

RAPPORT FINAL
T06.198-01.02

PROJET: EFFET *IN VIVO* DES CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES DE FAIBLE INTENSITÉ PRODUITS PAR L'APPAREIL **BIO-STIM** SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DE 3 SUJETS VOLONTAIRES NORMAUX.

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 vivo* des champs électromagnétiques de faible intensité produits par l'appareil **Bio-stim** sur l'état et le fonctionnement du système immunitaire de sujets volontaires normaux. Il existe deux volets principaux du système immunitaire: l'immunité humorale, véhiculée par les lymphocytes B et l'immunité cellulaire, sous le contrôle des lymphocytes T.

Les lymphocytes B sont des cellules dérivées de la moelle osseuse, que l'on retrouve principalement dans les ganglions lymphatiques, la rate et le sang. Elles sont responsables de la production d'anticorps (immunoglobulines) et constituent donc une ligne de défense importante contre les virus et les bactéries. Elles peuvent aussi être impliquées dans la production d'anticorps anticancéreux et dans le rejet des greffes. Une classe particulière de lymphocytes B peut, chez certains sujets être activée et produire des immunoglobulines de type E responsables des allergies (ex. allergie à l'herbe à poux). Lorsqu'un individu entre en contact avec un agent infectieux, certains lymphocytes B capables de reconnaître cet agent se mettent à proliférer. S'en suit plusieurs étapes de maturation cellulaire et production d'anticorps. Certains de ces lymphocytes B, que l'on appelle les "cellules B mémoire" seront conservés plusieurs années et pourront réagir très rapidement et fortement si un deuxième contact avec le même agent infectieux se produit.

Les lymphocytes T sont des cellules dérivées du thymus, organe dans lequel elles acquiert leur maturation. On les retrouve aussi dans la plupart des organes lymphoïdes et le sang. Ce groupe de lymphocytes est constitué de plusieurs sous-catégories dont les fonctions diffèrent considérablement. À leur sortie du thymus, les lymphocytes T acquiert le marqueur de surface CD3 qui est étroitement relié à la présence, sur la cellule, du récepteur d'antigène. Le récepteur d'antigène peut reconnaître les agents infectieux et les protéines modifiées, tel les protéines de cellules cancéreuses. Le marqueur CD3 est donc considéré comme étant un indice de maturation, indiquant que le lymphocyte T est apte à effectuer sa fonction, quelle qu'elle soit.

Parmi les autres marqueurs de surface, les plus importants sont sans conteste le CD4 et le CD8. Les cellules arborant le CD4 font partie du groupe des lymphocytes T "helper". Ces lymphocytes fonctionnent en interagissant avec les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité à la surface des autres cellules. Ils ont une fonction d'aide dans plusieurs réactions immunitaires comme l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, des cellules NK et des lymphocytes B pour la production de certains anticorps. Leur présence est essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire.

Les lymphocytes T faisant partie du groupe possédant le marqueur CD8 fonctionnent par interaction avec les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité et sont subdivisés en deux sous-groupes selon leur fonction; les T suppresseurs et les T cytotoxiques. Les lymphocytes T suppresseurs ont un rôle de gardien de l'homéostasie du système immunitaire. Ils veillent à ce que les réactions immunes ne prennent pas une ampleur trop élevée et sont responsables de la terminaison des réactions qui ne sont plus nécessaires. Ils sont de plus impliqués dans la tolérance des antigènes du soi, ce qui permet de maintenir l'autoimmunité à un niveau le plus bas possible. Les lymphocytes T cytotoxiques sont des cellules tueuses qui sont activées par les lymphocytes T "helper". Ils ont pour but principal de tuer les cellules infectées et/ou transformées par des virus. Ils jouent aussi un rôle principal dans le rejet des greffes et dans l'immunité antitumorale.

Une autre catégorie de lymphocytes un peu particuliers et possédant le marqueur de surface CD56, sont appelés cellules NK ou "natural killer". Ces cellules fonctionnent généralement sans restriction du complexe majeur d'histocompatibilité. Elles expriment une cytotoxicité naturelle envers les cellules tumorales et les cellules infectées par des virus et des bactéries. Elles participent de plus au phénomène d'ADCC (Antibody-Dependent Cell Mediated Cytotoxicity) qui est une des réponses du système immunitaire qui dépend de la présence d'anticorps. De nombreux articles et revues scientifiques traitent des propriétés et des possibilités de l'activité des cellules NK (1, 2,

3). **Ces cellules font donc partie de notre première ligne de défense contre l'envahisseur, qu'il soit viral, bactérien ou tumoral.** En effet, il est prouvé que l'activité des cellules NK augmente spontanément chez un individu qui développe une infection bactérienne et/ou virale et que cette activité est d'une grande importance pour le processus de guérison (4, 5, 6, 7). Le même phénomène est rapporté lors du développement de différentes tumeurs cancéreuses telles le carcinome colorectal, le carcinome de l'œsophage, du sein, les ostéosarcomes et autres tumeurs (8, 9, 10, 11). Chez les sujets normaux, l'activité NK diminue en fonction de l'âge. Cette diminution n'est toutefois pas associée à une diminution du nombre absolu de cellules NK (12). Il semble que dans une certaine proportion de la population vieillissante, la perte de l'activité NK soit étroitement associée à des épisodes infectieux sévères et même au décès suite à ces infections (12). Chez les sujets plus jeunes, certains états et/ou pathologies (anesthésie générale, infection au HIV, chimiothérapie, stress) peuvent être associés à une perte ou diminution de l'activité ou encore du nombre de cellules NK (8, 13, 14, 15, 16). Une baisse de l'activité NK est généralement associée à une augmentation du risque d'infection et de développement d'un tumeur ou encore de dissémination des métastases (12, 13, 16). La stimulation thérapeutique des cellules NK bien qu'encore au stade de développement constitue une avenue de recherche importante (17). Certains produits comme les superantigènes tel le MAM (mitogène dérivé de *Mycoplasma arthritidis*) (18), l'interféron-alpha (13, 15), le thymostimulin (19) ou encore le SCF (Stem Cell Factor) (20) stimulent efficacement l'activité des cellules NK *in vitro* et/ou *in vivo*.

Chacune de ces différentes catégories de cellules immunitaires possède une importance capitale au sein du système immunitaire. Toutefois, il faut garder en perspective que c'est l'équilibre qui existe entre ces différentes composantes qui nous permet d'élaborer une immunité saine et efficace.

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

L'exposition des sujets au champs électromagnétique a été effectué durant 4 semaines consécutives, à raison de 15 minutes par jour, à l'aide des anneaux de

l'appareil Bio-stim. Les paramètres du champs utilisé sont une amplitude de 6, une fréquence de 60 Hz et une modulation de 2. Les anneaux ont été disposés de la façon présentée à la Figure 1, le sujet étant assis sur une chaise non métallique.

L'anneau inférieure est placée à la hauteur des fesses et l'anneau supérieure est placée à la hauteur des seins. Pour les deux anneaux, le nord est orienté vers le haut. Une distance d'environ 30 cm est maintenue entre les deux anneaux. Des lectures de l'intensité du champs électromagnétique produit au niveau des anneaux, au dessus, en dessous et entre les anneaux ont été effectuées et sont présentées au Tableau 2 dans la section résultats.

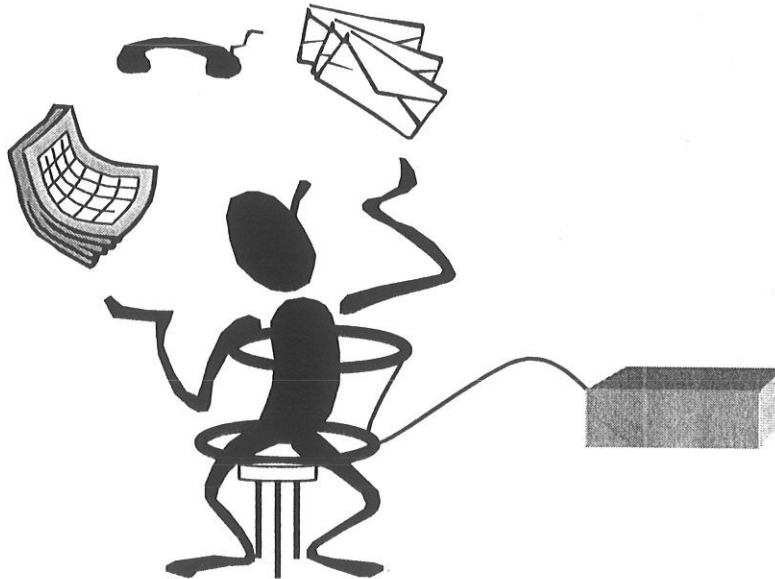


Figure 1 : Disposition des anneaux de l'appareil Bio-stim lors de l'exposition des sujets aux champs électromagnétiques de faible intensité.

PROFIL DES SUJETS :

Trois sujets ont été sélectionnés pour entériner l'étude. Les 3 sujets sont de sexe féminin et sont âgés de 25 à 40 ans (Tableau 1). Aucune maladie importante ou mauvais fonctionnement du système immunitaire ou autre n'était connu des sujets et/ou

n'a été diagnostiqué après le début de l'étude. Les effets secondaires ressentis par les sujets lors de l'utilisation des anneaux sont nuls ou négligeables (Tableau 1).

Tableau 1 : Profil des sujets sélectionnés pour l'étude et effets secondaires perçus lors du traitement avec l'appareil Bio-stim.

Sujets	Sexe	Âge	État Médical	Effets Secondaires Perçus
A.V.	F	26 ans	Normal, Non Fumeur	Aucun
L.R.	F	39 ans	Normal, Fumeur	Chatouillement et pression dans le dos au niveau de l'anneau, sommeil plus profond
C.M.	F	29 ans	Normal, Non Fumeur	Aucun

ÉVALUATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE :

Différents paramètres du système immunitaire ont été étudiés au cours des 4 semaines de traitement et durant la quatrième semaine après la fin des traitements.

1. Le compte total des globules blancs nous donne une évaluation globale de la quantité de cellules immunocompétantes disponibles.
2. L'immunophénotypage nous permet de discerner d'une façon précise la proportion des différents types de lymphocytes.
3. Finalement, l'évaluation de l'activité des cellules NK nous renseigne sur l'état d'activation basal des cellules.

ANALYSES STATISTIQUES :

L'analyse statistique utilisée pour déterminer la validité des résultats a été le test de Student pairé. La limite de confiance a été fixée pour une valeur de $P < 0.05$.

RESULTATS

La distribution de l'intensité du champs électromagnétique créé par les anneaux de l'appareil Bio-stim est résumée dans la Figure 2.

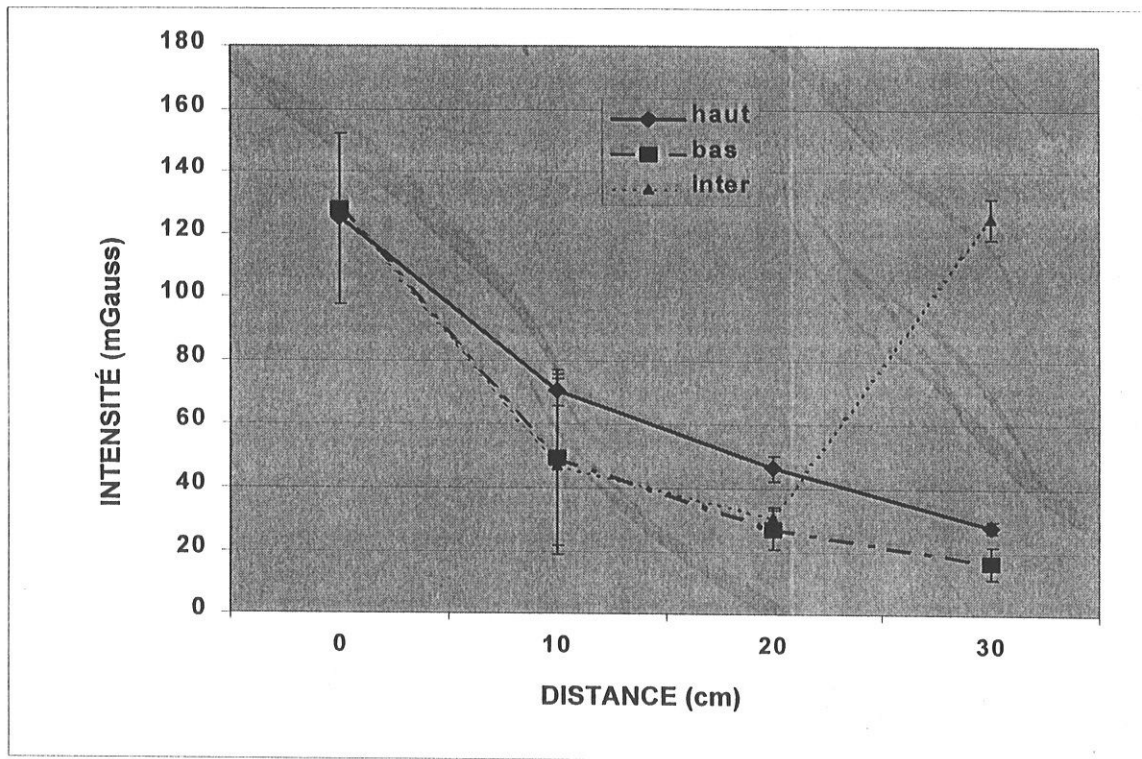


Figure 2: Variation de l'intensité du champs électromagnétique en fonction de la distance à partir des anneaux émetteurs de l'appareil Bio-stim.

L'intensité du champs perçu à la hauteur des anneaux est environ le même pour les deux anneaux, soit 125.0 ± 27.4 et 128.0 ± 27.7 mGauss pour l'anneau supérieur et inférieur respectivement (12.5 et 12.8 μ Tesla). La courbe d'atténuation du champs est semblable pour les deux anneaux, quoique légèrement plus douce pour l'anneau supérieur. Au delà de 30 cm, l'intensité du champs devient négligeable (résultat n'apparaissant pas dans la Figure 2).

Les Tableaux 2 et 3 résument la quantité des différents types cellulaires retrouvés dans le sang périphérique des sujets avant, durant et après le traitement. Aucune différence marquée n'est observée dans la quantité des différents types lymphocytaires étudiés au cours du traitement (Tableau 2). Toutefois, une légère tendance à l'augmentation, qui pourrait devenir significative lors d'une étude sur un plus grand nombre de sujets, est observée dans la population de lymphocytes B et de cellules NK dès la deuxième et quatrième semaine de traitement respectivement. Cette tendance à l'augmentation du nombre de cellules B et NK reflète la légère hausse observée dans les globules blancs totaux. Il est important de noter que ces tendances à la hausse sont réversibles; la quantité de lymphocytes B et de cellules NK reviennent à des valeurs équivalentes aux valeurs de départ 4 semaines après la fin des traitements.

Aucun changement majeur n'a pu être décelé dans les sous-populations de lymphocytes T (Tableau 3). Le ratio CD8/CD4 est demeuré très stable tout au long de la période de traitement et reste inchangé 4 semaines après la fin des traitements.

Le Tableau 4 illustre le niveau d'activité des cellules NK isolées du sang périphérique obtenu chez les mêmes sujets. Dès la deuxième semaine de traitement une augmentation significative de l'activité des cellules NK est observée. Cette augmentation devient par la suite hautement significative et perdure jusqu'à la quatrième semaine de traitement. Cependant, 4 semaines après la fin du traitement, le niveau d'activité des cellules NK est retour aux valeurs normales pré-traitement.

Tableau 2: Effet de l'exposition au champs électromagnétique sur la distribution des populations lymphocytaires du sang périphérique.

Cellules	Valeurs Normales	Pré-Exposition	2 Semaines	3 Semaines	4 Semaines	4 Semaines Post-Expos.
Globules Blancs Totaux	4836 ± 1000	4720	4000	4240	6100	4620
		5560	6660	4280	5060	3940
		3440	3540	8240	7000	5740
	Moyenne	4573 ± 1068	4733 ± 1684	5587 ± 2298	6053 ± 971	4767 ± 909
	<i>Valeur de P</i>	-	0.3949	0.3242	0.1671	0.4405
Lymphocytes Totaux	2031 ± 548	1888	1680	1471	2196	1848
		2252	2331	1297	1021	1252
		1324	1026	2620	2380	2353
	Moyenne	1821 ± 467	1679 ± 653	1796 ± 719	1866 ± 737	1818 ± 551
	<i>Valeur de P</i>	-	0.1685	0.4867	0.4768	0.4977
Lymphocytes T (CD3)	1535 ± 448	1221	929	951	1515	1106
		1195	1505	875	708	840
		920	776	1985	1832	1828
	Moyenne	1112 ± 167	1070 ± 384	1270 ± 620	1352 ± 580	1258 ± 511
	<i>Valeur de P</i>	-	0.4191	0.3802	0.3069	0.3712
Lymphocytes B	247 ± 135	170	161	163	311	174
		99	125	80	65	68
		66	122	369	311	292
	Moyenne	112 ± 53	136 ± 22	204 ± 149	229 ± 142	178 ± 112
	<i>Valeur de P</i>	-	0.1623	0.2367	0.1431	0.1431
Cellules NK	194 ± 91	166	178	147	234	166
		131	168	130	118	154
		124	73	94	311	71
	Moyenne	140 ± 23	140 ± 58	124 ± 27	221 ± 97	130 ± 52
	<i>Valeur de P</i>	-	0.4910	0.0937	0.1497	0.3501

Tableau 3: Effet de l'exposition au champs électromagnétique sur les sous populations de lymphocytes T.

Phénotypes	Valeurs Normales	Pré-Exposition	2 Semaines	3 Semaines	4 Semaines	4 Semaines Post-Expos.
Lymphocytes T (CD4)	597 ± 378	745	552	578	906	473
		851	1077	625	516	633
		708	613	1624	1451	858
	Moyenne	768 ± 74	747 ± 287	942 ± 591	958 ± 470	655 ± 193
	Valeur de P	-	0.4426	0.3424	0.3023	0.2414
Lymphocytes T (CD8)	489 ± 232	402	326	326	527	264
		303	585	228	174	219
		182	145	361	333	179
	Moyenne	296 ± 110	285 ± 125	305 ± 69	345 ± 177	221 ± 43
	Valeur de P	-	0.4240	0.4612	0.3192	0.0980
Ratio CD8/CD4	0.51	0.54	0.59	0.58	0.58	0.56
		0.36	0.36	0.36	0.34	0.36
		0.26	0.24	0.23	0.23	0.21
	Moyenne	0.39 ± 0.14	0.40 ± 0.18	0.39 ± 0.18	0.38 ± 0.18	0.38 ± 0.18
	Valeur de P	-	0.3392	0.4423	0.4464	0.3392

Tableau 4: Effet de l'exposition au champs électromagnétique sur l'activité des cellules NK.

	Valeurs Normales	Pré-Exposition	2 Semaines	3 Semaines	4 Semaines	4 Semaines Post-Expos.
% d'Activité NK (Ratio 1:1)	54 ± 11	58	60	68	65	54
		35	40	50	40	34
		42	48	54	49	48
	Moyenne	45 ± 12	49 ± 10	57 ± 9	51 ± 13	45 ± 10
	Valeur de P	-	0.0345	0.0068	0.0054	0.4603

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il ressort clairement de cette étude que l'exposition de sujets volontaires normaux à un champs électromagnétique (d'une amplitude de 6, une fréquence de 60 et une modulation de 2) pendant 15 minutes par jour pour une durée de 28 jours consécutifs, a significativement augmenté l'activité des cellules NK tout au long du traitement (Tableau 4). L'effet du champs électromagnétique sur la quantité de cellules lymphocytaires est toutefois moins évident. Il faut cependant prendre en considération le nombre restreint de sujets inclus dans cette étude. Il est fort probable que les tendance à l'augmentation observées dans les cellules B et NK en cours de traitement s'avèrent réelles lorsque l'étude sera effectuée sur un plus grand nombre de personnes. Toutefois, il est possible que l'activité des cellules NK puisse être augmentée sans que la quantité de cellules ne soit affectée. Une observation importante, concernant à la fois la quantité des différents types cellulaires et l'activité NK, est le retour aux valeurs normales de départ pour chacun des 3 sujets de l'étude 4 semaines après la fin des traitements. Ceci signifie que l'effet de l'appareil BIO-stim sur le système immunitaire est transitoire et/ou réversible. Les modifications de l'activité des cellules causées par le champs électromagnétique utilisé dans cette étude ne semblent pas être permanentes et le retour à l'activité normale des cellules se produit suite à la cessation de l'utilisation de l'appareil Bio-stim. Une autre observation rassurante est faite concernant le ratio de lymphocytes T CD8/CD4 qui est demeuré stable durant la totalité du traitement et était toujours stable 4 semaines après sa fin. En effet, la stabilité de ce ratio est primordiale à l'homéostasie du système immunitaire, tant humoral que cellulaire. Le fait qu'aucune modification de ce ratio n'ait été enregistré appuie l'innocuité du traitement donné aux sujets normaux.

Nous considérons que le traitement au champs électromagnétiques de faible intensité produit par l'appareil **Bio-stim** pourrait constituer un modulateur de certaines composantes du système immunitaire. L'amplitude, la fréquence et la modulation utilisés dans cette étude (6, 60 et 2 respectivement), équivalent à environ 125 mGauss ou 12.5 μ Tesla, a augmenté d'une façon significative et réversible l'activité des cellules

NK. Comme ces cellules constituent un pivot dans l'immunité anti-tumorale et anti-infectieuse, il serait grandement intéressant de moduler avec l'appareil Bio-stim, l'activité de ces cellules chez des sujets atteints de cancer par exemple, afin d'augmenter leur immunité naturelle. De plus, puisque l'homéostasie des population cellulaires est conservée tout au long de l'étude, le traitement avec l'appareil Bio-stim semble faire partie de la ligne douce des immunomodulateurs qui stimulent certains types cellulaires sans pour autant agir au détriment des autres types cellulaires et de l'équilibre du système immunitaire.

SUGGESTIONS POUR LES PROCHAINES ÉTUDES

- Reprendre l'étude avec 10 volontaires normaux (5 hommes et 5 femmes si possible).
- Faire une étude informatisée pour identifier les maladies ou les conditions cliniques les plus aptes à répondre à nos critères de sélection (ostéoporose, sclérose en plaque, cancer).
- Vérifier l'effet du système Bio-stim sur la prolifération de différents types de lignées cellulaires cancéreuses.
- Vérifier l'effet du système Bio-stim sur l'implantation et le développement de tumeurs chez la souris.

RÉFÉRENCES

1. *Trinchieri G.* Natural killer cells wear different hats : effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. **Semin. Immunol.**, **7 (2) : 83-88, 1995**
2. *Tay CH., Szomolanyi-Tsuda E., Welsh RM.* Control of infections by NK cells. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **230 : 193-220, 1998**
3. *Hunter CA.* How are NK cell responses regulated during infection? **Exp. Parasitol.**, **84(3) : 444-448, 1996**
4. *Unanue ER.* Macrophages, NK cells and neutrophils in the cytokine loop of Listeria resistance. **Res. Immunol.**, **147 (8-9) : 499-505, 1996**
5. *Hunter CA., Ellis-Neyer L., Gabriel KE., Kennedy MK., Grabstein KH., Linsley PS, Remington JS.* The role of the CD28/B7 interaction in the regulation of NK cell responses during infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **158 (5) : 2285-2293, 1997**
6. *See DM., Khemka P., Sahl L., Bui T., Tilles JG.* The role of natural killer cells in viral infections. **Scand. J. Immunol.**, **46 (3) : 217-224, 1997**
7. *Kageyama S., Matsui S., Hasegawa T., Yoshida Y., Sato H., Yamamura J., Kurokawa M., Yamamoto H., Shiraki K.* Augmentation of natural killer cell activity induced by cytomegalovirus infection in mice treated with FK506. **Acta Virol.**, **41 (4) : 215-220, 1997**
8. *Orsi AJ., Tax AW., Nuamah I., Barsevick A., McCorkle R.* Natural killer cells over time in patients with colorectal cancer. **Cancer Pract.**, **4 (5) : 252-257, 1996**
9. *Bruns C., Schäfer H., Wolfgarten B., Pichlmaier H.* Effect of surgical trauma on NK cell activity in esophageal carcinoma after transmediastinal dissection vs. transthoracic en bloc resection. **Langenbecks Arch. Chir.**, **381 (3) : 175-181, 1996**
10. *Heiss MM., Fasol-Merten K., Allgayer H., Strohle MA., Tarabichi A., Wallner S. Eissner H., Jauch KW., Schildberg FW.* Influence of autologous blood transfusion on natural killer and lymphokine-activated killer cell activities in cancer surgery. **Vox Sanguinis**, **73 (4) : 237-245, 1997**
11. *Tarozzi A., Mariani E., Facchini A.* In vitro cytolytic activity of human NK cells against osteosarcoma cell lines. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, **71 (7-8) : 221-226, 1995**

12. Ogata K., Yokose N., Tamura H., Nakamura K., Dan K., Nomura T. Natural killer cells in the late decade of human life. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **84 (3) : 269-275, 1997**
13. Kutza J., Gratz I., Afshar M., Murasko DM. The effects of general anesthesia and surgery on basal and interferon stimulated natural killer cell activity of humans. **Anesth. Analg.**, **85 (4) : 918-923, 1997**
14. Ullum H., Gøtzsche PC., Victor J., Dickmeiss E., Skinhøj P., Pedersen BK. Defective natural immunity : an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. **J. Exp. Med.**, **182 (3) : 789-799, 1995**
15. Nair MP., Saravolatz LD., Schwartz SA. Selective inhibitory effects of stress hormones on natural killer (NK) cell activity of lymphocytes from AIDS patients. **Immunol. Invest.**, **24 (5) : 689-699, 1995**
16. Gabrielli A., Sambo P., Zhang ZX., Candela M., Savoldi S., Manzin A., Clementi M., Amoroso A., Sallberg M., Danieli G. Humoral immune response and natural killer activity in patients with mixed cryoglobulinemia. **Clin. Exp. Rheumatol.**, **13 (suppl. 13) : S95-S99, 1995**
17. Spector NH. Neuroimmunomodulation : a brief review. Can conditioning of natural killer cell activity reverse cancer and/or aging? **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, **24 (1 Pt. 2) : S32-S38, 1996**
18. D'Orazio JA., Cole BC., Stein-Streilein J. Mycoplasma arthritidis mitogen up-regulates human NK cell activity. **Infect. Immun.**, **64 (2) : 441-447, 1996**
19. Meneses G., Delgado MA., Perez-Machado MA., Prieto A., Alonso R., Carrion F., Lanzas E., Alvarez-Mon M. Thymostimulin increases natural cytotoxic activity in patients with breast cancer. **Int. J. Immunopharmacol.**, **19 (4) : 187-193, 1997**
20. Fehniger TA., Carson WE., Mrozek E., Caligiuri MA. Stem cell factor enhances interleukin-2-mediated expansion of murine natural killer cells in vivo. **Blood**, **90 (9) : 3647-3653, 1997**