cycle cellulaire. Par exemple, une concentration trop élevée de ConA induit une incorporation de thymidine nulle bien qu'il y ait une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et un niveau d'inositol trisphosphate élevé une heure après. Les hypothèses suggérées sont qu'un excès de ConA inhibe l'absorption de facteurs de croissance et/ou une saturation des récepteurs (Bijsterbosch et Klaus 1986).

La mobilisation du calcium dans les lymphocytes B montre que ces cellules sont les premières à signaler une augmentation de calcium lors de la mise en présence de ConA (Sei et Arora, 1991) : il y a un pic à 5 minutes pour redescendre vers un plateau dès la dixième minute.

Dans l'hypothèse où le champ magnétique agirait sur une population particulière, il semble intéressant de les marquer afin de pouvoir les observer individuellement lors de l'exposition.

Des contrôles préliminaires sont nécessaires afin de s'assurer que les anticorps anti-antigènes membranaires spécifiques des différentes populations ne perturbent pas la réponse en calcium suite à l'activation par la ConA. J'ai étudié la réponse des lymphocytes spléniques de rats suite à la fixation des anticorps que je voulais utiliser, soit les anticorps anti-CD8, anti-CD4 et l'anticorps anti-IA : il n'y a pas de modification dans la concentration du calcium à la suite de la fixation de ces anticorps.

Cette étude nous a permis de quantifier ces différentes populations chez les rats de 5-6 semaines :

Pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ - Il est en moyenne de 30 % des lymphocytes spléniques dans nos expériences, et dans ce pourcentage 20% de ces lymphocytes CD8⁺ ont été activés chez l'animal avant le prélèvement des cellules; ces cellules préalablement activées ne réagissent pas à la ConA et conservent un signal fort en fluo-3. Ce pourcentage de 20% passe à 25-27% après adjonction de ConA, cette augmentation persiste seulement entre 7-12 minutes, et à 20 minutes on retombe à un pourcentage de cellules activées identique à celui d'avant l'activation par la conA, soit 20%. Dans cette étude préliminaire il n'y a pas d'effet du champ magnétique sur cette population.

Pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ - Il est en moyenne de 20% chez les rats dont 5% sont des lymphoblastes. L'augmentation de calcium suite à l'activation par la ConA commence assez tard, au bout de 15 minutes avec un maximum à 20 minutes.

Pourcentage de lymphocytes B - Il est en moyenne de 30% chez les rats. L'augmentation de calcium suite à l'activation par la ConA commence très tôt dès les premières 5 minutes.

Les effets observés sous exposition dans la réponse du calcium montre un effet plus important à 20 minutes. Serait-ce une indication de la population plus particulièrement concernée par l'effet du champ ? Si oui, il s'agirait surtout d'un effet sur les lymphocytes T CD4⁺, ce qui serait très cohérent par rapport à l'effet observé sur la prolifération. En effet, cette population est responsable de la régulation de la prolifération des autres populations.

La poursuite de l'étude avec les anticorps nous permettra de savoir si le champ agit sur une population particulière et ceci est en cours actuellement.

On peut suspecter d'autres cibles, telles que les cellules mémoires et naïves. En effet, il est maintenant connu que les activations calciques sont différentes entre ces cellules (Beckman et al, 1990; Philosophe et al, 1990; Grossmann et al, 1990)

En parallèle au test MTT, j'ai observé les populations cellulaires en cytométrie en flux, donc plus particulièrement en fonction de la taille et de la granulométrie. Il y a, de toute évidence, des mouvements différents dans les cycles cellulaires entre les cellules exposées et les cellules témoins.

B 2-2-15) Etude du cycle cellulaire: - A Rockville, j'ai profité de l'expérience de l'un des chercheurs pour me familiariser avec un programme de cytométrie en flux, le Cell-Fit qui permet l'étude du cycle cellulaire. Les cellules sont exposées comme d'habitude pendant 30 minutes et les différentes phases du cycle cellulaire sont quantifiées après 24 heures et 48 heures de culture. En parallèle la taille des cellules est analysée. Trois conditions sont choisies : contrôle négatif en absence de ConA, concentration de ConA utilisée habituellement 5 µg/ml et concentration excessive 20 µg/ml.

après 24 heures de culture :

- *sans ConA* : Il n'y a pas de différence dans la taille des cellules entre exposées et sham exposées, 10 % des cellules sont activées (lymphoblastes). Il n'y a pas de différence non plus dans le pourcentage des cellules en phase S (6%) et en phase G2 (3-4%), le reste des cellules est en phase G1.
- *5 µg/ml de ConA* : il y a 47 % de cellules qui sont activées, 8-10% de cellules en phase S et 4% en G2, pas de différence entre exposées et sham exposées.
- *20 µg/ml de ConA* : il ya 30% de cellules activées (9% de cellules mortes), il y a un peu plus de cellules en phase S chez les exposées, soit 24% pour 20% chez les témoins.

après 48 heures de culture

- *sans ConA* : identique à 24 heures de culture.
- *5 µg/m de ConA* : il y a environ 45-50 % de cellules qui sont activées, il y a 11% en plus de cellules activées chez les cellules exposées et moins de cellules mortes. Le pourcentage de cellules en phase S est de +26% chez les cellules exposées.
- *20 µg/ml de ConA* : il y a 16% en plus de cellules activées pour les cellules exposées et moins de cellules mortes.

Cette expérience préliminaire va dans le même sens que les effets observés lors de l'étude de la prolifération, il semble qu'il y ait une accélération dans le cycle cellulaire suite à l'exposition. Une expérimentation est en cours.

B-2-3) Discussion

Il semble que l'effet observé soit dépendant de l'intensité et de la fréquence. Des expériences complémentaires seront nécessaire, pour savoir où se situe le maximum de l'effet du champ.

Si les champs induisent des changements dans l'homéostasie du calcium entraînant des effets sur la réplication des lymphocytes, il est possible de penser que le temps d'exposition nécessaire pour observer un effet devrait être assez court. Cependant les phases précises du cycle cellulaire qui sont dépendantes du calcium ne sont pas encore clairement définies. La dépendance du calcium pendant les 24 premières heures de l'activation par les mitogènes (Lichtman 1983) est certaine. Il a été montré un effet sur la prolifération des lymphocytes, suite à une exposition pendant les 24 premières heures. Si l'exposition se fait pendant les 24 dernières heures de culture (48h-72h), il n'y a plus d'effet (Cadossi 1985).

L'augmentation du calcium observé suite à l'exposition au champ magnétique de 0,8 Hz, 5 mT semble correspondre à une accélération du cycle cellulaire de la ou des populations concernées par l'effet.

Pourquoi cette augmentation du calcium intracellulaire, suite à l'exposition de 30 minutes à 5 mT qui se répercute sur la prolifération, n'est-elle pas observée lors des expositions à 180 mT ?

La principale différence entre les deux protocoles est le moment de la mise des cellules sous champ par rapport au début de l'activation, soit dès les premières minutes de l'augmentation de calcium.

En effet, dans les expériences à exposition courte l'introduction de l'activateur est faite sous champ. La conséquence étant que, dès les premières secondes des processus d'activation, les cellules sont exposées, ce qui n'est pas réalisable lors des expositions longues à 180 mT. Il faut au moins 5 minutes pour déposer l'activateur sur les cellules dans les plaques de culture et les mettre en place sous le champ intense. Serait-ce la raison de ces différences ? Il est vrai que les mouvements ioniques déterminants pour la suite de l'activation se font justement pendant ces premières minutes.

Une autre différence dans l'exposition des lymphocytes au champ magnétique de différentes intensités est l'ordre de grandeur du dB/dt (c'est à dire le temps de montée du champ). Dans le cas du champ intense, le dB/dt est de 1T/s, alors qu'avec le champ à 5 mT il est bien plus élevé : 100 T/s.

Nos résultats expérimentaux ne vont pas dans le sens d'un effet plus important en présence d'importants courants induits. Dans les expériences faites à Rockville, les lymphocytes exposés dans les tubes annulaires (cas où le courant électrique induit est très augmenté) ne présentent pas une plus grande augmentation de calcium; on peut donc penser que les effets sont indépendants des courants induits, mais pour s'en assurer il faudra faire des expériences avec la composante électrique seule. Si on fait le parallèle avec l'effet observé sur la prolifération des cellules HeLa, lors d'expériences faites à Richmond, la composante électrique seule ne semble pas avoir un effet majeur sur la prolifération.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de l'étude des effets des champs magnétiques sur différents modèles de tumeurs avec plusieurs lignées de souris et sur les cellules spléniques du système immunitaire, nous avons obtenu aussi bien *in vivo* que *in vitro*, sur la prolifération tumorale et l'activation lymphocytaire des résultats auxquels une cohérence peut être apportée par des processus impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire.

Dans le détail, ces résultats nous ont permis d'observer :

avec les champs magnétiques intenses (100-180 mT) pulsés :

- un ralentissement de la croissance des tumeurs chimio-induites pour les souris exposés. L'amplitude de l'effet varie suivant la lignée de souris; dans le meilleur des cas, pour les C57 Black, une augmentation du temps de survie est également observée;
- une légère diminution de la croissance des tumeurs greffées, le mélanome B16 chez les C57 Black, dans les 15-20 jours qui suivent l'exposition; les temps de survie ne sont pas augmentés;
- une augmentation de l'activité Natural Killer chez les souris saines exposées.
- une diminution de la prolifération de lignées tumorales en culture *in vitro* et l'absence d'effet sur la prolifération de lymphocytes activés par la ConA dans les conditions d'exposition à ces champs intenses;

avec le même type de champ magnétique, mais une intensité plus faible (5mT) et un temps de montée 100 fois plus élevé, nous avons montré une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire des lymphocytes dans les 30 premières minutes de l'activation par la ConA; cette augmentation de calcium semble favoriser la prolifération des lymphocytes.

Les effets des champs magnétiques semblent être fonction de la vitesse de prolifération cellulaire

C'est ce que suggèrent nos résultats et les données bibliographiques

En confortant l'hypothèse que les champs magnétiques agiraient sur une des étapes qui mènent vers la prolifération cellulaire des lymphocytes étant donné l'absence d'effet observée lors des expositions aux champs magnétiques de cellules au repos.

Apparemment, les lymphocytes au repos ne présentent aucun phénomène ou processus sensibles aux champs magnétiques. Il en est de même pour les cellules tumorales en culture lorsqu'elles ne prolifèrent pas.

C'est ce que suggèrent également nos résultats par la mise en évidence :

- de l'activation des cellules du système immunitaire

A condition qu'ils soient activés, les lymphocytes en culture ont une prolifération qui semble accélérée suite à l'exposition au champ magnétique. Chez des souris saines exposées, l'activité NK a été augmentée.

- du ralentissement de la prolifération de cellules tumorales

Dans nos expériences de prolifération tumorale chimio-induite *in vivo*, l'effet du champ magnétique est plus ou moins efficace, suivant le type de la lignée de souris utilisée.

Ainsi, la lignée de souris C3H qui subit un développement tumoral lent est moins sensible aux effets du champ magnétique que la lignée des souris BALB/c qui, elles subissent un développement rapide. La lignée de souris intermédiaire dans la croissance de la tumeur, les C57 Black, présente un effet intermédiaire du champ.

Le développement des tumeurs *in vivo* peut dépendre de l'état biologique des animaux, vu que certaines prédispositions génétiques favorisent un développement tumoral plus ou moins rapide.

Les tumeurs qui se développent rapidement connaissent des modifications cellulaires très brutales induisant un processus tumoral rapide. Suractivées, leurs cellules deviendraient plus sensibles aux champs magnétiques qui provoqueraient leur entrée dans des processus d'apoptose.

Dans le cas d'une prolifération tumorale plus lente, l'accès aux processus d'apoptose ne serait pas facilité.

Une différence dans la sensibilité des cellules tumorales au champ magnétique a également été observée lors de nos expériences *in vitro*. Lorsque les lignées tumorales prolifèrent suivant un cycle normal (16 heures), le champ ralentit leur prolifération, alors qu'il ne peut rien contre une prolifération devenue totalement anarchique (cycle de 5-6 heures). Il semble, par conséquent, que les mécanismes de régulation de la prolifération tumorale soient affectés par le champ magnétique.

La recherche de la caractérisation de la cible biologique sur les modèles de cancers, dont ni les phénomènes inducteurs ni les récepteurs impliqués ne sont connus, est difficile à appréhender. La multiplicité des modèles de cancers animaux permet de remédier à cet inconvénient. C'est ce à quoi nous avons eu recours, en partie, en utilisant deux modèles de cancers : chimio-induits et greffés.

L'effet du champ magnétique sur le modèle de tumeurs greffées, mélanocytes B16, est de faible amplitude. Toutefois, la prolifération massive et artificielle des cellules greffées est assez éloignée du développement spontané des cellules tumorales *in vivo*.

Cette prolifération rapide du mélanome B16 laisse peu de temps à l'organisme des souris pour lutter et le champ reste également inefficace.

La dépression immunitaire semble marquer les limites des effets des champs magnétiques

La dépression des animaux porteurs de tumeurs, dans nos modèles, se manifeste par une mobilisation du calcium intracellulaire réduite lors de la stimulation des cellules du système immunitaire. Cette dépression est peut-être trop importante pour que le champ ait une action stimulatrice.

Dans le modèle de tumeurs chimio-induites que nous avons utilisé, les souris porteuses de tumeurs ne semblent pas bénéficier de l'augmentation de l'activité NK que nous avons observé chez les souris saines, ce qui peut être une explication possible du manque d'efficacité thérapeutique du champ, puisque nous n'aboutissons jamais à un arrêt de la croissance tumorale, mais seulement à un ralentissement.

Le système immunitaire déprimé, les cellules NK resteraient insensibles à une stimulation par le champ magnétique.

Pour ce qui concerne le modèle de tumeurs greffées, le mélanome B16 a la particularité d'inactiver les cellules NK, et celles-ci semblent rester dans cet état malgré l'exposition aux champs magnétiques.

Les processus qui conduisent à la prolifération des cellules tumorales et des lymphocytes sont loin d'être comparables, notamment en raison de l'intervention d'activateurs tels que les mitogènes dans le cas des lymphocytes. Les lymphocytes nous ont permis d'étudier *in vitro* la première étape de l'activation, à savoir l'augmentation de calcium intracellulaire qui semble posséder les caractéristiques de sensibilité aux champs magnétiques.

Au vu de nos résultats obtenus *in vitro* sur l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, et compte tenu des résultats de nombreux auteurs, de plus en plus d'arguments renforcent l'hypothèse d'une action directe ou indirecte des champs sur la concentration du second messager : le calcium.

L'hypothèse du calcium cible des champs magnétiques

Effet sur l'ion calcium

Les effets non thermiques des champs électromagnétiques sur le calcium ont été démontrés en premier par Bawin et al., 1976; 1978. Ces auteurs ont mesuré des changements dans les efflux de calcium. Leurs résultats ont été confirmés (Blackman et al., 1982; 1985a; 1985b). L'action sur l'influx ou l'efflux calcique demande à être élucidée.

Un point important, dans les caractéristiques physiques, émerge des différentes études : les fréquences en dessous de 100 Hz semblent être des fréquences plus efficaces pour les modifications de la régulation calcique. Des hypothèses initiées par Liboff (1990) montrent l'importance de la fréquence du champ appliqué sur les mouvements d'ions à travers les canaux calciques. On peut résumer la théorie de Liboff (résonance cyclotron) comme une action de champs de faible intensité opérant de concert avec le champ géomagnétique statique. Le champ géomagnétique (20 μ T) doit être parallèle au champ appliqué alternatif (16 Hz, 20 μ T) pour obtenir les conditions de résonance pour l'ion calcium. Cette éventuelle action produirait des effets sur des mouvements translationnels d'ions (comme le Ca^{2+}) ou sur des états d'énergie d'ions liés aux protéines (comme la calmoduline). Les hypothèses à propos des effets sur les flux calciques pourraient également concerner d'autres ions : Mg^{2+} et K^+ et Li^+ (McLeod et Liboff 1986).

Effet indirect sur le calcium à travers la membrane cellulaire

La membrane, porteuse des pompes et canaux calcique est le siège du déclenchement de l'activation, durant laquelle les événements se répercutent sur les cascades métaboliques. La fluidité membranaire des lymphocytes est dépendante des phosphorylations des phospholipases membranaires qui, elles-mêmes, varient en fonction de l'état d'activation cellulaire. Une modification indirecte de cette fluidité par le champ pourrait entraîner des modifications de la concentration du calcium intracellulaire via la perméabilisation de ces pompes et canaux.

Effet sur les oscillations calciques

L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire observée dans nos résultats pourrait être due à une action sur les oscillations calciques.

Bien que le rôle des oscillations du calcium ne soit pas encore très bien compris, il est possible de penser que le champ magnétique pourrait les influencer et favoriser l'entrée des lymphocytes dans le cycle cellulaire. Une augmentation de la fréquence ou de l'amplitude qui augmente la concentration de calcium intracellulaire globale ou encore une synchronisation partielle des oscillations peuvent être envisagées.

La régulation du calcium est modifiée pour certaines sous-populations lymphocytaires

Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans les lymphocytes spléniques, sous l'action du champ, concerne surtout les lymphocytes CD4⁺, car ceux-ci connaissent la plus forte augmentation de calcium au moment où l'effet du champ est le plus significatif. Cette augmentation de calcium pourrait ultérieurement agir sur la production d'interleukine 2 laquelle permet aux lymphocytes CD4⁺ d'orchestrer la prolifération des autres sous populations lymphocytaires. Une conjecture étayée, au niveau expérimental, par le fait que l'effet se répercute sur la prolifération.

Les oscillations de calcium durant l'activation des lymphocytes par les mitogènes doivent être prises en considération lors de l'étude des effets des champs électromagnétiques. De plus en plus de groupes de recherche étudient ces phénomènes, mais la plupart des équipes utilisent des lignées cellulaires telle que la lignée de lymphocytes T : les cellules Jurkat. Or les lignées oscillent de façon anarchique ce qui, probablement rend difficile la reproduction des résultats observés sous l'action des champs électromagnétiques. L'utilisation de lymphocytes normaux me semble être un meilleur modèle pour cette étude et pouvant plus facilement éviter des modifications dans les oscillations de façon artefactuelle.

Si nos travaux tendent vers l'hypothèse que les champs magnétiques influencent la vitesse de prolifération cellulaire où le calcium joue le rôle de second messenger, d'autres travaux impliquent le calcium de façon indirecte. Des auteurs suspectent les modifications dans le fonctionnement des cellules, dues aux champs électromagnétiques, d'affecter la transcription des gènes (Philipps et al, 1993). Ceci a d'ailleurs été particulièrement étudié par l'équipe de Goodman et al., 1983; 1988; 1989; 1992a et b.

Ils suspectent également une action des champs dans la liaison antigène-récepteurs ou dans la transcription de certains gènes, les deux phénomènes étant étroitement liés. Dans beaucoup de cas, la liaison du mitogène aux récepteurs cause une phosphorylation rapide du résidu tyrosine du domaine cytoplasmique du récepteur (Sibley et al. 1988). Il est connu que le calcium a une influence sur l'expression de protéines déterminantes dans la prolifération (Durkin et al., 1988). Les deux phénomènes concomittents que sont les phosphorylations et l'augmentation de calcium participent à la réplication de l'ADN (Berridge et al 1984).

Les effets observés sur les lymphocytes en fonction de la dose d'antigène (Conti et al, 1986; Cantini et al, 1986; Walleczek et al, 1990), amènent certains auteurs à suspecter une action du champ magnétique sur l'interaction de l'antigène avec ses récepteurs membranaires. La diffusion des récepteurs le long de la membrane et leur rencontre suite à la fixation du mitogène entraînent une augmentation de l'influx de calcium (Maino et al., 1974). Sur une pure base théorique, des auteurs ont montré que des champs électriques induits par des champs magnétiques affecteraient cette agrégation entre mitogène et récepteurs à la surface des lymphocytes (Chiabrera et al., 1984).

PERSPECTIVES

Les nombreuses perspectives ont pour but de mieux caractériser la cible des champs magnétiques, en travaillant avec des modèles biologiques adaptés à nos hypothèses de travail.

Perspectives sur la prolifération tumorale

Tout en conservant le même modèle de prolifération de tumeurs chimio-induites, il semble intéressant de changer le moment de l'exposition des animaux en fonction des différentes étapes de la dépression du système immunitaire.

Une exposition plus précoce des animaux, avant l'apparition de la tumeur, serait peut-être plus efficace. L'analyse des cellules du système immunitaire, dans ces circonstances de déficience de l'immunité, nous apportera des informations complémentaires.

L'étude des différentes sous-unités lymphocytaires, qui ont des niveaux de calcium intracellulaire différents, après exposition des animaux, pourra nous permettre de compléter notre approche.

Par contre pour les tumeurs greffées, il semble plus intéressant de changer de modèle. L'utilisation de tumeurs antigéniques devrait favoriser l'implication de l'immunité spécifique, ce qui laisse espérer que nous pourrions agir avec le champ à la fois sur la prolifération des cellules tumorales et sur les cellules du système immunitaire spécifique impliquées.

Perspectives sur les cellules du système immunitaire

Pour clarifier les différences observées dans l'effet du champ magnétique entre les deux protocoles qui présentent un décalage dans le temps d'exposition des lymphocytes activés, il est facilement concevable de réaliser le même décalage dans les deux expériences. Ainsi, si l'effet n'est pas retrouvé dans ces nouvelles conditions, il sera possible d'affirmer que les toutes premières minutes de l'activation, soit le passage des cellules de la phase G0 à G1a, sont indispensables pour observer l'effet du champ magnétique. Autrement, les différences observées risquent de provenir des paramètres physiques qui diffèrent tels que le dB/dt ou l'intensité du champ magnétique.

Des dosages biochimiques, tels que ceux des seconds messagers dans l'activation des lymphocytes et des cellules Natural Killer (IP3, DAG), semblent nécessaires, afin d'essayer de mieux comprendre les répercussions de l'exposition au champ magnétique. L'étape suivante serait l'étude détaillée de l'effet des champs magnétiques sur certaines sous-populations cellulaires (CD4⁺, Pg1⁺, NK) par marquage en cytométrie de flux et dosage du taux d'IL2.

L'autre voie possible serait de bloquer, par des méthodes pharmacologiques, le système de transduction intervenant suite à l'activation des cellules.

Le contrôle des oscillations calciques des lymphocytes semble intéressant à étudier, dans la mesure où il permettrait peut être d'avoir des effets plus importants et plus reproductibles. Le nombre des oscillations de calcium est modulable en utilisant différentes concentrations de calcium extracellulaire.

Cette recherche doit être menée en parallèle avec une meilleure définition des paramètres physiques permettant d'augmenter le signal biologique.

L'optimisation des paramètres physiques (forme du champ, fréquence, intensité) fait partie intégrante de nos perspectives.

Considérations générales

Les limites actuelles de la recherche en bioélectromagnétisme nourrissent le scepticisme ambiant autour de cette discipline. Il semble évident que même si les effets sont indubitables, ils sont dans la plupart des cas de faible amplitude, parfois juste au dessus de la variabilité biologique tout en étant statistiquement significatifs.

Notre travail a contribué à la recherche des systèmes biologiques adéquats pour révéler en laboratoire ces effets subtils, l'étape suivante étant la caractérisation des mécanismes impliqués mais non encore élucidés.

La complexité de la cellule et le grand nombre de paramètres biologiques rendent difficile la mise en évidence de la cible. La collaboration avec d'autres équipes travaillant sur les mêmes mécanismes, entre plusieurs laboratoires, se développe à la fois pour améliorer les modèles en les rendant plus adaptés aux effets des champs électromagnétiques, et pour favoriser la reproduction de résultats.

La reproductibilité dans ce domaine de recherche est une réelle nécessité. C'est elle qui rend les expériences plus convaincantes malgré l'amplitude souvent faible des effets observés.

Il n'y a pas de théories satisfaisantes permettant d'expliquer les effets biologiques observés. Toutefois des chercheurs, de plus en plus nombreux, se penchent, tant au niveau théorique qu'expérimental, sur ce sujet d'étude qui exige l'association de compétences diverses et diversifiées. Des théoriciens ouvrent des pistes avec les phénomènes "non linéaires" et les systèmes "hors d'équilibre" (Barnes 1992) qui pourraient fournir un trousseau d'hypothèses clé et constituer une base théorique pour élaborer une explication du bioélectromagnétisme.

Pourtant, s'il est vrai que des voies de recherche surprenantes sont parfois dégagées par l'association de disciplines différentes, les difficultés inhérentes à la collaboration pluridisciplinaire se surajoutent, dans notre domaine, à celles que suscitent la confrontation de la complexité évolutive du vivant avec la physique dont les paramètres sont eux plus contrôlables.

Le bioélectromagnétisme a connu un développement important ces dernières années, avec la création de structures internationales (BEMS : Bioelectromagnetics Society, EBEM : Association Européenne de Bioélectromagnétisme) permettant la coordination des recherches et la collaboration entre chercheurs.

En plus de ses deux voies d'investigations que sont le domaine médical et l'environnement, un nouvel axe de recherche plus fondamental semble se dégager dans le bioélectromagnétisme : il peut être envisagé comme instrument d'étude de la cellule et de son fonctionnement.

Références bibliographiques

- Atkinson E.A., Gerrard J.M., Hildes G.E., Greenberg A.H., (1989) Production of inositol-phospholipid-derived second messengers in a rat natural killer cell line exposed to susceptible tumor targets. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 8:223-230.
- Barnes F.S., (1992) Some engineering models for interactions of electric and magnetic fields with biological systems. *Bioelectromagnetics* 1:67-85.
- Baserga R. (1985) The biology of cell reproduction. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- Bassett C.A.L. Pawluk R.J., (1974)a Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgical noninvasive method, *annals N.Y. Academy of Sciences* 238, 242-262.
- Bassett C.A.L. Pawluk R.J., Pilla A.A. (1974)b Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science* 184, 575-577.
- Batkin, S. and Tabrah, F.L. (1977) Effects of alternating magnetic fields (12 gauss) on transplanted neuroblastoma. *Res. commun. Pathol. Pharmacol.*, 16, 351-362.
- Bawin, S.M., and Adey, W.R.; (1976) Sensibility of calcium binding to cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1999.
- Bawin, S.M., and Adey, W.R., Sabbot, I.M. (1978) Ionic factors in release of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ from chicken cerebral tissue by electromagnetic fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 6314-6318.
- Becci P., Thompson H., Strum J., Brown C., Sporn M., Moon R., (1981) N-butyl-N(4hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder cancer in C57BL/6X DBA/2F1 mice as a useful model for study of chemoprevention of cancer with retinoids. *Cancer Res.* 41, 927-932.

Beckman I., Dimopoulos K., Xiaoning X.U., Bradley J., Henschke P.H., Ahern M. (1990) T cell activation in the elderly : evidence for specific deficiencies in T cell/accessory cell interactions. *Mec. Ageing Dev* 51 265-276.

Belloc F. (1991) Les principes de la cytométrie en flux. *Revue française des laboratoires* N°218.

Bersani F., Cossarizza A., Franceschi C. (1989) Effects of extremely low frequency pulsed electromagnetic field on immunocompetent cells. "In vitro" studies. *Alta frequenza* LVIII, 375-380.

Berridge M.J., Galione A., (1987) Cytosolic calcium oscillators *FASEB J.* 2 : 3074-3082.

Bijsterbosch, M.K., and Klaus, G.G.B. (1986) Concanavalin A induces Ca^{2+} mobilization, but only minimal inositol phospholipid breakdown in mouse B cells. *J. Immunol.* 137, 1294.

Blackman C.F., Benane S.G., House D.E. and Joines, W.T. (1985a) Effects of ELF (1-120Hz) and modulated (50Hz) fields on the efflux of calcium ions brain tissue *in vitro*. *Bioelectromagnetics* 6,1.

Blackman C.F., Benane S.G., Rabinowitz, J.R., House D.E. and Joines, W.T. (1985b) A role for the magnetic field in the radiation-induced efflux of calcium ions from brain tissue *in vitro*. *Bioelectromagnetics* 6, 327-337.

Broder S., Waldmann T.A. (1978) The suppressor network in cancer *N. Engl. J. Med.* 299:1281.

Burnet F.M. (1957) Cancer : a biological approach, *Br. Med. J.*, 1:779.

Cadossi R., Emilia, G., Torelli G. Ceccherelli, G., Ferrari, S., and Ruggieri, P. (1988) The effect of low-frequency pulsing electromagnetic fields on the response of human normal lymphocytes to phytohemagglutinin. *Bioelectrochem; Bioenerg.* 14, 115-119.

Cadossi R., Emilia, G., Torelli G. (1988) Lymphocytes and pulsing magnetic fields. In *Modern Bioelectricity*, 457-496, Marcel Dekker, NY.

Cadossi R., Bersani F., Cossarizza A., Zucchini P., Giovanni E., Torelli G., Francschi C. (1992). Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields. *FASEB J.* 6, 2667-2674.

Cantini, M., Cossarizza, Bersani F., Cadossi R.,A., Ceccherelli G., Tenconi R., Gatti C., and Franceschi, C. (1986) Enhancing effect of low frequency pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferation. *J. Bioelect.* 5, 91-104.

Chagnaud J.L., (1990) Identification de processus autoimmuns liés à la prolifération cellulaire et abord de certains constituants cellulaire intervenant dans la cancérogénèse chimique au moyen d'une approche immunologique du benzo(a)pyrène. Thèse de l'Université de BordeauxII.

Chagnaud J.L., Faiderbe S., Gosset I, Geffard M (1993a) Characterization of monoclonal anti-idiotypic, internal image of conjugated benzo(a)pyrene. In polycyclic aromatic compounds : synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects (PAH XIII) edited by P. Guarrigues and M. Lamotte. *Gordon and breach science publishers.* p663-672.

Chagnaud J.L., Faiderbe S., Geffard M (1993b) Effets d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique, image interne du benzo(a)pyrène sur des sarcomes de rats *C.R. Acad. Sci. Paris*, 316, 1266-1269.

Chiabrera, A., Grattarola, M., Viviani, R.; (1984) Interaction between electromagnetic fields and cells: microelectrophoretic effect on ligands and surface receptors. *Bioelectromagnetics.* 5, 173-191.

Cikes M., Friberg S., Klein G. (1973) Progressive loss of H2 antigens with concomitant increase of cell-surface antigen(s) determined by moloney leukemia virus in cultured murine lymphomas. *J. Natl. Cancer. Inst.* 50: 347-362.

Conti P., Gigante G.E., Cifone M.G., Alesse E., Ianni G., Reale M. and Angeletti P.U. (1983) Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by ELF electroamgnetic fields. *FEBS Lett.* 162, 156-160.

Conti P., Gigante G.E., Alesse E., Cifone M.G., Fieschi C., Reale M. and Angeletti P.U. (1985a). A role for calcium in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocytes. *FEBS lett.* 181, 28-32.

Conti P., Gigante G.E., Cifone M.G., Alesse E., Fieschi C., and Angeletti P.U. (1985b) Effect of electromagnetic field on two calcium dependent biological system. *J. Bioelectromagnetics* 4, 227-236.

Conti P., Gigante G.E., Cifone M.G., Alesse E., Fieschi C., Bologna, M., and Angeletti P.U. (1986). Mitogen dose-dependent effect of weak pulsed electromagnetic field on lymphocyte blastogenesis. *FEBS lett.* 199, 130-134.

Cossarizza, A., Monti, D., Bersani F., Cantini, M., Cadossi R., Sacchi, A. and Franceschi, C. (1989a) Extremely low frequency pulsed electromagnetic field increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochem. Biophys. res. commun.* 160, 692-698.

Cossarizza, A., Borghi V., Bersani F., Cantini, M., De Rienzo B., Zucchini P., Montagnani G., Mussini D., Troiano L Tropea F., Grassilli E., Monti-Blasi D., and Franceschi, C. (1989b) Effects of pulsed electromagnetic fields on the proliferation of lymphocytes from AIDS patients, HIV-seropositive subjects, and seronegative drugs users. *J. Bioelect.* 8, 227-237.

Cossarizza, A., Monti, D., Scarfi M.R. Zannotti M, Cadossi R. and Franceschi, C. (1991) Exposure to low frequency pulsed electromagnetic fields increases mitogen-induced lymphocytes proliferation in Down's syndrome. *Aging*, 3, 241-246.

Cross L. (1964) Lifespan increase of tumor-bearing mice through pretreatment. Biological effets of magnetic fields. Ed. M. F. Barnothy, Plenum Press NY; Chap5 132-139.

Dao T.L., (1962) The role of ovarian hormones in initiating the induction of mammary cancers in rats by thyrotropin-releasing hormone. *Cancer res.* 22; 973-981.

de Seze R., **Bouthet C.**, **Tuffet S.**, **Deschaux P.**, **Caristan A.**, **Moreau J.M.**, and **Veyret B.** (1993) Effects of Time-varying Uniform Magnetic Fields on Natural Killer Cell Activity and Antibody Response in Mice. *Bioelectromagnetics* , 14, 405-412.

Donnadieu E., **Bismuth G.**, **Trautmann A.** (1992) Calcium Fluxes in T Lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* 276, N°36, 25864-25872.

Durkin J.P., **Chakravàrthy B.**, **Franks D.**, **Mealing G.**, **Schwartz J-L.**, **Tremblay R.**, **Whitfield J.F.** (1988) Early cellular responses to the activation of a mitogenic/oncogenic viral K-RAS Protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol 55, 186-200.

Emilia G., **Torelli G.**, **Ceccherelli G.**, **Donelli A.**, **Ferrari S.**, **Zucchini P.**, **Cadossi R.** (1985) Effect of low-frequency, low-energy PEMFs on the response to lectin stimulation of human normal and chronic lymphocytes leukemia lymphocytes. *J. Bioelect.* 4, 145-162.

Faiderbe S., **Chagnaud J.L.**, **Geffard M.** (1992) Identification and characterization of a specific autoantiphosphatidylinositol immune response during the time course of benzopyrene-induced malignant tumors in female sprague-dawley rats; *Cancer Research* , 52, 2862-2865.

Feychting, M., **Ahlbom, A.** (1992) Magnetic fields and cancer in people residing near Swedish high voltage power lines. IMM-rapport 6/92. *Stockholm : institutet för miljömedicin. Karolinska institutet*, 1-27.

Freedman M.H., **Raff M.C.** and **Gomperts B.** (1975) Induction of increased calcium uptake in mouse T lymphocytes by ConA and its modulation by cyclic nucleotides. *Nature* 255, 378-382.

Gerlier D., Thomasset N., (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunol. Methods.* 94, 57-63

Goodman, R., Bassett, C.A.L., Henderson, A.S. (1983) Pulsing electromagnetic fields induced cellular transcription. *Science*, 220, 1283.

Goodman, R., Henderson, A.S (1988) Exposure of salivary gland cells to low-frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3928.

Goodman, R., Wei, L.X, Xu, J.C., Henderson, A.S (1989) Exposure of human cells to low-frequency electromagnetic fields results in quantitative changes in transcripts. *Biochim. Biophys. Acta* 1009, 216-220.

Goodman, R., Wei, Bumann, J., L.X, Wei, Henderson, A.S (1992a) Exposure of human cells to electromagnetic fields: effect of time and field strength on transcript levels. *Electro-magnetobiology* 11 (1), 19-28.

Goodman, R., Wei, L-X, Henderson, A.S (1992b) Changes in translational patterns are induced in human HL-60 cells at specific times and field strengths, in electricity and magnetism in biology and Medicine. *Blank Ed. San francisco Press.*

Grosmann A., Ledbetter J.A., Rabinovitch P.S. (1990) Aging-related deficiency in intracellular calcium response to anti-CD3 or Concanavalin A in murine T-cell subsets. *J. Gerontol. Bio. Sci.* 45, (3) B81-86.

Guillaumin J.M., Renoux M., Gérard P., Renoux G. (1983) Influence de la race , du sexe et de l'âge sur les réponses immunes et sur l'action de trois immunostimulants chez les souris. *Veme Journées d'étude IFFA-CREDO;* "l'utilisation des souris consanguines dans la recherche biomédicales 9-10 juin, Fondation MERIEUX Lyon.

Haller, O., Hansson, M., Kiessling, R., Wigzell, H. (1977) Role of non-conventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumour cells *in vivo*. *Nature* 270, 609.

Hawrylowicz C.M., Klaus G.G.B., (1984) Activation and proliferation signals in mouse B cells. *Immunology* 53, 703-711.

Hesketh T.R., Moore, J.P.H., Taylor M.V., Rogers J.A., Smith J.A., Metcalfe J.C. (1985) A common sequence of calcium and PH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells. *Nature* 313, 481-484.

Hinsenkamp M., (1990) Stimulation électromagnétique de la croissance et de la consolidation osseuse, *Thèse d'agrégé de L'enseignement supérieur de l'ULB* 381.

Höjevik P. (1991) Electromagnetic fields biological effects and VDT field reduction. *Chalmers university of technology*. Göteborg, Sweden, Setember N°106L.

Huggins C., Grand L., Brillantes F., (1961) Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. *Nature* 189, 204-207.

INSERM (1986) risque pour la grossesse du travail sur terminal à écran. *Analyse et prospective* , Avril-septembre.

Jenkins M.K., Schwartz R.H. (1987) Antigen presentation bt chemically modified splenocytes induces antigen-specific T-cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med* 165:302.

Kerdelhue B El Abed A. (1979) Inhibition of preovulatory gonadotropin secretion and stimulation of prolactin secretion by 7-12-dimethylben(a)anthracene in sprague-dawley rats. *Cancer Res.* 39, 4700-4705.

Kiessing R., Klein E., Wigzell H. (1975) Natural Killer cells. *Eur. J. Immun.* 5, 112-117.

Krihnaraj R., and Blandford G., (1988) Age-associated alterations in human natural killer cells. *Cell. Immunol.*, 114, 137-148.

Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Diaz-Ricci J.C., Kirschvink S.J. (1992) Magnetite in human tissues: a mechanism for the biological effects of weak ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 1: 101-113.

Lesourd B. (1990) Le vieillissement immunologique. *Ann. Biol. clin.*, 48, 309-318.

Liboff A.R., Rozek R.J., Sherman M.L., McLeod, B.R., Smith, S.D. (1987) Ca^{2+} cyclotron resonance in human lymphocytes. *J. Bioelect.* 6 13-22.

Liboff, A.R., McLeod, B.R., Smith, S.D. (1990) Ion cyclotron resonance effects of ELF fields in biological systems, in: ELF electromagnetic fields: the question of cancer, *Stevens and Anderson, Eds., Battelle Press.* p251-286.

Lichtman, A. H., Segel, G.B., and Lichtman, M.A., (1983) the role of calcium in lymphocyte proliferation. *Blood* 61, 413-422.

Loeffler C.M., Smyth M.J., Longo D.L., Kopp W.C., Harvey L.K., Tribble H.R., Tase J.E., Urbas W.J., Leonard A.S., Young H.A., Ochoa A.C. (1992) Immunoregulation in cancer-bearing hosts. *J. of Immunol.* 149, 949-956.

London S.J., Thomas D.C., Bowman J.D., Sobel E., Cheng T.C., Peters J.M. (1991) Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia. *Amer J. Epidemiol.* 134, 923-937.

Lyle D.B., Ayotte R.D., Sheppard A.R. and Adey, W.R. (1988) Suppression of T-lymphocytes cytotoxicity following exposure to 60-Hz sinusoidal electric fields. *Bioelectromagnetics* 9, 303-313.

Lyle D.B., Wang X., Ayotte R.D., Sheppard A.R. and Adey, W.R. (1991). Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic field. *Bioelectromagnetics* 12, 145-156.

- Malter M., Schriever G., Kühnlein R. and Süss R. (1987) Tumoricidal cells increased by pulsating magnetic field. *Anticancer Research*, 7, 391-394.
- Maino V.C., Green N.M., Crumpton M.J., (1974) The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. *Nature* 251:324-327.
- Maizel A.L., Metha S.R., Hauft S., Franzini D., Lachman L.B., Ford R.J., (1991) Human T lymphocytes/monocytes interaction in response to lectine: kinetics of entry into S-phase. *J. Immunol.* 127, 1058-1064.
- McLean J.R.N., Stuchly M.A., Mitchel E.J., Wilkinson D., Yang H., Goddard M., Lecuyer D.W., Schunk M., Callary E., Morrison D. (1991) Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60-Hz magnetic field: tumor development and immune response. *Bioelectromagnetics* 12:273-287.
- McLeod, B.R., and Liboff, A.R. (1986) Dynamic characteristics of membrane ions in multifold configurations of low frequency electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics* 7, 177-189
- Mir, L.M. Orlowski, S., Belehradek, J. and Paoletti, C. (1991) Electrotherapy potentiation of anti-tumour effects of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer*, 27, 68.
- Mizoguchi H., O'Shea J.J., Longo D.L., Loeffler C.M., McVicar D.W., Ochoa A.C., (1992) Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science*, 258:1795-1798.
- Moon R., Mehta R. (1990) Cancer chemoprevention by retinoids : animal models. *Methods in enzymology*, 190, 395-406.
- Mooney, N., Smith, R., and Watson, B.W. (1986) Effect of extremely-low-frequency pulsed magnetic fields on the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells. *Bioelectromagnetics* 7, 387-394.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular Growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assays. *J. of Immunol. Methods* 65, 55-63.

NRPB : National Radiological Protection Board. (1992) Electromagnetic fields and risk of cancer. *report of an advisory group on non-ionising radiation* Vol. 3, N°1.

Omote Y., Hosokawa M., Komatsumoto M., Namieno T., Nakajima S., Kubo Y., Kobayashi H. (1990) Treatment of experimental tumors with a combination of a pulsing magnetic field and an antitumor drug. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 956-96.

Pati A.K., Florentin I., Chung V., De Souza M., Levi F., Mathe G. (1987) Circannual rythm in natural killer activity and mitogen responsiveness of murine splenocytes. *Cellular Immunology* 108, 227-234.

Phillips, J.L. (1993) Effects of electromagnetic field exposure on gene transcription. *J. Cell Biochem.* 51381-386.

Philosophe B., Miller R.A., (1990) Diminished calcium signal generation in subsets of T lymphocytes that predominate in old mice. *J. Gerontol. Bio. Sci.* 45 (3) : B87-93.

Poenie, M., Alderton J., Tsien J.Y. and Steinhardt R.A. (1985) Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. *Nature* 315, 147-149.

Polidori R., Vaglini F., Petrini M. Amrogi F. Zaniol P. and Ronca G. (1988) Activity of electromagnetic fields on some leucocyte functions. *Med. Sci. Res.* 16, 1117-1118.

Pollock, R.E. Lotzova, E., (1987) Surgical-stress-related suppression of natural killer cell activity: a possible role in tumour metastasis. *Nat. Immun. Cell Grwth Regul.*, 6, 269-278.

Savitz D.A., Calle E.E. (1987) Leukemia and occupational exposure time electromagnetic fields:review of epidemiologic survey. *J. Occup Med.* 29,47-51.

Savitz D.A., Wachtel M., Barnes F.D., John E.M., Turdick J.G. (1988) Case-control study of chilhood cancer and exposures to 60 Hz magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.*, 126; 21-38.

Sei Y. and Arora P.K., (1991). Quantitative analysis of Calcium (Ca^{2+}) mobilization after stimulation with mitogens or anti-CD3 antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 137. 237-244.

Sibley D.R., Benovic J.F., Caron M.G., Lefkowitz R.J., (1988) Phosphorylation of cell surface receptors: a mechanism for regulating signal transduction pathways. *Endocrine Rev.* 9: 38-56.

Smith, G.K. and Cleary S.F. (1983) Effects of pulsed electric fields on mouse spleen lymphocytes *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta* 763, 325-331.

Smith, O.M., Goodman, E.M., Greenebaum, B., and Tipnis P., (1991) An increase in the negative surface charge of U937 cells exposed to a pulsed magnetic field. *Bioelectromagnetics* 12: 197-202.

Stutman, O. (1989) Cancer. *Natural immunity* (ed.D.S Nelson) pp749-94 Academic Press London.

Tada H., Shiho O., Kuroshima K-I, Koyama M., Tsukamoto K. (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. of Immunol. Methods*. 93, 157-165.

Talmadge, J.E., Meyers K.M., Prieur, D.J., Starkey, J.R. (1980) Role of NK cells in tumour growth and metastasis in *beige* mice. *Nature* 284, 622-624.

Theriault, G., Goldberg M., Miller A.B. et al. (1994) Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic fields among utility workers in Ontario and Quebec, Canada and France. 1970-1989. *Amer. J. Epidemiol.* 139 (6) : 550-572.

Tilden, A. B., Grossi, C.M., Itoh, K., Cloud, G.A., Dougherty, P.A., Balch, C. M., (1986) Subpopulation analysis of human granular lymphocytes: association with age, gender, and cytotoxic activity. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.*, 5, 90-9.

- Tremblay L., Houde M., Mandeville R.** (1993) Modulation of rat natural killer cell activity by 60-Hz magnetic fields. *BEMS Meeting Los Angeles*.
- Trump B.F., Berezsky I.K.;** (1992) The role of cytosolic Ca^{2+} in cell injury, necrosis and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 4:227-232.
- Tsien R.Y., Pozzan T. and Rin T.J.** (1982). T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 295, 68-71.
- Tsien, R.Y.** (1989). Fluorescent indicators of ion concentration. *Methods in Cell Biology*, Academic Press, San Diego, CA p127.
- Tsunoda Y.** (1991) Oscillatory Ca^{2+} signaling and its cellular function. *The New Biologist* 3, 3-17.
- Tuffet S., R de Seze, J-M Moreau and B. Veyret** (1993a). Effects of a strong pulsed magnetic field on the proliferation of tumour cells *in vitro*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 30, 151-160.
- Vandenberghe P.A. and Ceuppens J.L.** (1990) Flow cytometric measurement of cytoplasmic free calcium in human peripheral blood T lymphocytes with fluo-3, a new fluorescent calcium indicator. *Journal of Immunological Methods*, 127. 197-205.
- Walleczek J., and Libudy R.P.** (1990). Nonthermal 60-Hz sinusoidal magnetic field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Lett.* 271, 157-160.
- Walleczek J. and Budinger T.,** (1992). Pulsed magnetic field effect on calcium signaling in lymphocytes dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett.* 314, 351-355.
- Walleczek J.,** (1992) Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. *FASEB J.* 6, 3177-3185.

Watson, G.A., Fu, Y.X., Lopez, D.M., (1991) Splenic macrophages from tumor-bearing mice co-expressing MAC-1 and MAC-2 antigens exert immunoregulatory functions via two distinct mechanisms. *J. Leukocyte Biol.* 49 : 126.

Windebank, K.P., Abraham, R.T., Powis, G., Olsen, R.A., Barna, T.J., Leibson, P.J. (1988) Signal transduction during human natural killer cells activation: inositol phosphate generation and regulation by cyclic AMP. *J immunol.*, 141, 3951-7.

Windhurst, D.B., Padgett G.J., (1973) The chediak-higashi syndrome and the homologous trait in animals. *J. invest. Derm.* 60, 529-537.

Wright P.F., Stacey, N.H., (1991) A species/stain comparison of hepatic natural lymphocytotoxic activities in rats and mice; *Carcinogenesis* 8, 1365-1370.

Yamaguchi H., Ikehara T., Miyamoto H., Kinouchi Y., Tasaka T. (1993) *Electricity and Magnetism in biology and medicine*, San francisco press Martin Blank Ed p485-487.

Zhang X.Y., Zhang X.E., (1991) Effects of strang constant magnetic field (MF) on the growth and division of HeLa cells. *Chin. Sci. Bull.* 36, 414.