

**RAPPORT FINAL  
T06.198-02.02**

**PROJET:** EFFET *IN VITRO* DES CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES DE FAIBLE INTENSITÉ PRODUITS PAR L'APPAREIL **BIO-STIM** SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES PRIMAIRES DE CALVARIUM DE SOURICEAUX ET DES LIGNÉES OSTÉOBLASTIQUES.

**COMPAGNIE :** ELECTRO-SANTÉ INC.

**RESPONSABLES :** M. Paul Demers  
Dr. Jean Charlebois

**CHARGÉ DE PROJET :** Dr. Lucie Richard

**SUPERVISEUR :** Dr. Rosemonde Mandeville

## **INTRODUCTION**

Ceci constitue le rapport final de l'étude sur les effets *in vitro* des champs électromagnétiques de faible intensité produits par l'appareil Bio-stim sur la prolifération des cellules primaires de calvarium de souriceaux nouveau-nés et des lignées cellulaires ostéoblastiques.

### TECHNIQUE DE CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES DU CALVARIUM DE SOURICEAUX.

Les cellules du calvarium de souris sont obtenues de la façon suivante :

1. La peau du dessus de la tête des souriceaux (âgés de 0 à 3 jours) est enlevée en prenant soin de dégager l'os de toutes membranes.
2. L'os crânien est découpé à partir de la nuque jusqu'à la base du museau, en passant par l'orifice de l'oreille et de l'œil.
3. Les membranes internes sont enlevées, l'os est rincé dans une solution saline (PBS) et est ensuite coupé en fins morceaux à l'aide de ciseaux.
4. Les morceaux d'os subissent 2 digestions consécutives dans des solutions de trypsine et de trypsine et collagénase.
5. Les cellules obtenues après la première digestion constituent principalement la population de fibroblastes (les fibroblastes étant moins solidement attachés à l'os sont plus faciles à déloger).
6. Après la deuxième digestion, les cellules obtenues sont principalement des ostéoblastes et seront référés par la suite comme étant les ostéoblastes isolés.
7. Ces deux populations cellulaires sont lavées, comptées etensemencées dans des plaques à culture cellulaire de 24 puits, à raison de  $2.5 \times 10^4$  cellules par puits dans 1 ml de milieu de culture complet.
8. Les morceaux d'os restants sont aussi lavés, resuspendus dans environ 9 ml de milieu etensemencés dans les mêmes plaques et seront référés par la suite comme étant les explants.

9. Un nombre de plaques égal au nombre de conditions expérimentales doit être prévu (1 plaque contrôle et 1 ou plusieurs plaques exposées au champs électromagnétique de l'appareil Bio-stim).
10. Des explants sont aussiensemencés dans des plaques de culture (6 puits) indépendantes des plaques expérimentales, pour l'obtention de cultures secondaires. Lorsque les cellules ont recouvert le fond des puits, elles sont décollées par un traitement à la trypsine, lavées, comptées etensemencées de nouveau. Cette procédure constitue un passage. Les cellules sont considérées en culture secondaire dès le premier passage (p-1). Les cellules peuvent être maintenues pendant plusieurs passages (environ 3 passages pour les ostéoblastes provenant d'explants) et servir aux expériences d'une façon semblable aux cellules en culture primaire.

#### CULTURE DES LIGNÉES CELLULAIRES PERMANENTES

Deux lignées cellulaires provenant de l'ATCC ont été mise en culture :

1. Les cellules Ber lin (lignée de type fibroblastique provenant d'un sujet atteint d'ostéoporose)
2. Les cellules UMR 106 (lignée de type ostéosarcome provenant de tissus osseux de rat)

#### PARAMÈTRES D'EXPOSITION AVEC L'APPAREIL BIO-STIM

L'exposition au champs électromagnétique a été effectué à partir du jour 1 après la mise en culture, pour une durée de 6 jours consécutifs (4 jours consécutifs pour les lignées permanentes) à raison de 15 minutes par jour, à l'aide d'un des petits coussinets du système Bio-stim. Les paramètres du champs utilisé pour l'amplitude, la fréquence et la modulation sont de 6, 60, 2 (30 Hz), 6, 30, 2 (15 Hz), 6, 15, 0 (15 Hz) et 6, 10, 0 (10 Hz). Des lectures de l'intensité du champs électromagnétique produit au niveau des cellules dans l'incubateur nous indique que pour les paramètres utilisés, les cellules ont été soumises à un champs moyen de :

- $111.09 \pm 23.26$  mGauss ( $11.1 \mu$ Tesla) pour les paramètres 6-60-2
- $50.00 \pm 3.50$  mGauss ( $5.0 \mu$ Tesla) pour les paramètres 6-30-2

- $42.50 \pm 5.30$  mGauss ( $4.2 \mu\text{Tesla}$ ) pour les paramètres 6-15-0
- $32.50 \pm 1.77$  mGauss ( $3.2 \mu\text{Tesla}$ ) pour les paramètres 6-10-0

L'exposition a été effectuée dans un incubateur indépendant et les cellules ont été replacées dans l'incubateur original (près des cellules contrôles) immédiatement après chaque exposition.

### TECHNIQUE D'ÉVALUATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

La prolifération cellulaire est évaluée par l'incorporation de thymidine radioactive dans l'ADN cellulaire durant les 18 dernières heures d'incubation. Après l'incorporation, les cellules sont lysées, l'ADN est extrait et la quantité de thymidine radioactive incorporée dans l'ADN est évaluée à l'aide d'un compteur bêta. Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne d'un triplicat  $\pm$  l'écart-type.

### ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques utilisées pour déterminer la validité des résultats ont été le test de Student non pairé pour données des expériences individuelles et le test de Student pairé pour les données moyennes des 3 expériences. La limite de confiance a été fixée pour une valeur de  $P < 0.05$ .

### **RESULTATS**

**Tableau 1 : Données expérimentales des expériences de mise en culture primaire des cellules du calvarium de souriceaux.**

No. De L'Expérience	Données Expérimentales		
	Date	Nombre De Souriceaux	Âge
Expérience 1	08-06-98	3	3 Jours
Expérience 2	11-06-98	2	3 Jours
Expérience 3	16-06-98	7	1 Jours
Expérience 4	18-06-98	11	0 Jours

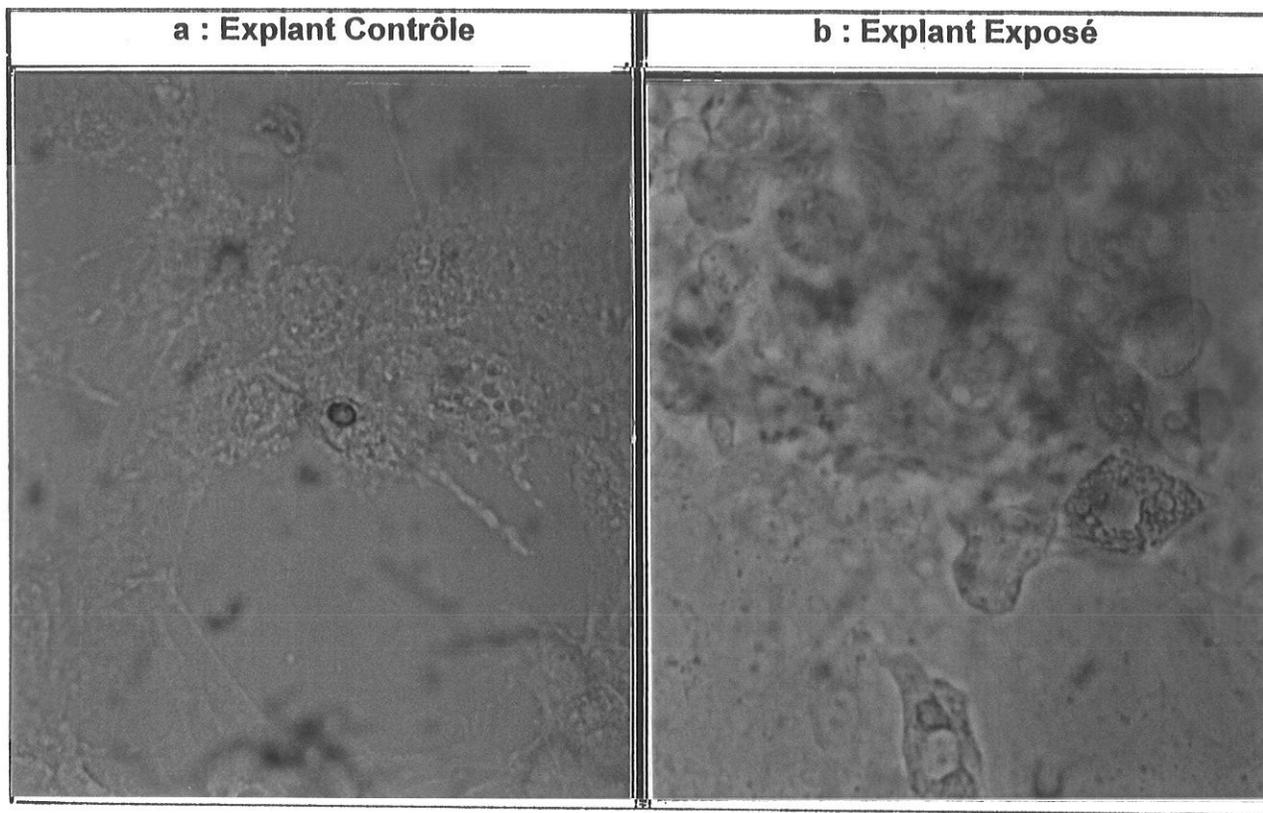
**Tableau 2: Effet des champs électromagnétiques (111.09±23.26 mGauss) produits par l'appareil Bio-stim sur les cellules de calvarium en culture primaire.**

	Ostéoblastes Isolés (cpm moyen ± écart-type)		Explants (cpm moyen ± écart-type)		Fibroblastes (cpm moyen ± écart-type)	
	Contrôles	Exposés	Contrôles	Exposés	Contrôles	Exposés
<b>Expérience 2</b> <b>11-06-98</b> âge :3 jrs	761.667 ± 275.582	764.333 ± 267.358	229.667 ± 119.918	1707.000 ± 497.803	53.000 ± 18.358	366.000 ± 516.213
<i>Student Test</i>	P = 0.49548912		P = <b>0.00645339</b>		P = 0.17657647	
<b>Expérience 3</b> <b>16-06-98</b> âge :1 jr	1481.333 ± 108.450	1736.667 ± 193.477	2194.000 ± 416.505	3131.333 ± 448.327	733.333 ± 384.012	468.667 ± 218.470
<i>Student Test</i>	P = 0.05846242		P = <b>0.02840054</b>		P = 0.17903213	
<b>Expérience 4</b> <b>18-06-98</b> âge :0 jr	1916.000 ± 95.582	2036.667 ± 357.571	3606.667 ± 120.935	5175.333 ± 560.151	1848.667 ± 185.325	2113.333 ± 63.319
<i>Student Test</i>	P = 0.30122879		P = <b>0.00451442</b>		P = <b>0.03965763</b>	
<b>Moyenne des 3 Expériences</b>	1386.333 ± 583.001	1512.556 ± 665.115	2010.111 ± 1695.993	3337.889 ± 1743.368	878.333 ± 906.573	982.667 ± 980.53.
<i>Student Test</i>	P = 0.11295107		P = <b>0.0106554</b>		P = 0.31481501	

**Tableau 3: Effet des champs électromagnétiques (111.09±23.26 mGauss) produits par l'appareil Bio-stim sur les cellules de calvarium en culture secondaire.**

	Ostéoblastes Contrôle (cpm ± écart-type)	Ostéoblastes Exposés (cpm ± écart-type)	<i>Student Test</i> (valeur de P)
<b>Expérience 1</b> <b>Cellules 08-06, p-2</b>	184.000 ± 10.583	182.667 ± 39.311	0.4787414
<b>Expérience 2</b> <b>Cellules 11-06, p-1</b>	754.667 ± 74.413	734.000 ± 94.064	0.39011079
<b>Expérience 3</b> <b>Cellules 16-06, p-1</b>	1458.667 ± 104.543	1405.333 ± 56.898	0.24050776
<b>Expérience 4</b> <b>Cellules 18-06, p-1</b>	733.333 ± 130.374	1000.667 ± 326.646	0.12917801
<b>Moyenne des 4 Expériences</b>	782.667 ± 522.365	830.667 ± 512.637	0.28113436

**Figure 1: Observation morphologique des ostéoblastes migrant des explants exposés au champs électromagnétique et contrôles après 7 jours de culture.**



Quatre différentes expériences, décrites dans le Tableau 1, ont été effectuées. Toutes les cellules ont été exposées pendant 15 minutes par jour, durant 6 jours consécutifs. Lors de la première expérience, nous avons eu des problèmes de marquage avec la thymidine qui nous ont obligé à abandonner les résultats sur ces cultures primaires. Les cellules ont toutefois pu être gardées en culture secondaire. Les résultats des expériences 2 à 4 (cultures primaires) et 1 à 4 (cultures secondaires) sont présentés dans les Tableaux 2 et 3

Un effet marqué du champs électromagnétique de l'appareil Bio-stim est observé sur la prolifération des explants, mais non sur la prolifération des ostéoblastes isolés et des fibroblastes en culture primaire (Tableau 2). En effet, une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) de la prolifération est obtenue pour chacune des 3 expériences. Une augmentation significative est aussi observée lorsque l'analyse est effectuée sur la

moyenne des 3 expériences. Aucun effet du champs électromagnétique n'a été observé sur les cultures secondaires d'ostéoblastes lors de 4 expériences individuelles (Tableau 3).

L'observation morphologique des cellules de calvarium en culture primaire (Figure 1a et b) nous démontre une augmentation importante de la dispersion et la maturation des cellules provenant d'explants exposés au champs électromagnétique de l'appareil Bio-stim comparativement aux explants contrôles.

L'influence du champs électromagnétique de l'appareil Bio-stim sur les lignées cellulaires permanentes a aussi été étudiée. Le Tableau 4 démontre la prolifération des cellules Ber lin, provenant d'un sujet atteint d'ostéoporose alors que le Tableau 5 traite de la prolifération des cellules UMR 106, provenant d'un ostéosarcome de rat.

**Tableau 4 : Effet des champs électromagnétiques produits par l'appareil Bio-stim sur la prolifération de la lignée cellulaire Ber lin.**

	<b>Contrôle</b>	<b>6-60-2</b> 111.09 ± 23.26 mGauss	<b>6-30-2</b> 50.00 ± 3.50 mGauss	<b>6-15-0</b> 42.50 ± 5.30 mGauss	<b>6-10-0</b> 32.50 ± 1.77 mGauss
Expérience 1	1483.1	2556.4	2646.1	2624.4	2959.5
	1915.8	2213.6	2247.3	2163.2	2014.9
	1960.8	1842.8	2240.1	1954.5	1861.2
Expérience 2	129.2	314.6	410.1	623.6	730.2
	359.5	376.4	280.9	460.6	483.1
Expérience 3	140.4	870.8	1118.0	999.9	845.5
	561.7	870.7	792.1	758.4	356.8
<b>Moyenne</b>	<b>935.8</b>	<b>1292.2</b>	<b>1390.7</b>	<b>1369.2</b>	<b>1321.6</b>
SD	823.2	903.7	971.0	860.2	971.7
% Augmentation		38.1%	48.6%	46.3%	41.2%
<i>Student T test</i>		0.0315	0.0176	0.0177	0.0666

**Tableau 5 : Effet des champs électromagnétiques produits par l'appareil Bio-stim sur la prolifération de la lignée cellulaire UMR 106.**

	<b>Contrôle</b>	<b>6-60-2</b> 111.09 ± 23.26 mGauss	<b>6-30-2</b> 50.00 ± 3.50 mGauss	<b>6-15-0</b> 42.50 ± 5.30 mGauss	<b>6-10-0</b> 32.50 ± 1.77 mGauss
Expérience 1	67625.7	71430.0	67158.4	72328.6	71802.9
	72169.9	72603.2	60460.7	71442.8	70107.2
	64809.9	70793.1	69047.8	68351.1	70216.2
Expérience 2	26245.8	30099.5	21100.9	20911.0	16004.8
	23034.9	33464.5	14527.7	25198.9	29479.4
Expérience 3	28782.9	40447.9	36211.9	22422.8	22880.0
	28604.0	24019.7	15348.8	22368.7	20103.0
<b>Moyenne</b>	<b>44467.6</b>	<b>48979.7</b>	<b>40550.9</b>	<b>43289.1</b>	<b>42941.9</b>
SD	22385.2	21721.3	24582.9	25707.1	26286.1
% Augmentation		10.1%	-8.8%	-2.7%	-3.4%
<i>Student T test</i>		<b>0.0387</b>	0.1197	0.2698	0.2907

L'exposition des cellules à différentes intensités de champs électromagnétique nous permet d'observer une réactivité plus prononcée pour les cellules Ber lin que pour les cellules UMR 106. En effet, une augmentation significative de la prolifération des cellules Ber lin (Tableau 4) est obtenue après leur exposition à un champs électromagnétique de 111.09 ± 23.26 mGauss (11.1 µTesla), 50.00 ± 3.50 mGauss (5.0 µTesla) et 42.50 ± 5.30 mGauss (4.2 µTesla), ce qui correspond respectivement aux paramètres 6-60-2, 6-30-2 et 6-15-0 de l'appareil Bio-stim. Les augmentations de la prolifération varient de 38.1% à 48.6 % et sont donc considérées comme importantes. L'augmentation maximale (48.6%) est obtenue suite à l'exposition au champs électromagnétique de 50 mGauss (5.0 µTesla) avec les paramètres 6-30-2 de l'appareil Bio-stim. L'augmentation de la prolifération causée par le champs magnétique de 32.50 ± 1.77 mGauss (3.2 µTesla), (paramètres 6-10-0), peut être considéré comme une forte tendance mais n'est toutefois pas significative.

Les cellules UMR 106 se comportent différemment des cellules Berlin. Le Tableau 5 démontre qu'une légère augmentation significative de la prolifération des cellules est obtenue suite à l'exposition à un champs magnétique de  $111.09 \pm 23.26$  mGauss ( $11.1 \mu$ Tesla), produit avec les paramètres 6-60-2 de l'appareil Bio-stim. Par contre, aucune autre intensité du champs électromagnétique n'a induit de différence significative dans la capacité des cellules UMR 106 à proliférer.

### ***DISCUSSION ET CONCLUSIONS***

Il ressort clairement de cette étude que l'exposition à un champs électromagnétique de  $11.1 \mu$ T (amplitude 6, fréquence 60 et modulation 2 du système Bio-Stim), pendant 15 minutes par jour pour une durée de 6 jours consécutifs a significativement augmenté le potentiel de prolifération des cellules contenues dans les explants de calvarium de souriceaux. L'observation morphologique de ces cellules nous indique qu'elles sont majoritairement de nature ostéoblastique. Toutefois, lorsque les ostéoblastes sont isolés des calvaria et mis en culture (culture primaire et secondaire) aucune augmentation de leur prolifération n'a été observée. Il est possible que l'encrage des cellules à leur support naturel soit essentiel à leur maturation. Les champs électromagnétiques ont probablement un effet plus important sur la dispersion et la maturation des ostéoblastes que sur la prolifération cellulaire comme telle. En effet, les photographies d'explants démontrent d'une façon évidente que la dispersion cellulaire des explants exposés est beaucoup plus importante que celle des explants contrôles. De plus l'évaluation morphologique de l'état de maturation des cellules migrant des explants nous indique qu'une plus grande quantité de cellules en voie de maturation est présente dans les explants exposés comparativement aux contrôles.

Un fait intéressant à noter est que le potentiel de prolifération cellulaire semble être en relation directe avec l'âge des souriceaux utilisés comme source cellulaire. En effet, les caractéristiques embryonnaires des ostéoblastes de souriceaux nouveaux nés sont plus

importantes à la naissance et s'estompent durant les jours suivant la naissance parallèlement à la complétion de la formation des os. Les structures osseuses formées ou adultes ont une très faible capacité à proliférer. Nous avons remarquer dans les culture primaires et secondaires que les cellules provenant de souriceaux âgés de 3 jours prolifèrent moins que les cellules provenant de souriceaux plus jeunes. Par contre, la stimulation causée par le champs électromagnétique de l'appareil Bio-stim en est d'autant plus importante. Nous obtenons un indice de stimulation (Exposés / Contrôle) de 7.432 pour les explants provenant de souriceaux âgés de 3 jours, alors que l'indice de stimulation pour les explants de souriceaux de 0 et 1 jour est de 1.433 et 1.427 respectivement. Il semble donc plausible de suggérer qu'une exposition aux champs électromagnétiques de  $11.1 \mu\text{T}$  puisse avoir un effet stimulant sur les cellules osseuses de souris adultes.

L'étude de l'effet du champs électromagnétique sur la prolifération des lignées permanentes a été effectuée avec deux lignées cellulaires d'origines différentes, provenant de l'ATCC. Les cellules UMR 106 sont des cellules cancéreuses provenant d'un ostéosarcome de rat. Ces cellules n'ont réagit que très faiblement à la stimulation électromagnétique de l'appareil Bio-stim. Une légère augmentation de 10% de la prolifération cellulaire est obtenue suite à l'exposition à un champs magnétique de  $111.09 \pm 23.26$  mGauss ( $11.1 \mu\text{Tesla}$ ), alors que des intensités plus faibles n'ont causé aucune augmentation. Ces résultats semblent indiquer que l'exposition à un champs électromagnétique de faible intensité (paramètres 6-30-2, 6-15-0 et 6-10-0 de l'appareil Bio-stim) ne cause pas d'effet promotionnel sur la prolifération de cellules cancéreuses osseuses (ostéosarcome). Il serait intéressant de vérifier l'effet de l'exposition au champs électromagnétique produit par l'appareil Bio-stim *in vivo* chez des animaux porteurs d'ostéosarcomes.

Les cellules Ber lin sont des cellules de type fibroblastique (dédifférenciées) provenant d'un sujet humain atteint d'ostéoporose. Ces cellules ne sont ni cancéreuses, ni transformées et peuvent donc être considérées comme étant de type "normal", bien qu'il soit entendu que ces cellules dérivent d'une souche ayant une pathologie au niveau de l'efficacité du processus de calcification. Ce que nous retenons d'intéressant

suite à l'analyse des résultats décrits ci haut est l'induction d'une augmentation considérable de la prolifération de ces cellules suite à une stimulation électromagnétique avec l'appareil Bio-stim variant de 111 à 42 mGauss (11.1 à 4.2  $\mu$ Tesla). Il est donc possible de croire que le champs électromagnétique dégagé par l'appareil Bio-stim puisse stimuler un effet régénérateur pour ces cellules. Il serait alors intéressant de vérifier *in vitro* et/ou *in vivo* si l'augmentation de la capacité à proliférer des cellules ostéoporotiques est en corrélation avec une augmentation de leur calcification. Il est fort probable qu'une augmentation au niveau du nombre de cellules osseuses disponibles puisse compenser ou du moins augmenter l'efficacité globale du processus de calcification. Dans ce sens, l'utilisation de l'appareil Bio-stim serait un atout considérable au traitement pharmacologique de l'ostéoporose.

#### SUGGESTIONS POUR LES PROCHAINES ÉTUDES AVEC L'APPAREIL BIO-STIM

- Exposition d'explants de calvarium de souriceaux (de 0 à 3 jours) aux champs électromagnétiques de différentes intensité.
- Exposition d'explants de calvarium de souris adultes (de 5 à 6 semaines) aux champs magnétiques de différentes intensités.
- Exposition de lignées cellulaires tumorales ou transformées aux champs magnétiques de différentes intensités.
- Exposition de souris porteuses de tumeurs aux champs magnétiques de différentes intensités.
- Exposition de lignées cellulaires provenant de sujets atteints d'ostéoporose aux champs magnétiques de différentes intensités afin de vérifier l'effet au niveau du processus de calcification.