

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT
INERIS et INEM – UMR7355 CNRS

THÈSE présentée par :

Camille Mougin

soutenue le : 30 juin 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Biologie Moléculaire et Cellulaire spécialité Neurosciences**

**Impact d'expositions aux champs
électromagnétiques du téléphone portable sur les
processus cellulaires de maturation et de
plasticité cérébrales et identification de
biomarqueurs d'effets cérébraux**

THÈSE dirigée par :

Mme BONNET Anne-Sophie

M. MORTAUD Stéphane

Chercheur INERIS, Unité de Toxicologie Expérimentale,
Verneuil-en-Halatte

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Mme PEREIRA DE VASCONCELOS Anne
M. LE DREAN Yves

Chercheur INSERM, Université de Strasbourg

JURY

Mme MURA Catherine Professeur,

M. MORTAUD Stéphane

Mme PEREIRA DE VASCONCELOS Anne

M. LE DREAN Yves

Université d'Orléans, Président du jury

Professeur, Université d'Orléans

Chercheur INSERM, Université de Strasbourg

Maître de Conférences des Universités, Université de
Rennes 1

M. STEPHAN-BLANCHARD Erwan

M. THUROCZY György

Maître de Conférence, Université de Picardie

Chef d'unité, Unité de Rayonnement Non-Ionisant, Centre
National de Santé Publique, Hongrie

*Je dédie ce travail à mes parents et ma sœur,
qui tout au long de ces années m'ont soutenue et encouragée.
Qu'ils sachent combien je les aime.*

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme Anne Pereira De Vasconcelos, Chercheur INSERM à l'Université de Strasbourg, et M. Yves Le Dréan, Maître de Conférences des Universités de Rennes, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir jugé ce travail.

Je tiens également à exprimer de sincères remerciements à Mme Catherine Mura, Professeur à l'Université d'Orléans, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. A M. Erwan Stephan-Blanchar, Maître de Conférences à l'Université de Picardie, et M. György Thuroczy, Chef de l'Unité de Rayonnement Non-Ionisant du Centre National de Santé Publique d'Hongrie, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je voudrais remercier grandement ma directrice de thèse, Anne-Sophie Villégier, et mon co-directeur de thèse, Stéphane Mortaud, pour avoir accompagnés et encadrés ce travail durant ces trois années. Merci de m'avoir fait confiance, cela n'a pas toujours été simple, surtout au démarrage ! Merci pour votre disponibilité, vos encouragements et vos conseils.

Il m'est impossible d'oublier plusieurs personnes de l'équipe, sans qui ce travail n'aurait jamais été mené à son terme. Je tiens à remercier le Dr René de-Sèze et le Dr Brahim Selmaoui pour tous vos conseils lors de mon passage à l'INERIS. Céline, merci pour ta disponibilité, tes encouragements et tes précieux conseils pour la rédaction de mon article. Merci pour la livraison de crêpe les mercredis midi. Arnaud, merci d'avoir supervisé de loin mes présentations avec ton sens critique et tes précieux conseils. Anthony, merci pour ta curiosité, ta passion pour la recherche et nos longues discussions sur le sens de la vie.

Le destin met beaucoup de personnes sur notre chemin mais seules les meilleures restent. Celles avec qui nous entretenons des liens sincères et forts s'établissent dans notre vie et s'accrochent à notre cœur. Je ne sais comment exprimer la gratitude et la tendresse que je porte à Vanessa et Vidian. Merci pour votre disponibilité et votre écoute en toute circonstance que cela concerne la thèse ou non. Nos moments partagés au café, nos repas kebab et la « CANTINE TEAM » aura permis d'adoucir mes périodes de doutes et de stress.

Je tiens à remercier mes collègues thésards, Justyne, Chloé, Sarah, Asma, Jasmina, Thi Cuc et Ibtihel, pour m'avoir accompagnée durant ces trois années de thèse. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je pense également à la Team IUT : Thibaut, Florine, Maude, Amilue, Adrie, Sophie, Julien et Quentin. Une pensée particulière à mes deux grandes sauterelles : Zorz et Marine. Merci d'avoir toujours été là pour moi dans les bons et les mauvais moments.

Merci à Micka et Vincent. Mes amis du game. Merci d'avoir aiguillé mes soirées et apaisé mes chagrins. On se voit à la table Dofus du mariage de Micka !

Merci à mes amis Rochelais. Julien, Laurine, Seb, Bastien, Dom et Didine vous m'avez poussé à réussir. Une pensée particulière à Clauclau et JR ! Vous êtes des êtres exceptionnels.

Je veux enfin remercier l'ensemble de ma famille. Je vous dédie ces trois années. Merci à mon père pour ses conseils. Merci à ma mère pour son soutien et nos nombreux appels pour tout et rien. Merci à ma sœur, et son compagnon, d'avoir toujours été présents.

Résumé

Au cours des dernières décennies, l'exposition aux champs électromagnétiques radiofréquences (CEM-RF) a fortement augmenté en raison du développement rapide des technologies. Les effets possibles des CEM-RF sur la santé des organismes immatures soulèvent des questions, notamment sur les risques de tumeur et sur un neurodéveloppement perturbé.

Nous avons cherché à déterminer les effets des niveaux environnementaux et des niveaux élevés d'expositions CEM-RF sur l'intégrité et la différenciation des cellules souches neurales (NSCs) murines.

Des cultures in vitro de NSCs ont été réalisées à partir de souris C57BL/6JRj. Les NSCs ont été exposées dans un système par Wire Patch Cell avec un signal mobile GSM 900 MHz (1/8 Duty-cycle 216 Hz) à 0, 0,083 ou 2 W/kg pendant 3 ou 7 jours. La génotoxicité, la prolifération et la viabilité cellulaire ont été évaluées. La différenciation cellulaire a été évaluée à l'aide de marqueurs spécifiques ainsi que la croissance cellulaire. Enfin, une approche moléculaire a été réalisée par une analyse transcriptomique.

Nos résultats indiquent une augmentation du nombre de cassures d'ADN double brin sur les cellules exposées aux CEM-RF par rapport aux cellules non exposées. Nos données suggèrent une réduction de la croissance cellulaire et de la viabilité cellulaire sur les cellules exposées aux CEM-RF par rapport aux cellules non exposées. Aucun effet des CEM-RF n'a été montré sur la différenciation des NSCs en progéniteurs intermédiaires. Cependant, un effet des CEM-RF a été montré sur la différenciation des progéniteurs intermédiaires en cellules cérébrales avec notamment une réduction du nombre d'astrocytes. Par ailleurs, un phénomène d'apoptose a été observé ainsi qu'une augmentation des progéniteurs d'oligodendrocytes proliférants. Les résultats de transcriptomique mettent en évidence un changement dans les profils d'expression avec notamment la dérégulation de gènes en lien avec la différenciation cellulaire, la neurogenèse, l'homéostasie calcique, le transport d'ion et de neurotransmetteur ou encore la réponse à un stress oxydatif. Certaines voies perturbées suggèrent une atteinte au niveau locomoteur.

Ces données suggèrent donc que les NSCs peuvent souffrir et modifier leur différenciation en réponse aux expositions CEM-RF. Une prolifération d'oligodendrocytes plus élevée avec une génotoxicité accrue ainsi qu'un nombre réduit d'astrocytes pourraient être des mécanismes potentiels sous-jacents, respectivement, aux effets cancérogènes et aux anomalies neurodéveloppementales. Ces données confirment la fragilité soupçonnée des cellules immatures en réponse aux expositions CEM-RF.

Mots clé : Radiofréquence, Cellules Souches Neurales, Zone ventriculaire-sous-ventriculaire, Stress génotoxique, Différenciation Cellulaire, Transcriptomique

Abstract

In recent decades, exposure to radio frequency electromagnetic fields (RF-EMF) has increased sharply due to the rapid development of technologies. The potential effects of EMF-RF on the health of immature organisms raise questions, including the risk of tumours and impaired neurodevelopment.

We sought to determine the effects of environmental levels and high levels of EMF-RF exposures on the integrity and differentiation of murine neural stem cells (NSCs).

In vitro cultures of NSCs were conducted from C57BL/6JRj mice. The NSCs were exposed in a system by Wire Patch Cell with a 900 MHz GSM mobile signal (1/8 Duty-cycle 216 Hz) at 0, 0.083 or 2 W/kg for 3 or 7 days. Genotoxicity, proliferation and cell viability have been. Cell differentiation was evaluated using specific markers as well as cell growth. Finally, a molecular approach was carried out by a transcriptomic analysis.

Our results indicate an increase in the number of double-strand DNA breaks in cells exposed to RF-EMF compared to cells not exposed. Our data suggest a reduction in cell growth and cell viability in cells exposed to RF-EMF compared to those not exposed. No effect of RF-EMF has been shown on the differentiation of SBNs into intermediate progenitors. however an effect of RF-EMF has been shown on the differentiation of intermediate progenitors in brain cells with a reduction in the number of astrocytes. In addition, an apoptosis phenomenon was observed as well as an increase in offspring of proliferating oligodendrocytes. Transcriptomic results show a change in expression patterns including gene deregulation related to cell differentiation of neurogenesis, calcium homeostasis, ion and neurotransmitter transport or the response to oxidative stress. Some disturbed pathways suggest damage to the locomotor system.

These data therefore suggest that NSCs may suffer and alter their differentiation in response to RF-EMF exposures. A higher proliferation of oligodendrocytes with increased genotoxicity and a reduced number of astrocytes could be potential underlying mechanisms, respectively, for carcinogenic effects and neurodevelopmental abnormalities. These data confirm the suspected fragility of immature cells in response to EMF-RF exposures

Keywords: Radiofrequency, Neural Stem Cells, Ventricular-sub-ventricular zone, Genotoxic stress, Cell differentiation, Transcriptomic

Sommaire

Remerciements.....	2
Résumé	4
Abstract	5
Sommaire.....	6
Productions scientifiques.....	10
1. Publications scientifiques	10
2. Communications Orales	10
3. Communications Affichées.....	10
Liste des figures et des tableaux.....	11
1. Liste des figures.....	11
2. Liste des tableaux.....	13
Liste des abréviations	15
Avant-propos	18
Objectifs de la thèse	20
Partie 1 : Introduction	22
Chapitre 1 : Les Radiofréquences	25
1. Généralités et physique des ondes électromagnétiques (EM)	25
1.1. Le champ électromagnétique (CEM).....	25
1.1.1. Le champ électrique (E).....	25
1.1.2. Le champ magnétique (CM).....	25
1.2. Caractérisation d'une onde électromagnétique	26
1.3. Le spectre électromagnétique	27
1.3.1. Rayonnements ionisants	28
1.3.2. Rayonnements non-ionisants.....	29
2. Les radiofréquences (RF) : la téléphonie mobile	30
2.1. Généralités et utilisation du téléphone portable en chiffres	30
2.2. Téléphonie mobile : évolution des réseaux	30
2.2.1. Evolution du réseau cellulaire : de la première (1G) à la cinquième génération (5G)	30
2.2.2. Fonctionnement et signaux de la téléphonie mobile.....	31
2.2.3. La couverture géographique : le réseau GSM	32
2.3. Utilisation du téléphone portable en chiffres	33
3. Effets biologiques et mesures	34
3.1. Interaction entre les CEM et la matière vivante	34
3.2. Distinction effets thermiques et non thermiques.....	35
3.2.1. Les effets thermiques.....	35
3.2.2. Les effets non thermiques	35
3.3. Dosimétrie et réglementation.....	36
3.3.1. Formulation théorique	36
3.3.2. Méthode d'évaluation du DAS	37
3.3.3. Normes et législation	39
Chapitre 2 : Enfant et exposition aux CEM	40

1. Spécificités de l'exposition des enfants aux CEM	40
1.1. Influence des propriétés diélectriques : permittivité et conductivité	40
1.1.1. <i>Variation des propriétés diélectriques avec l'âge</i>	41
1.1.2. <i>Impact des variations des propriétés diélectriques sur le DAS</i>	42
1.2. Influence des différences morphologiques avec l'âge	43
1.2.1. <i>Exposition des fœtus</i>	43
1.2.2. <i>Exposition du crâne</i>	43
2. Rappels physiologiques sur le développement de l'enfant	45
2.1. Le développement cérébral humain	45
2.1.1. <i>Généralités</i>	45
2.1.2. <i>Les principales étapes du développement cérébral</i>	46
2.1.3. <i>Le développement structural</i>	47
2.2. Le développement de la barrière hématoencéphalique	49
2.2.1. <i>Rappels et définitions</i>	49
2.2.2. <i>Le développement</i>	50
Chapitre 3 : Neurogenèse	51
1. La neuro-gliogenèse	51
1.1. Neuro-gliogenèse embryonnaire	52
1.2. Neuro-gliogenèse adulte	54
1.2.1. <i>Zone ventriculaire/sous-ventriculaire</i>	54
1.2.2. <i>Zone sous-granulaire de l'hippocampe</i>	59
1.3. Voie de régulation de la neurogenèse	61
1.3.1. <i>La voie Notch</i>	61
1.3.2. <i>La voie Hedgehog</i>	62
1.3.3. <i>La voie Wnt</i>	63
1.3.4. <i>Les facteurs de transcription</i>	66
1.3.5. <i>Les morphogènes BMPs</i>	67
1.3.6. <i>Les neurotransmetteurs</i>	69
1.3.7. <i>Les facteurs neurotrophiques et les facteurs de croissance</i>	71
2. Les troubles et modulations physiopathologiques de la neurogenèse	72
2.1. Lors de la neurogenèse développementale	72
2.1.1. <i>Défauts de prolifération des progéniteurs</i>	72
2.1.2. <i>Défauts de migration neuronales</i>	74
2.2. Lors de la neurogenèse adulte	76
2.2.1. <i>Stimulation par l'enrichissement, l'exercice ou la gestation</i>	76
2.2.2. <i>Reprise de la neurogenèse après un accident vasculaire cérébral ischémique</i>	77
2.2.3. <i>Vieillesse des niches neurogéniques</i>	78
2.3. Effets connus des rayonnements ionisants sur la neurogenèse	79
2.3.1. <i>Irradiation du SNC</i>	79
Chapitre 4 : Effets des RF du téléphone portable chez l'enfant et recherche des mécanismes de neurotoxicité	81
1. Effets des RF du téléphone portable chez l'enfant	81
1.1. Données issues des modèles animaux	81

1.1.1.	<i>Eléments de comparaison entre le développement cérébral chez les animaux de laboratoire et chez l'Homme</i>	81
1.2.	Etudes sur le système nerveux	82
1.2.1.	<i>Effets sur la BHE</i>	82
1.2.2.	<i>Effets sur la réponse cellulaire, le stress oxydant et la neuro-inflammation</i>	83
1.2.3.	<i>Synthèse et niveau de preuve concernant l'effet des RF sur le système nerveux</i>	85
1.3.	Effets sur la morphologie cérébrale	86
1.4.	Effets sur les fonctions cognitives et le comportement	87
1.4.1.	<i>Etudes chez l'Homme</i>	87
1.4.2.	<i>Etudes chez l'animal</i>	89
1.4.3.	<i>Synthèse et niveau de preuve concernant l'effet des radiofréquences sur le comportement et les fonctions cognitives</i>	91
1.5.	Etudes sur la cancérogenèse	92
1.5.1.	<i>Chez l'Homme</i>	92
1.5.2.	<i>Chez l'animal</i>	94
1.5.3.	<i>Synthèse et niveau de preuve concernant l'effet cancérigène des radiofréquences</i>	95
1.6.	Conclusion générale	96
2.	Recherche des mécanismes de neurotoxicité	97
2.1.	La réponse cellulaire dans le cerveau	97
2.1.1.	<i>Nombre, morphologie des neurones et mort cellulaire</i>	97
2.1.2.	<i>Calcium et plasticité cellulaire</i>	98
2.2.	Stress oxydant dans le cerveau	99
2.3.	Expression des protéines de choc thermiques et autophagie impliquant des protéines chaperonnes	100
2.4.	Expression de gènes à réponse précoce	101
2.5.	La réponse neuro-inflammatoire	101
	Partie 2 : Matériels et Méthodes	103
1.	Modèle in vitro de culture primaire de cellules souches neurales	104
1.1.	Modèle animal, étiologie et stabulation	104
1.2.	Préalable à la culture	104
1.3.	Dissection et mise en culture	104
1.4.	Repiquage et différenciation	106
2.	Exposition aux radiofréquences	107
2.1.	Installation	107
2.2.	Dosimétrie	108
2.3.	Protocole d'exposition	109
3.	Choix du DAS	110
4.	Immunocytochimie	110
4.1.	Principe	110
4.2.	Protocole	110
5.	Test de viabilité cellulaire	112
5.1.	Principe	112
5.2.	Protocole	112

6. Mesure de l'apoptose	113
6.1. Principe de la technique TUNEL	113
6.2. Protocole d'utilisation du kit Apoptag®	114
7. Test de génotoxicité	114
7.1. Principe	114
7.2. Protocole	115
8. Analyse du transcriptome	115
8.1. Préparation des ARN totaux	115
8.2. Séquençage d'ARN ou RNA-seq	116
8.2.1. Préparation des librairies	116
8.2.2. Analyses du séquençage et statistiques	116
9. Statistiques	117
Partie 3 : Résultats	118
1. Approche cellulaire	119
1.1. Contexte de l'étude	119
1.2. Résultats	119
1.2.1. Effets cytotoxiques des RF sur la culture primaire de NSCs issues de la V-SVZ	119
1.2.2. Effets génotoxiques des RF	126
1.2.3. Études des RF sur la différenciation neurogliale des NSCs	130
1.2.4. Recherche des mécanismes d'action	137
1.3. Schéma bilan	140
2. Approche transcriptomique	141
2.1. Contexte de l'étude	141
2.2. Analyse qualitative des échantillons	141
2.3. Analyse des résultats	145
2.3.1. Effets des RF après une exposition à 2,155 W/kg pendant 7 jours : analyse au jour 7	145
2.3.2. Effets des RF après une exposition à 2,155 W/kg pendant 7 jours : jour 10	153
2.3.3. Effets des RF après une exposition à 2,155 W/kg pendant 7 jours : analyse des effets immédiats maintenus, réversibles ou tardifs	160
Partie 4 : Discussion et perspectives	165
1. Choix du protocole	166
1.1. L'exposition aux RF	166
1.2. Les cellules souches neurales de la V-SVZ	167
2. Effets des RF sur le cycle cellulaire	168
3. Effets génotoxiques des RF	170
4. Effets des RF sur la différenciation cellulaire	171
5. Effets des RF sur l'expression des gènes	172
6. Hypothèses de mécanisme d'action	177
Conclusion	180
Annexes	181
Références Bibliographiques	230

Productions scientifiques

1. Publications scientifiques

2021 : Multiple effects of 900 MHz radiofrequency exposure on neural stem cells from the subventricular zone of newborn mice. Camille Mougin, Vanessa Larrigaldie, Céline Montécot-Dubourg, Stéphane Mortaud, Anne-Sophie Villégier. (*en préparation*)

2018 : Multiple effects of the herbicide glufosinate-ammonium and its main metabolite on neural stem cells from newborn mouse subventricular zone. Justyne Feat-Vetel, Vanessa Larrigaldie, Géraldine Meyer-Dilhet, Ameziane Herzine, Camille Mougin, Anthony Laugeray, Thierry Gefflaut, Olivier Richard, Valérie Quesniaux, Céline Montécot-Dubourg, Stéphane Mortaud. *NeuroToxicology* 2018 Oct; 69; 152:163, doi.org/10.1016/j.neuro.2018.10.001.

2. Communications Orales

Septembre 2021 : BioEM2021, Ghent, Belgique

Titre de la communication : Effects of in vitro exposures to 900MHz electromagnetic fields on neural stem cell integrity and differentiation. Camille Mougin, Stéphane Mortaud, Anne-Sophie Villégier.

Janvier 2020 : Séminaire des Doctorants, INERIS, Verneuille-en-Halatte, France.

Titre de la communication : Impact d'expositions aux champs électromagnétiques du téléphone portable sur les processus cellulaires de maturation et de plasticité cérébrales et identification de biomarqueurs d'effets cérébraux. Camille Mougin, Stéphane Mortaud, Anne-Sophie Villégier.

Décembre 2019 : Journée des Agents Physiques, Laboratoires Pérیتox, Amiens, France.

Titre de la communication : Effects of in vitro exposures to 900MHz electromagnetic fields on neural stem cell integrity and differentiation. Camille Mougin, Stéphane Mortaud, Anne-Sophie Villégier.

3. Communications Affichées

Septembre 2021 : BioEM2021, Ghent, Belgique

Titre du poster : Effects of in vitro exposures to 900MHz electromagnetic fields on neural stem cell integrity and differentiation. Camille Mougin, Stéphane Mortaud, Anne-Sophie Villégier.

Juin 2019 : Journée des Doctorants, INERIS, Verneuille-en-Halatte, France.

Titre du poster : Effect of in vitro radiofrequency exposure (900 MHz) on cell growth, genotoxicity and cellular differentiation of neural stem cells. Camille Mougin, Stéphane Mortaud, Anne-Sophie Villégier.

Septembre 2018 : Journée des Doctorants, INERIS, Verneuille-en-Halatte, France.

Titre du poster : Research of cellular alterations related to cerebral carcinogenesis induced by radiofrequency exposure. Camille Mougin, Stéphane Mortaud, Anne-Sophie Villégier.

Liste des figures et des tableaux

1. Liste des figures

Figure 1 : Représentation d'un champ électrique E (Adapté de la thèse de Nicolas Petitdant, 2015).	25
Figure 2 : Représentation d'une onde électromagnétique (d'après Bonn et Rochon, 1992).	26
Figure 3 : Spectre des ondes électromagnétiques (d'après http://www.champs-electro-magnetiques.com/).	28
Figure 4 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements ionisants (d'après irsn.fr).	29
Figure 5 : Fonctionnement de la téléphonie mobile (d'après linternaute.com).	32
Figure 6 : Couverture d'une surface géographique par un réseau GSM (Adaptée de "champs électromagnétiques et téléphonie mobile" ISSEP, 2003).	32
Figure 7 : Architecture du réseau GSM (d'après Girodon, 2002).	33
Figure 8 : Interaction entre rayonnements non ionisants et organismes vivants (d'après ANSES, 2013).	35
Figure 9 : Estimation du DAS par FDTD sur un rat soumis à un champ de 900 MHz (d'après Spathmann, 2012).	37
Figure 10 : Modèle numérique de rats (d'après le Brooks Air Force Base).	38
Figure 11 : Famille virtuelle, développée par IT'IS Foundation (Zurich, Suisse) pour une mesure numérique du DAS.	38
Figure 12 : Propriétés diélectriques des tissus de la peau et du cerveau en fonction de la fréquence (d'après ANSES, 2016).	40
Figure 13 : Permittivité relative des tissus en fonction de l'âge de l'enfant et de la fréquence d'émission (d'après Ibrani et al., 2001).	42
Figure 14 : Schéma des événements majeurs du développement cérébral (d'après Giedd, 1999).	46
Figure 15 : Maturation régionale de l'épaisseur du cortex de 4 à 21 ans (d'après Lenroot et Giedd, 2006).	47
Figure 16 : Volumes de matières grise et blanche et densité synaptique en fonction de l'âge.	48
Figure 17 : Composants cellulaires de la BHE (d'après Abbott et al., 2010).	49
Figure 18 : Zones de neurogenèse dans le cerveau d'un mammifère adulte (d'après Institut des neurosciences Paris-Saclay).	51
Figure 19 : Illustration des trois étapes de la neurulation (Adapté de Simoes-Costa et Bonner, 2015). ..	52
Figure 20 : Développement de la SVZ chez la souris (d'après Albert et Huttner, 2018).	53
Figure 21 : Coupe de cerveau de souris adulte et composition de la V-SVZ (d'après Riquelme et al., 2008).	54
Figure 22 : Cellules de l'épendyme du ventricule latéral (d'après Peschanski, 1999).	55
Figure 23 : Organisation de l'épendyme (d'après Lim et Alvarez-Buylla, 2014).	55
Figure 24 : Arrangement spatial des cellules B1 (d'après Fuentealba et al., 2012).	57
Figure 25 : Coupe de cerveau de souris adulte et composition de la SGZ (d'après Donegà et al., 2013).	60
Figure 26 : Effets de la voie Notch sur la différenciation des NSCs (d'après la thèse de Justyne Feat, 2018).	61
Figure 27 : Voie de signalisation Notch (d'après D'Souza et al., 2008).	62
Figure 28 : Voie de signalisation Hedgehog (d'après Petrova et Joyner, 2014).	63
Figure 29 : Voies de signalisation Wnt (d'après Oliva et al., 2013).	65

Figure 30 : Profils d'expression des lignées cellulaires neuronales postnatales et d'expression des marqueurs (d'après Rushing et Ihrle, 2016).	66
Figure 31 : Voie de signalisation des BMP (d'après Sagorny et al., 2012).	68
Figure 32 : Dualité fonctionnelle des BMP dans le système neural en cours de développement (d'après Sagorny et al., 2012).	69
Figure 33 : Contrôle homéostatique de la production des neuroblastes par le GABA et le glutamate (d'après Platel et al., 2007).	70
Figure 34 : Représentation du vieillissement de la SVZ murine (d'après Capilla-Gonzalez et al., 2015)... ..	79
Figure 35 : Développement cérébral chez le rat et l'Homme (modifié à partir d'Alling, 1985).	82
Figure 36 : Dissection et mise en culture (d'après la thèse de Justyne Feat, 2018).	106
Figure 37 : Système d'exposition par Wire Patch Cell (d'après Laval et al., 2000).	107
Figure 38 : Dosimétrie expérimentale et expérimentale (d'après Laval et al., 2000).	108
Figure 39 : Protocole d'exposition	109
Figure 40 : Protocole de l'immunocytochimie (d'après la thèse de Justyne Feat, 2018).	111
Figure 41 : Principe du test MTT de viabilité cellulaire.	112
Figure 42 : Principe de la technique TUNEL	113
Figure 43 : Détection d'une cassure double brin de l'ADN et mécanisme de réparation de la lésion. ...	115
Figure 44 : Effets d'une exposition aux RF sur la croissance cellulaire de cellules souches cérébrales <i>in vitro</i>	121
Figure 45 : Effets d'une exposition aux RF sur la prolifération cellulaire de cellules souches cérébrales <i>in vitro</i>	123
Figure 46 : Effets d'une exposition aux RF sur la viabilité cellulaire de cellules souches cérébrales <i>in vitro</i>	125
Figure 47 : Effets d'une exposition aux RF sur le stress génotoxique de cellules souches cérébrales <i>in vitro</i>	127
Figure 48 : Effets d'une exposition aux RF sur l'apoptose cellulaire de cellules souches cérébrales <i>in vitro</i>	129
Figure 49 : Marqueurs spécifiques pour les différentes populations de précurseurs présentes dans les cultures primaires de NSCs <i>in vitro</i> par immunocytochimie.....	130
Figure 50 : Effets d'une exposition aux RF sur la différenciation cellulaire de cellules souches cérébrales <i>in vitro</i> en cellules B1 et cellules C.	132
Figure 51 : Effets d'une exposition aux RF sur la différenciation cellulaire de cellules souches cérébrales <i>in vitro</i> en OPC et astrocytes.	134
Figure 52 : Augmentation des populations de neuroblastes et de cellules microgliales suite à une exposition aux RF.....	136
Figure 53 : Effets d'une exposition aux RF sur la prolifération cellulaire des OPC.....	138
Figure 54 : Effets d'une exposition aux RF sur l'apoptose cellulaire des astrocytes.	139
Figure 55 : Représentation schématique des effets des RF dans le modèle <i>in vitro</i> de V-SVZ.	140
Figure 56 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons SHAM et EXPO de NSCs <i>in vitro</i> de la V-SVZ.....	142
Figure 57 : Analyse des composantes principales (« Principal Component » ou PC).....	143
Figure 58 : Relation fonctionnelle entre les 176 gènes sous-exprimés impliqués dans les processus développementaux.....	146

Figure 59 : Relation fonctionnelle entre les 14 gènes sous-exprimés impliqués dans le potentiel d'action et la régulation du potentiel membranaire post-synaptique.	147
Figure 60 : Relation fonctionnelle entre les 64 gènes sous-exprimés impliqués dans le transport d'ion et de neurotransmetteurs.	148
Figure 61 : Relation fonctionnelle entre les 15 gènes sous-exprimés impliqués dans la voie Wnt.....	149
Figure 62 : Relation fonctionnelle entre les 43 gènes surexprimés impliqués dans la réponse à un stimulus.	150
Figure 63 : Relation fonctionnelle entre les 9 gènes surexprimés impliqués dans la régulation positive de la cascade MAPK.....	151
Figure 64 : Relation fonctionnelle entre les 9 gènes surexprimés impliqués dans l'homéostasie cellulaire du calcium.	152
Figure 65 : Relation fonctionnelle entre les 124 gènes sous-exprimés impliqués dans les processus développementaux.....	154
Figure 66 : Relation fonctionnelle entre les 25 gènes sous-exprimés impliqués dans le comportement.	155
Figure 67 : Relation fonctionnelle entre les 64 gènes sous-exprimés impliqués dans le transport d'ion et de neurotransmetteurs.	156
Figure 68 : Relation fonctionnelle entre les 95 gènes sous-exprimés impliqués dans la signalisation. ..	157
Figure 69 : Relation fonctionnelle entre les 40 gènes sous-exprimés impliqués dans l'adhésion cellulaire.	158
Figure 70 : Relation fonctionnelle entre les 38 gènes surexprimés impliqués dans la réponse à un stimulus.	159
Figure 71 : Relation fonctionnelle entre les 84 gènes communs sous-exprimés impliqués dans les processus développementaux.....	160
Figure 72 : Relation fonctionnelle entre les 29 gènes communs sous-exprimés impliqués dans le transport d'ion et de neurotransmetteurs.	161
Figure 73 : Relation fonctionnelle entre les 26 gènes communs sous-exprimés impliqués dans le comportement et l'apprentissage.	162
Figure 74 : Relation fonctionnelle entre les 60 gènes communs sous-exprimés impliqués dans la signalisation.	163
Figure 75 : Relation fonctionnelle entre les 29 gènes communs sous-exprimés impliqués dans l'adhésion cellulaire.	164
Figure 76 : 19 gènes communs surexprimés au jour 7 et au jour 10.	165
Figure 77 : Cellules à l'origine des glioblastomes	179

2. Liste des tableaux

Tableau 1 : Fréquences non-ionisantes.	29
Tableau 2 : Corrélation entre l'âge des rats et de l'Homme en fonction des différentes phases de la vie (d'après Quinn, 2005 ; Sengupta, 2013).	81
Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés en immunocytochimie et concentration d'utilisation.	112
Tableau 4 : Impact des RF sur la croissance cellulaire	119
Tableau 5 : Impact des RF sur la prolifération cellulaire	122

Tableau 6 : Impact des RF sur la viabilité cellulaire.....	124
Tableau 7 : Effets génotoxiques des RF	126
Tableau 8 : Effets des RF sur l'apoptose cellulaire	128
Tableau 9 : Effets des RF sur la différenciation cellulaire des cellules B1 et des cellules C.....	131
Tableau 10 : Effets des RF sur la différenciation cellulaire des OPC et des astrocytes.	133
Tableau 11 : Effets des RF sur la prolifération cellulaire des OPC.....	137
Tableau 12 : Nombre de gènes significativement modulés sur 16 échantillons de NSCs de la V-SVA en condition SHAM ou EXPO (ancien « cut-off »).....	144
Tableau 13 : Nombre de gènes significativement modulés sur 16 échantillons de NSCs de la V-SVA en condition SHAM ou EXPO (nouveau « cut-off »).	144

Liste des abréviations

5-HT : *sérotonine*

AMPA : *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic*

ANSES : *agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*

BHE : *barrière hémato-encéphalique*

bHMH : *basic helix-loop-helix*

BLBP : *brain lipid binding protein*

BMP : *bone morphogen protein*

BO : *bulbes olfactifs*

BrdU : *bromo-désoxy-uridine*

BSC : *Base Station Controlers*

BTS : *Base Transceiver System*

CamKIV : *Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase type IV*

CEM-FR : *champ électromagnétique radiofréquence*

Cellule A : *neuroblaste*

Cellule B1 : *cellule souche neurale de la V-SVZ*

Cellule C : *progéniteur intermédiaire*

Cellule : *épendymocyte*

cGMP : *cyclic guanosine monophosphate*

CREB : *cAMP Response Element-Binding Protein-1*

DA : *dopamine*

DAS : *débit d'absorption spécifique*

DBI : *Diazepam Binding Inhibitor*

DCX : *doublecortine*

DIV : *day in vitro*

Dll1 : *delta-like1*

Dlx2 : *distal-less*

Dvl : *Diseled*

EDGE : *Enhanced Date Rates for GSL Evolution*

EGF : *epidermal growth factor*

EGFR : *récepteur au facteur de croissance épidermique*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

EROs : *espèces réactives de l'oxygène*

FDMA : *Frequency Division Multiple Access*

FDTF : *Finite Difference Time Domain*

FGF : *fibroblast growth factor*

FOXO : *forkhead domain-containing transcription factor*

GABA : *acide γ aminobutyrique*

GFAP : *glial fibrillary acidic protein*

GLAST : *glutamate aspartate transporter*

GLT-1 : *glutamate transporter-1*

GPRS : *General Packet Radio Service*
 GPS : *Global Positionning System*
 GSK-3 β : *glycogen synthase kinase-3 β*
 GSM : *Global System for Mobil Communication*
 H₂O₂ : *peroxyde d'hydrogène*
 Hes : *Hairy and Enhancer of Split*
 Hh : *voie de signalisation Hedgehog*
 IGF : *insulin-like growth*
 iGluRs : *récepteurs ionotropiques au glutamate*
 ICNIRP : *International Commission of Non-Ionizing Radiation Protection*
 IP3 : *inositol triphosphate*
 IP3R : *récepteurs de l'IP3 du RE*
 IPC : *progéniteur cellulaire intermédiaire*
 Jag1 : *Jagged1*
 JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
 LCR : *liquide céphalo-rachidien*
 LRP : *low-density lipoprotein receptor-related proteins*
 LTE : *Long term Evolution*
 MCD : *malformation du développement cortical*
 mGluRs : *récepteurs métabotropiques au glutamate*
 MMS : *Multimedia Messaging Service*
 MnSOD : *manganese superoxyde dismutase*
 MRN : *complexe protéique MRe11-Rad50-Nbs1*
 MSC : *Mobile Switching Center*
 mTOR : *mammalian target of rapamycin*
 NECs : *cellules neuroépithéliales*
 Ngn2 : *neurogénine 2*
 NHEJ : *non-homologous end joining*
 NICD : *domaine intracellulaire de Notch*
 NMDA : *récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate*
 NO : *monoxyde d'azote*
 NOX : *NAD(P)H oxydase*
 NSCs : *neural stem cells*
 O₂⁻ : *anion superoxyde*
 OMS : *organisation mondiale de la santé*
 OPC : *progéniteurs immatures des oligodendrocytes*
 PDGF : *platelet-derived growth factor*
 PDK : *phosphoinositide-dependent protein kinase*
 PFA : *paraformaldéhyde*
 PLC : *phospholipase C*
 PLL : *poly-L-lysine*
 PI3K/Akt : *phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonin protein kinase*
 RBPj : *recombining binding protein suppressor of hairless*

RCPG : *récepteur à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G*

RE : *réticulum endoplasmique*

RF : *radiofréquence*

RGCs : *cellules de la glie radiaire*

RMS : *courant rostral migratoire*

RyR : *récepteur à la ryanodine*

S100 β : *sous-unité bêta de la protéine S100 fixant le calcium*

SGZ : *zone sous-granulaire*

SHH : *signaux Sonic Hedghog*

SMAD : *signaling mothers against decapentaplegic*

Smo : *protéine G Smoothened*

SMS : *Short Message Service*

SNC : *système nerveux central*

SVF : *sérum de veau fœtal*

SVZ : *zone sous-ventriculaire*

TCF/LEF : *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*

TBS : *tris buffer salin*

TGF- β : *transforming growth factor*

UMTS : *Universal Mobile Telemcommunication System*

VGLUT : *transporteur vésiculaire du glutamate*

VZ : *zone ventriculaire*

WCDMA : *Wideband Code Division Multiple Access*

Wnt : *Wingless*

γ H2AX : *phosphorylation de la variante H2AX de l'histone H2A*

Avant-propos

Les champs électromagnétiques et plus particulièrement les radiofréquences (RF) dont les fréquences se situent dans la gamme de 8,3 kHz à 300 GHz, sont devenues omniprésentes dans la vie moderne. Parmi les nouvelles technologies utilisant les RF, le téléphone portable n'a cessé d'évoluer et sa commercialisation d'augmenter. En effet, en janvier 2020, le nombre d'utilisateurs de mobiles dans le monde est de 5,19 milliards. Ce chiffre représente 67% de la population totale.

Ce développement a entraîné une augmentation du nombre de personnes exposées, du temps d'exposition moyen, et de la quantité de rayonnement absorbé. En parallèle, un certain nombre de consommateurs s'inquiète de plus en plus de l'impact de ces ondes électromagnétiques sur sa santé et ce quel que soit son âge. Du nourrisson (sujet en développement) à la personne âgée (sujet plus sensible) en passant par les enfants, les adolescents et les adultes (grands consommateurs de nouvelles technologies), toutes ces populations sont sujettes aux expositions RF. Par ailleurs, l'existence d'un faible risque pour la santé au niveau individuel pourrait malgré tout se traduire par des conséquences non négligeables au niveau d'une population. De nombreuses interrogations sont donc nées quant à la nocivité de cette technologie.

Le cerveau est l'un des organes le plus exposé lors de l'utilisation du téléphone. Les études expérimentales chez l'Homme se sont focalisées sur l'effet des RF sur la physiologie du système nerveux central et le cancer. Pourtant, ces études restent rares et leurs résultats demeurent parfois difficile à relier avec des effets faibles et non reproduits, d'où la nécessité de nouvelles études pour combler le déficit de connaissance.

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer l'impact neurobiologique des RF et plus précisément sur les processus cellulaires de maturation et de plasticité cérébrales et d'identification de biomarqueurs d'effets cérébraux.

L'ensemble des travaux de recherche réalisés dans ce contexte est synthétisé dans ce manuscrit. Le premier chapitre divisé en cinq parties est une synthèse bibliographique regroupant les différents thèmes abordés lors de cette thèse. La première partie aborde les généralités sur les ondes électromagnétiques, avec un intérêt particulier sur la téléphonie et les effets biologiques des champs électromagnétiques (CEM). La deuxième partie présente le développement cérébral chez l'enfant et les spécificités d'une exposition aux CEM chez ce jeune sujet. La troisième partie porte sur la neurogenèse lors du développement et à l'âge adulte, et ce plus précisément dans l'une des zones neurogéniques principales qu'est la zone ventriculaire/sous-ventriculaire (V-SVZ). Les voies de régulation impliquées dans la neurogenèse ainsi que l'impact de notre environnement sur la modulation neurogénique sont détaillés. Pour terminer ce chapitre, la cinquième partie se focalise sur les effets des RF chez l'enfant et la recherche des mécanismes de neurotoxicité.

Le deuxième chapitre correspond aux matériels et aux méthodes expérimentaux développés et mises en œuvre au cours de la thèse. La mise en place du modèle *in vitro* de cultures primaires de cellules

souches neurales (NSCs) issues de la V-SVZ de souris et les différents protocoles d'analyses de paramètres cellulaires et moléculaires y sont détaillés.

Le troisième chapitre organisé en deux parties porte sur les résultats obtenus au cours de ces travaux. La première partie est consacrée à l'effet des RF sur les paramètres généraux de culture, la différenciation cellulaire et la recherche de mécanismes d'action. La seconde partie regroupe les effets des RF sur les modifications des profils transcriptomiques des cellules souches neurales issues de la V-SVZ de souris.

Le quatrième chapitre est la discussion des différents résultats obtenus avec les perspectives de travail.

Objectifs de la thèse

Le cerveau est une structure complexe dont l'une des étapes critiques est l'intégration appropriée des différents types cellulaires pour former les structures cérébrales. Divers signaux de l'environnement tels que des substrats, des facteurs chémo-attractants/répulsifs ou encore des signaux d'attachement sont à l'origine des cellules dans la V-SVZ puis de leur migration vers leur destination finale. Un problème lors de la neurogenèse peut conduire à des désordres neurologiques importants. A long terme, l'intervention d'un agent toxique lors de ces phases pourrait avoir des conséquences.

L'impact des RF du téléphone portable sur la santé constitue une source d'inquiétude pour la société. Il en est d'autant plus vrai avec des expositions aux CEM RF apparaissant de plus en plus tôt, lors de l'adolescence, voire dès l'enfance. Expérimentalement, la plupart des études ont été menées sur des sujets à l'âge adulte et peu de données existent sur les sujets en cours de développement, bien que ces derniers soient classés sous la catégorie de population vulnérable. Des études récentes du laboratoire indiquent des perturbations comportementales chez le rat jeune adulte antérieurement exposé durant la gestation. Ainsi ce travail de thèse s'inscrit d'une part dans la suite des précédents travaux de l'équipe et d'autre part dans la problématique générale de l'étude des effets des ondes électromagnétique du téléphone portable sur le système nerveux. Les travaux se focalisent sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perturbation de la neurogenèse avec l'utilisation d'un modèle *in vitro*.

Le modèle *in vitro* de culture primaire de cellules souches neurales de souris permet l'étude des effets cellulaires et moléculaires d'un toxique. Le **premier objectif** a été de l'adapter pour répondre aux contraintes imposées par le système d'exposition. La neurogenèse a lieu dans deux zones neurogéniques composées de cellules souches neurales. La V-SVZ est la zone la plus importante de production de neuro-neurones à partir de la période post-natale jusqu'à l'âge adulte. Le modèle *in vitro* utilisé dans cette thèse correspond à une culture de cellules souches neurales monocouches permettant le suivi et l'analyse de nombreux paramètres cellulaires comprenant la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la viabilité et croissance cellulaire. De plus des aspects moléculaires ont été analysés via une approche transcriptomique. Les cellules issues de la V-SVZ de souris subissent différentes étapes de « sélection » avant d'être mise en culture. Ainsi, l'utilisation d'un milieu de culture spécifique (milieu complété en sérum de veau fœtal, SVF) permet d'orienter la différenciation des NSCs en cellules macrogliales. De ce fait, ce modèle permet d'étudier les effets d'une exposition aux RF sur différentes populations cellulaires composant la V-SVZ. Bien que ce modèle ne mime pas les interactions entre l'ensemble des composants de la V-SVZ (cellules macrogliales et épendymocytes), il est capable de déterminer les effets cellule-spécifique.

Le **deuxième objectif** de cette thèse est d'étudier les processus cellulaires de maturation et de plasticité cérébrales et d'identifier les biomarqueurs suite à une exposition aux RF. **L'hypothèse est que les RF pourrait avoir un impact sur la plasticité cérébrales et sur les voies de signalisation intracellulaires au travers de changement de la distribution et la perméabilité des membranes cellulaires aux ions, notamment le calcium.** En effet, tous les mécanismes impliqués dans la plasticité cérébrale sont très dépendants d'un maintien de l'homéostasie calcique. La plasticité cérébrale regroupe l'ensemble des mécanismes par lesquels le cerveau se modifie par l'expérience et les apprentissages et qui conduit à des

changements morphologiques et structuraux au sein de réseaux de neurones concernés. Ainsi, elle donne au cerveau la capacité de créer, défaire ou réorganiser les réseaux neuronaux et leurs connexions. Présente tout au long de la vie, elle est maximale pendant le développement. Les données des expositions RF chez les enfants ne permettent pas de conclure à l'existence ou non d'effet sur le développement. De plus, les recherches sur les mécanismes de neurotoxicité n'ont identifié aucune cible moléculaire. Ces conclusions peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des systèmes d'exposition, du temps d'exposition et du débit d'absorption spécifique (DAS) ou encore par la diversité des modèles biologiques souvent non adaptés. En effet, la majorité des études sont faites sur des cellules matures ou des modèles unicellulaires.

Les effets des RF sur les mécanismes de différenciation cellulaire sur ce modèle de culture ont été étudiés. Après une exposition aux RF, les différentes populations cellulaires obtenues ont été marquées par immunocytochimie et cytométrie en flux avec des marqueurs spécifiques puis quantifiées. L'utilisation de combinaisons de marqueurs a permis de déterminer spécifiquement les populations cellulaires ciblées et les mécanismes d'action impliqués.

Afin de rechercher les mécanismes d'action, les NSCs ont été exposées aux RF et une analyse transcriptomique a été réalisée. La caractérisation et la quantification du transcriptome permet l'identification des gènes actifs, de déterminer les mécanismes de régulation d'expression des gènes et de définir les réseaux d'expression des gènes. L'ensemble de nos données sont complexes car le modèle *in vitro* est composé d'un pool hétérogène de cellules ne permettant pas de déterminer précisément le ou les types cellulaires ciblés mais donne cependant une bonne vision globale des voies perturbées.

Partie 1 : Introduction

Chapitre 1 : Les Radiofréquences

1. Généralités et physique des ondes électromagnétiques (EM)

1.1. Le champ électromagnétique (CEM)

Le champ électromagnétique est une onde constituée d'un champ électrique et d'un champ magnétique perpendiculaires l'un à l'autre, oscillants et se propageant en ligne droite dans le vide ou dans un milieu. Selon la définition de Maxwell (1865), il correspond à l'influence, à distance, que peut exercer un objet sur son environnement.

1.1.1. Le champ électrique (E)

Un champ électrique est un champ de force invisible créé par l'attraction et la répulsion de charges électriques (ions, électrons). En effet, une particule chargée positivement ou négativement crée un champ électrique dû à l'attraction réciproque des charges de signes opposés et la répulsion réciproque des charges de mêmes signes.

Lorsque la charge est immobile, l'intensité du champ électrique ($\vec{E}$) se caractérise par la tension en volt (V) par rapport à la distance de la source en mètre (m). Cela se traduit par la formule ci-dessous :

$$\vec{E} = \frac{V}{m}$$

$\vec{E}$: Intensité du champ (V/m).

V : Tension (V).

m : Distance de la source (m).

Le champ électrique produit est réparti de façon sphérique autour de cette charge (Figure 1A).

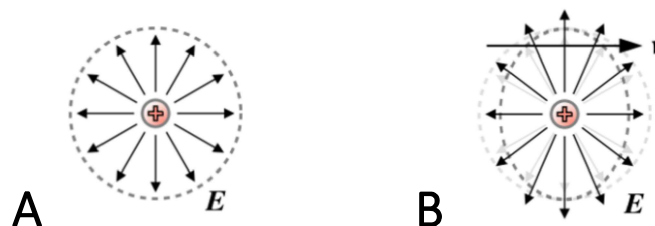


Figure 1 : Représentation d'un champ électrique E (Adapté de la thèse de Nicolas Petitdant, 2015).

(A) Autour d'une charge positive immobile

(B) Autour d'une charge positive en mouvement

1.1.2. Le champ magnétique (CM)

La notion de champ magnétique correspond à une région de l'espace soumise à l'action d'une force provenant d'une masse magnétique (aimant) ou d'une charge électrique en mouvement. Le déplacement de la charge déforme la répartition sphérique du champ électrique, ce qui crée un champ magnétique dont les forces exercées sont perpendiculaires à celles du champ électrique (Figure 1B).

Son intensité est exprimée en ampère par mètre (A/m). Toutefois, on utilise couramment aujourd'hui le tesla (T) et le plus souvent sa sous-unité le microtesla (μT). Il peut être défini, dans l'air, par l'approximation :

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$$

μ_0 : Perméabilité magnétique du vide.

$\vec{H}$: Champ magnétique produit par le courant électrique.

Dans l'air, comme dans la plupart des milieux, $\vec{B}$ est très proche de $\vec{H}$, $1 \text{ A/m} = 1,25 \mu\text{T}$.

1.2. Caractérisation d'une onde électromagnétique

Une onde électromagnétique est la résultante d'un champ électrique et d'un champ magnétique dont les amplitudes varient de façon sinusoïdale au cours du temps. En effet, le courant électrique utilisé dans un générateur est alternatif. Le mouvement des particules chargées varie donc dans le temps selon une fréquence donnée, créant un champ électrique dont les variations sont sinusoïdales. Les particules chargées sont en mouvement et créent donc un champ magnétique qui varie dans le temps de la même manière que le champ électrique. Dès lors, une onde électromagnétique est obtenue (Figure 2).

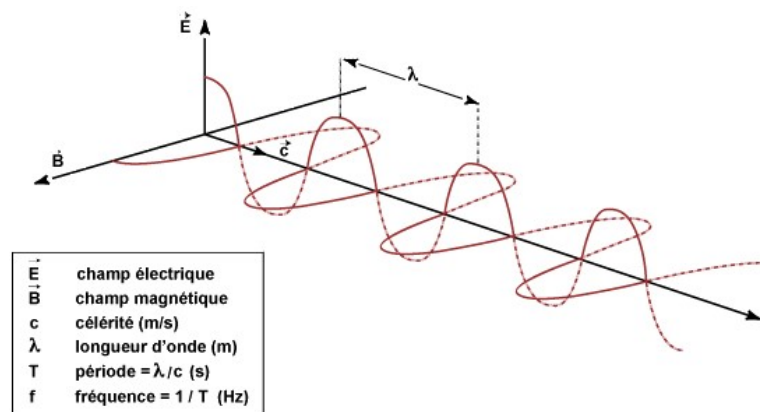


Figure 2 : Représentation d'une onde électromagnétique (d'après Bonn et Rochon, 1992).

L'onde électromagnétique se caractérise par plusieurs variables : la fréquence, la longueur d'onde, la période, l'intensité et la puissance du champ électrique.

Les variations d'intensité d'un champ présentent un caractère répétitif avec des cycles d'une durée constante. La fréquence (f) est le nombre de fois qu'un cycle ou oscillation se produit pendant une seconde. Elle s'exprime en hertz (Hz). Pendant un cycle, l'onde parcourt une distance que l'on appelle longueur d'onde (λ), exprimée en nanomètres (nm). La longueur d'onde et la fréquence sont inversement proportionnelles et unies par la relation suivante :

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

λ : Longueur d'onde (m).

f : Fréquence de l'onde (Hz).

c : Vitesse de la lumière (3.10^8 m/s).

De ce fait, plus la fréquence est petite, plus la longueur d'onde est élevée et réciproquement.

Parallèlement à son comportement ondulatoire, l'onde électromagnétique présente également des propriétés corpusculaires. Ainsi, toute onde électromagnétique est caractérisée par le transport d'un flux d'énergie associé à une particule de masse nulle, appelée le photon, se déplaçant à la vitesse de la lumière. Chaque photon transporte ainsi un quantum d'énergie proportionnel à la fréquence de l'onde électromagnétique considérée. Cette énergie est d'autant plus grande que la fréquence est élevée.

La relation suivante exprime la quantité d'énergie (E) associée à un photon en fonction de la fréquence de l'onde :

$$E = hf$$

E : Énergie du photon, exprimée en joule (J) ou en électronvolt (eV) ($1eV = 1.602.10^{-19}J$).

h : Constante de Planck ($6.62.10^{-34} J.s$).

f : Fréquence de l'onde (Hz).

Par ailleurs, E est liée à la longueur d'onde par la formule suivante :

$$E = hf = \frac{hc}{\lambda} = \frac{1,24.10^{-6}}{\lambda}$$

E : Énergie du photon, exprimée en joule (J) ou en électronvolt (eV) ($1eV = 1.602.10^{-19}J$).

h : Constante de Planck ($6.62.10^{-34} J.s$).

f : Fréquence de l'onde (Hz).

c : Vitesse de la lumière ($3.10^8 m/s$).

λ : Longueur d'onde (m).

Toutes ces caractéristiques permettent d'établir une représentation en fonction de la longueur d'onde et de la fréquence des ondes EM : le spectre électromagnétique.

1.3. Le spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique représente la répartition des ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde, de leur fréquence ou bien encore de leur énergie. Il regroupe des fréquences allant de 0 Hz à 10^{18} GHz pour des longueurs d'onde de plusieurs milliers de km à quelques dixièmes de μm (Figure 3). Il existe des CEM naturels et des CEM artificiels.

Bien que non visibles par l'œil humain, des champs électromagnétiques naturels sont présents dans notre environnement. Ainsi, l'apparition en certains points de l'atmosphère de charges électriques sous l'influence d'orages donne naissance à un champ électrique. En effet, il existe une différence de potentiel entre l'atmosphère et le sol. Des charges électriques de la terre quittent en permanence le sol vers l'atmosphère. Cela crée donc un champ électrique continu de l'ordre de 100 à 150 V/m. Régulièrement toutefois les orages assurent, via la foudre, le retour de ces charges vers le sol ce qui maintient un équilibre global. Sous un nuage d'orage, le champ électrique peut atteindre 10 kV/m. Le champ magnétique terrestre est un autre exemple de CEM naturel. La Terre s'entoure d'un champ magnétique, qui est généré par les mouvements du magma fluide qui se trouve dans le noyau externe. Comme les mouvements qui se développent sont dans un milieu chaud, ce magma remonte vers la surface du globe dans un mouvement hélicoïdal suite à la rotation de la Terre. De façon plus surprenante, le corps humain est également source de rayonnement électromagnétique naturel. En effet, on peut

mesurer le champ électromagnétique émis par le cerveau avec un électro-encéphalogramme ou encore le champ émis par le cœur avec un électrocardiogramme. Par ailleurs, lorsqu'un être vivant est exposé à un champ électromagnétique, des courants et des tensions sont créés dans le corps.

Les CEM non naturels, provenant de l'activité humaine, sont majoritairement émis par les systèmes électriques, que ce soit par simple consommation électrique (le passage du courant générant un CEM par le déplacement des charges) ou dans le but de générer un CEM spécifique. En conséquence, l'Homme est exposé à un vaste spectre de CEM. Ces CEM peuvent correspondre à des rayonnements ionisants ou à des rayonnements non-ionisants.

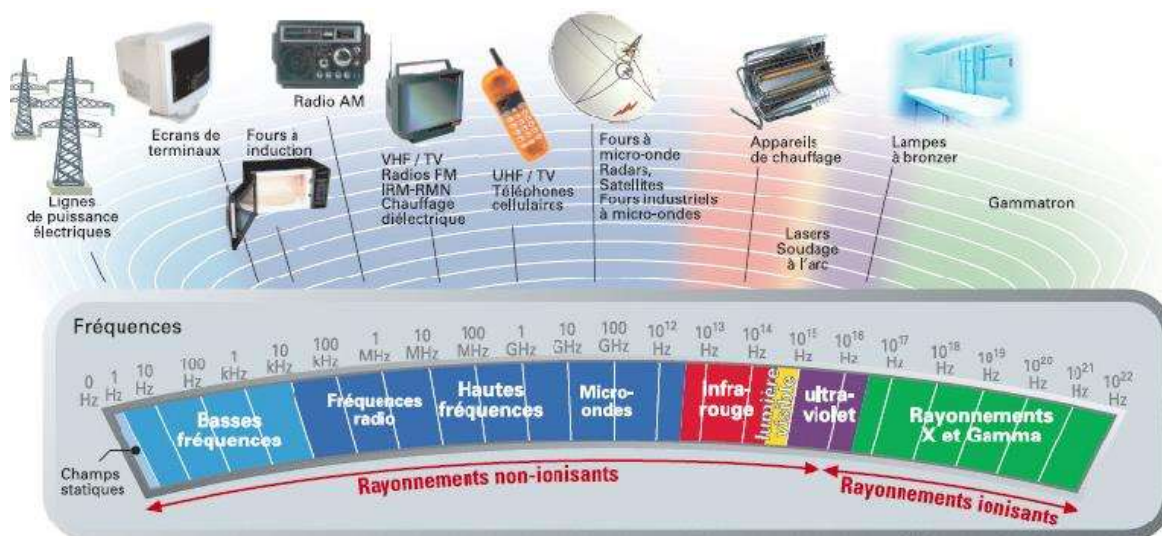


Figure 3 : Spectre des ondes électromagnétiques (d'après <http://www.champs-electromagnetiques.com/>).

1.3.1. Rayonnements ionisants

Un rayonnement est une émission d'énergie et/ou un faisceau de particules. Certains rayonnements, notamment les rayonnements gamma (γ) et les rayons X, sont dits ionisants car ils émettent des « rayons » d'énergies suffisantes pour transformer les atomes qu'ils traversent en ions. Cela peut rendre la matière instable. Un atome, instable de nature ou après un contact avec un rayonnement, cherchera à se stabiliser en émettant différents rayonnements. Il faut ainsi :

- Des protons et des neutrons : rayonnement alpha (α) ;
- Un neutron en proton ou vice-versa : rayonnement β^- ou β^+ ;
- Des photons : rayonnements X et γ .

Les rayonnements provoquent des effets différents sur l'organisme en fonction du type de rayonnement et de la dose reçue.

Les radiations émises par des éléments radioactifs sont à l'origine des rayonnements γ . Ces derniers infiltrent aisément la matière et sont dangereux pour les cellules vivantes. Le domaine de la physique nucléaire reste leur principale application. Leurs longueurs d'onde sont comprises entre 10^{-14} m et 10^{-12} m pour une fréquence dépassant 10^{18} GHz. Les rayons X sont des rayonnements hautement énergétiques. Ils pénètrent plus ou moins bien des corps matériels et cellulaires. Ils servent en médecine pour les

radiographies par exemple. Les rayons X ont des longueurs comprises entre 10^{-12} m et 10^{-8} m. En outre, l'énergie dégagée n'est pas identique pour tous les rayonnements.

Les moyens de s'en protéger sont différents. Par exemple, une feuille de papier est suffisante pour stopper les rayonnements α , mais il faut un mètre de béton ou de plomb pour arrêter des rayonnements γ (Figure 4). Globalement, ces rayonnements sont caractérisés par des fréquences très élevées et des longueurs d'onde, par conséquent, très faibles.

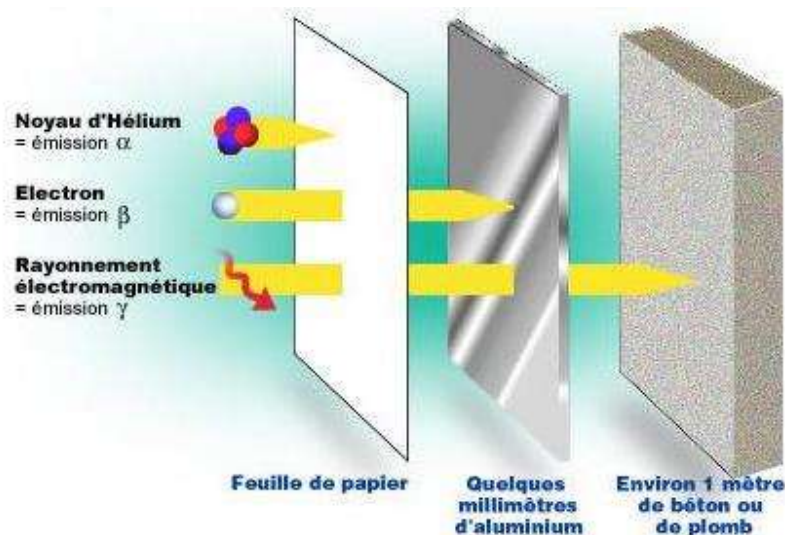


Figure 4 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements ionisants (d'après irsn.fr).

1.3.2. Rayonnements non-ionisants

Un rayonnement non-ionisant désigne un type de rayonnement pour lequel l'énergie électromagnétique transportée par chaque quantum est insuffisante pour provoquer l'ionisation d'atomes ou de molécules. Ces rayonnements regroupent les rayons ultraviolets (UV), la lumière visible, l'infrarouge, les radiofréquences (RF) ainsi que les basses fréquences (Tableau 1).

Tableau 1 : Fréquences non-ionisantes.

	Désignation	Fréquence	Exemple
	Fréquences extrêmement basses (ELF)	0 à 300 Hz	Réseau électrique et électroménager
	Fréquences audio (VF)	0,3 à 3 kHz	Chauffage par induction
Radiofréquences	Très basses fréquences (VLF)	3 à 30 kHz	Radiolocalisation sous-marine
	Basses fréquences (LF)	30 à 300 kHz	Radionavigation
	Fréquences moyennes (MF)	0,3 à 3 MHz	Radio-télécommunications
	Hautes fréquences (HF)	3 à 30 MHz	Radiodiffusions locales
	Très hautes fréquences (VHF)	30 à 300 MHz	Radio FM
	Fréquences ultra-hautes (UHF)	0,3 à 3 GHz	Téléphones portables
	Fréquences super-hautes (SHF)	3 à 30 GHz	Radars
	Fréquences extrêmement hautes (EHF)	30 à 300 GHz	Communications par satellites
	Infrarouges (IF)	0,3 à 385 THz	Système de sécurité
	Lumière visible	385 à 750 THz	Vision humaine
	Ultra-violets (UV)	750THz à 3 PHz	Lampe à bronzer

Les UV sont des rayonnements énergétiques considérés en partie comme non-ionisants. Bien que la majorité d'entre eux soit stoppée par la couche d'ozone atmosphérique, qui agit comme un protecteur naturel, ils peuvent être à long terme nocifs pour la peau. Leur fréquence est comprise entre 10^{15} et 10^{18} GHz et leur longueur d'onde entre 10^{-8} et 4.10^{-7} m.

La lumière visible est comprise entre 8.10^{-7} et 4.10^{-7} m. C'est la seule partie du spectre électromagnétique que l'œil humain peut déceler. Ainsi, entre 4.10^5 et $7,7.10^5$ GHz, il nous est possible de distinguer toutes les couleurs.

L'infrarouge englobe le spectre de longueurs d'ondes entre 8.10^{-7} et 10^{-3} m, avec des fréquences allant de 3.10^2 et 4.10^5 GHz. L'œil humain n'est pas adapté pour voir l'infrarouge bien qu'il ait les mêmes propriétés que la lumière.

De façon plus vaste, les RF se situent entre 8.3 KHz à 300 GHz avec des longueurs d'ondes de quelques centimètres à plusieurs kilomètres. Dans les gammes de fréquences 8,3 kHz à 6 GHz, on retrouve les ondes de la téléphonie mobile et les ondes radios pour la transmission de l'information (radio, télévision, téléphone).

Enfin, les ondes basses fréquences sont trouvées en-dessous de 3 kHz et avec des longueurs d'ondes supérieures à 30 km. Elles concernent notamment les lignes à haute tension et les réseaux électriques.

2. Les radiofréquences (RF) : la téléphonie mobile

2.1. Généralités et utilisation du téléphone portable en chiffres

Les RF artificielles sont par définition anthropiques. Initialement, elles ont été utilisées pour la diffusion radio et la télévision. Puis, le développement des technologies sans fil a conduit à la téléphonie mobile 2G (GSM, 900 et 1 800 MHz), 3G (UMTS, 900 et 2 100 MHz), 4G (LTE, 700, 800, 1 800 et 2 600 MHz), 5G (LTE, 3.5 GHz, 26 GHz), aux réseaux internet (Wi-Fi, 2 400 MHz) ou encore aux connexions sans fil comme le Bluetooth.

Au-delà de ces nouvelles technologies, l'Homme est exposé à d'autres sources de RF telles que les ampoules basses consommation, un four micro-ondes ou encore des plaques à induction. Elles contribuent ainsi aux CEM de l'environnement.

2.2. Téléphonie mobile : évolution des réseaux

2.2.1. *Evolution du réseau cellulaire : de la première (1G) à la cinquième génération (5G)*

Au cours de ces dernières années, la communication mobile s'est popularisée en raison de la révolution rapide dans la technologie mobile. Cette révolution est imputable à la très forte augmentation du nombre de clients. Les différents stades dans l'histoire de la téléphonie mobiles sont définis par le terme « génération ».

La première génération (1G) a été introduite au début des années 1980 et achevée au début des années 1990. Le signal, uniquement analogique, ne transmet que la voix à une fréquence de 150 MHz. La modulation vocale utilise la technique d'accès multiple en fréquence ou *Frequency Division Multiple Access* (FDMA). La vitesse du signal est de 2,4 kbps. De ce fait, le signal est de faible capacité avec une liaison vocale médiocre et n'est pourvu d'aucune sécurité. En effet, les appels passent par des tours radios rendant le système sensible à des écoutes clandestines.

La deuxième génération (2G) apparaît à la fin des années 1980 et est toujours utilisée. Le signal est alors numérique et sa vitesse va jusqu'à 64 kbps. Les bandes passantes sont 900 MHz et 1 800 MHz. Ce réseau GSM (*Global System for Mobile Communication*) fournit le service SMS (*Short Message Service*) en utilisant les bandes passantes de 30 à 200 kHz. Le développement amélioré de la 2G conduit à la 2,5G. Cette nouvelle génération se situe entre la 2G et la 3G. Elle permet notamment l'implantation des MMS (*Multimedia Messaging Service*) et l'augmentation de la vitesse de transfert jusqu'à 144 kbps. En effet, le GPRS (*General Packet Radio Service*) ou encore l'EDGE (*Enhanced Data Rates for GSM Evolution*) sont des technologies visant à augmenter le débit de transfert des données mobiles. Ainsi, il est possible de se connecter à internet grâce au système de données mobiles.

La troisième génération (3G) est développée à la fin des années 1990. Au-delà de la vitesse du signal qui peut atteindre jusqu'à 2 Mbps, de nouveaux services sont inclus tels que l'itinérance mondiale et une qualité vocale supérieure. Les nouveaux services incluent aussi le visionnage de vidéos, la visiophonie et le GPS (*Global Positioning System*). Ceci est rendu possible grâce à la technologie UMTS (*Universal Mobile Telecommunications System*) utilisant un codage WCDMA (*Wideband Code Division Multiple Access*). Grâce à un code unique, les utilisateurs sont différenciés les uns des autres et peuvent retrouver leurs données au milieu de celles des autres. Le signal utilise les bandes de 2 100 MHz et plus récemment celles de 900 MHz qui possèdent de meilleures propriétés de propagation des ondes radios.

La quatrième génération (4G) repose sur la technologie LTE (*Long Term Evolution*) et permet une vitesse de 100 Mbps jusqu'à 1 Gbps. Ce signal rapide réunit les conversations téléphoniques ainsi qu'Internet, ne divisant plus le débit et garantissant un transfert de données de meilleure qualité. La 4G fournit les mêmes fonctionnalités que la 3G mais apporte également des nouveautés. En effet, on distingue la télévision en haute qualité, la musique en streaming ou encore le partage de contenu. En France, la 4G regroupe les fréquences de 2 600 MHz, 1 800 MHz, 800 MHz et 700 MHz.

La cinquième génération (5G) prolonge l'exploitation technologique LTE. Elle donne accès à des débits dépassant de 2 ordres de grandeurs la 4G avec des temps de latence très faibles, une haute fiabilité et une augmentation du nombre de connexions simultanées par surface couverte. Ce type de réseau devrait favoriser le « *cloud computing* », l'intégration, l'inter-opérabilité d'objets communicants et de « *smart grids* » ainsi que les autres réseaux dits intelligents, dans un environnement domotisé, contribuant à l'essor du concept de « ville intelligente ». Cela pourrait également développer la synthèse d'images 3D ou holographique, le « *data mining* », la gestion du « *big data* » et du tout-internet. L'expression « *Internet of Everything* » renvoie à un monde où tous les ordinateurs et périphériques pourraient communiquer entre eux. En France, la bande 3,4 – 3,8 GHz sera la première bande dans laquelle la 5G sera introduite en 2020. Dans un deuxième temps, la bande 26 GHz sera désignée comme la bande « pionnière » au-dessus de 24 GHz. Elle permettra de déployer des services à ultra haut débit. Enfin, les fréquences proposées pour l'horizon 2022 sont les bandes 700 MHz et 3 500 MHz pour répondre aux enjeux de couverture, y compris en zone rurale, et pour les applications « machine to machine » et l'internet des objets (Sahoo *et al.*, 2014).

2.2.2. Fonctionnement et signaux de la téléphonie mobile

La technologie du téléphone portable se base sur le principe de conversion de la voix de l'interlocuteur en une onde électromagnétique qui sera transmise vers une antenne relais et inversement.

Lorsqu'un appel est émis, la voix est convertie en un signal numérique qui varie de façon discontinue dans le temps. En effet, le microphone convertit l'onde sonore en signal numérique en mesurant l'amplitude du signal pour lui attribuer une succession de « 0 » et de « 1 » (valeur binaire). Ce signal électrique est ensuite modulé en fréquence et/ou en amplitude afin d'acquérir une nouvelle fréquence (la fréquence porteuse) et est ensuite envoyé sous forme de courants dans l'antenne du téléphone formant une onde électromagnétique. Le code numérique est ainsi émis vers une antenne relais qui l'enverra alors à une centrale, par ligne téléphonique conventionnelle ou par ondes électromagnétiques. C'est de cette centrale que sont acheminées les conversations vers le téléphone du destinataire, selon le processus inverse, par voie filaire ou onde électromagnétique, suivant qu'il s'agisse d'un appel vers un téléphone fixe ou vers un téléphone portable. Le signal numérique évolue en signal analogique sonore par l'écouteur de l'appareil du récepteur (Figure 5).

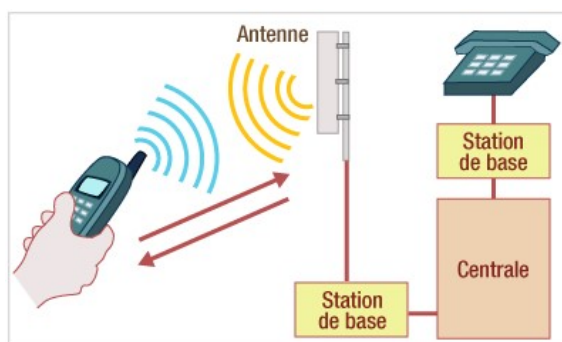


Figure 5 : Fonctionnement de la téléphonie mobile (d'après linternaute.com).

2.2.3. La couverture géographique : le réseau GSM

Afin d'avoir une couverture maximale d'une zone géographique, les systèmes utilisés pour la téléphonie mobile se fondent sur le principe de découpage du territoire en cellules hexagonales ou « nid d'abeilles ». Au centre de chaque cellule, est implantée une antenne qui émet un signal CEM vers les téléphones mobiles. Six autres cellules entourent chaque cellule. La taille de ces cellules dépend de l'environnement dans lequel les antennes sont implantées et du nombre d'utilisateurs potentiels dans la zone. De ce fait, en milieu urbain, leur rayon peut être uniquement de 100 mètres. En milieu rural, le rayon peut atteindre 35 kilomètres (Figure 6).

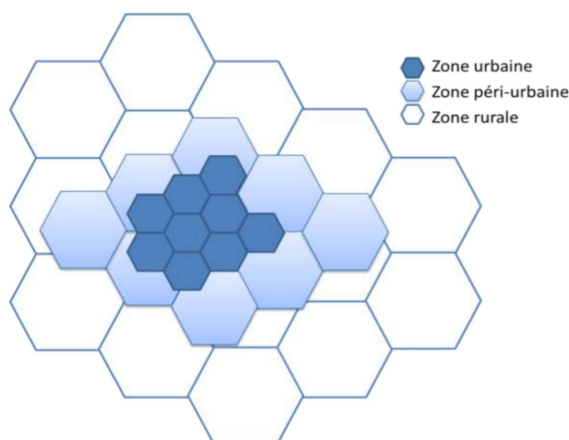


Figure 6 : Couverture d'une surface géographique par un réseau GSM (Adaptée de "champs électromagnétiques et téléphonie mobile" ISSEP, 2003).

Le réseau du système GSM se compose de trois éléments principaux : les stations de base, les contrôleurs de stations et les centres de communication du service mobile. La station de base, ou *Base Transceiver System* (BTS), représente l'antenne-relais GSM située au centre de chaque cellule hexagonale. Elle est équipée de tous les accessoires électroniques nécessaires pour l'émission et la réception d'un signal.

Les antennes-relais sont reliées par un câble qui transmet le signal sous forme électrique ou par des ondes radio à une fréquence très élevée (supérieure à 15 GHz) à un contrôleur de station, communément appelé *Base Station Controllers* (BSC). Ce dernier contrôle un certain nombre d'antennes-relais appartenant au même opérateur téléphonique.

Dans le cas d'un interlocuteur avec un téléphone portable du même opérateur, le BSC assurera la transmission du signal vers la BTS la plus proche de l'interlocuteur. Dans le cas d'un appel vers un téléphone fixe ou un téléphone appartenant à un réseau d'un autre opérateur, le signal transmis par le BSC passera par le centre de communication du service mobile ou *Mobile Switching Center* (MSC). Ce dernier se chargera d'acheminer les informations à travers le réseau (Figure 7).

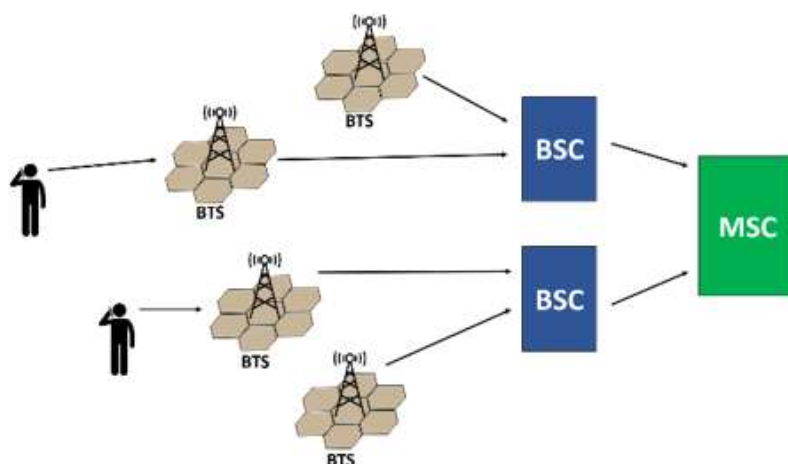


Figure 7 : Architecture du réseau GSM (d'après Girodon, 2002).

2.3. Utilisation du téléphone portable en chiffres

Le secteur de la téléphonie mobile a connu et connaît toujours des mutations technologiques importantes. Le taux mondial de possession d'un téléphone portable est de 67%, soit 5,1 milliards d'utilisateurs mobiles uniques. Ce chiffre est en augmentation de 2% par rapport à 2018 (We Are Social et Hootsuite, 2019). En France, 64,70 millions de personnes sont équipées d'un mobile (99% de la population) et ce chiffre est en augmentation de 0,5% par rapport à 2018. Le Royaume-Uni, l'Espagne et l'Allemagne comptent tous plus d'un mobile par personne :

- 107,8 millions de personnes ayant un mobile en Allemagne (131% de la population)
- 71,67 millions de personnes possédant un mobile au Royaume-Uni (soit 107% de la population),
- 54,44 millions de personnes détenant un mobile en Espagne (soit 117% de la population).

Ce chiffre, par rapport à 2018, est en baisse de 0,7% et 1,4% pour l'Allemagne et le Royaume-Unis respectivement, alors qu'il est en augmentation de 4,3% pour l'Espagne.

L'arrivée des smartphones a bouleversé le rapport des individus à leurs téléphones mobiles, ces derniers n'étant plus seulement un moyen de télécommunication mais également un accessoire quasi indispensable dans la vie quotidienne. La diffusion s'est caractérisée par une ascension fulgurante entre 2011 et 2018. En effet, huit ans ont suffi pour faire passer la part d'utilisateurs français ayant un smartphone de 17 à 79 %.

Avec la réduction du coût d'achat et d'usage, le téléphone portable touche l'ensemble des tranches d'âge. Ainsi, 92% des adolescents français (12-17 ans) possèdent un smartphone :

- 85% des 12-13 ans ;
- 94% des 14-15 ans ;
- 96% des 16-17 ans.

De plus, près d'un adolescent sur deux obtient son premier smartphone à 11 ou 12 ans (49%).

Cette utilisation massive du téléphone portable par les adolescents cristallise des inquiétudes sur d'éventuels effets des ondes téléphoniques. En effet, la vulnérabilité est plus importante chez ces sujets par rapport aux sujets adultes.

L'exposition prénatale est également une source de questionnement. En effet, cette période correspond au moment où le cerveau est en construction. Les chercheurs mettent en évidence plusieurs risques sanitaires potentiels liés au rayonnement pendant la grossesse comme le risque d'altération du développement cérébral du fœtus, le risque d'hyperactivité, l'établissement de troubles du comportement ou de l'apprentissage... (Aldal et *al.*, 2012). Par ailleurs, des effets génotoxiques avec des conséquences sur l'ADN ont pu être envisagés.

Il est logique de considérer que la grossesse et la petite enfance sont les périodes les plus sensibles aux risques d'expositions aux rayonnements ionisants et non ionisants.

3. Effets biologiques et mesures

3.1. Interaction entre les CEM et la matière vivante

Selon la fréquence du CEM, il existe différentes interactions entre les CEM non ionisants et les organismes vivants tels que la circulation de courants et l'échauffement des tissus notamment. Lorsqu'une onde électromagnétique rentre au contact de la matière, elle se divise en deux. La première partie est réfléchiée et ne traverse pas le tissu. La seconde, appelée onde transmise, pénètre à travers la matière. Elle est à l'origine de l'énergie absorbée par la matière vivante. Elle pose la question d'effets biologiques possibles.

Les interactions dépendent de l'environnement, de la forme et des caractères physico-chimiques de la matière rencontrée. En fonction de la fréquence, la pénétration des ondes et leurs interactions avec la matière varient. Les phénomènes biologiques s'expriment donc différemment en fonction du type de champ (électrique ou magnétique) et de sa fréquence.

A l'échelle du tissu, deux types d'effets sont rencontrés : un effet thermique et un effet non-thermique. Ainsi, en dessous de 100 kHz, les champs et courants entraînent des effets biologiques localisés majoritairement au niveau des tissus excitables. On peut citer le système cardiovasculaire, les muscles ou encore le système nerveux central. Au-delà de 10 MHz, l'absorption des RF est le mécanisme

prédominant et un échauffement apparaît. Aux fréquences intermédiaires, entre 100 kHz et 10 MHz, un phénomène comprenant des effets non thermiques et thermiques est soupçonné (Figure 8).

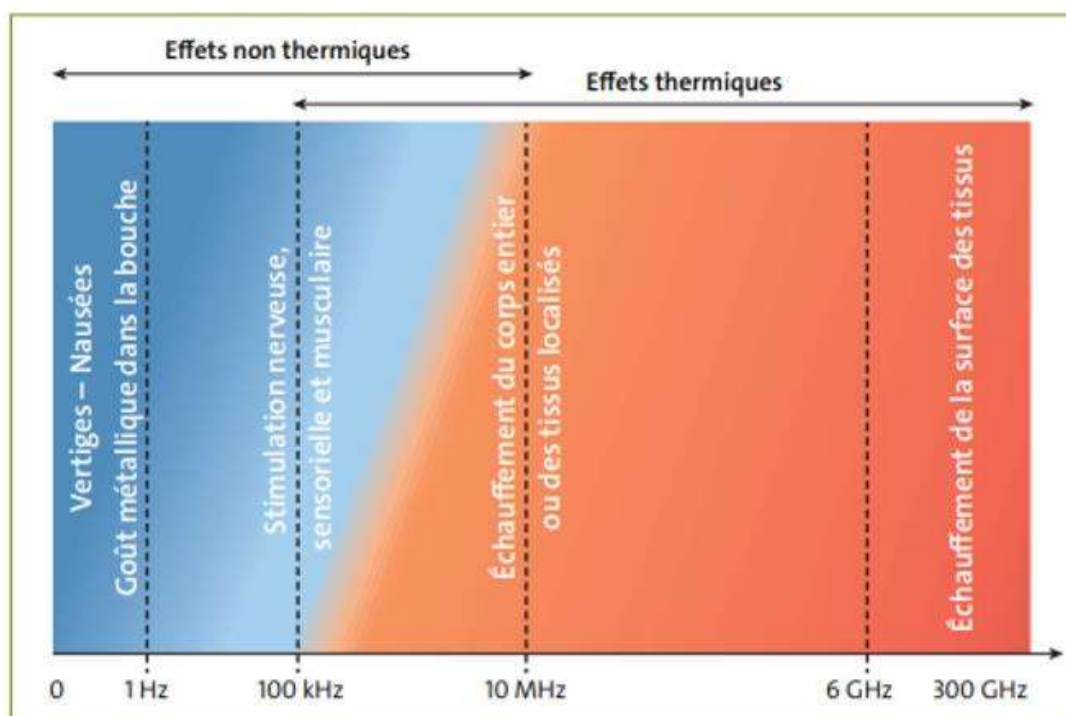


Figure 8 : Interaction entre rayonnements non ionisants et organismes vivants (d'après ANSES, 2013).

3.2. Distinction effets thermiques et non thermiques

3.2.1. Les effets thermiques

Les effets thermiques apparaissent avec des CEM relativement intenses et des fréquences hautes, supérieures à 100 kHz. Cet effet est connu de longue date et est utilisé dans les fours à micro-ondes pour chauffer les aliments ainsi que dans certaines thérapies médicales (traitement du cancer). Chez l'Homme, un effet thermique est causé par un échauffement des tissus biologiques de minimum 1°C. Lors de l'absorption d'énergie, un mécanisme de rotation entre les molécules constituant les tissus de l'organisme peut être à l'origine de cette élévation de température. L'échauffement est mesurable lorsque la densité de puissance est supérieure à 500 W/m². Les lésions résultant de cet échauffement se localisent soit en surface (brûlure du derme et de l'épiderme) soit en profondeur. Cette dernière situation engendre un retard dans la perception des brûlures et des phénomènes de coagulation des protéines, ou encore des lésions internes. Lorsque l'hyperthermie est généralisée, des crises convulsives peuvent apparaître.

3.2.2. Les effets non thermiques

Les effets non thermiques regroupent les effets sur les systèmes biologiques alors que la quantité d'énergie absorbée est trop faible (< 500 W/m²) pour induire une élévation de température. Ils apparaîtraient à des niveaux d'exposition où le système de thermorégulation de l'organisme est capable de réguler la température ou de dissiper l'éventuel échauffement.

Contrairement aux effets thermiques, ces effets ne sont pas démontrés. L'hypothèse impliquerait des micro-échauffements locaux, des changements de conformations moléculaires, des perturbations

enzymatiques ou encore des modifications de répartitions ioniques. Ainsi, l'hypothèse d'effets non thermiques serait associée à des origines cellulaire, endocrinienne, immunologique, neurobiologique ou encore génotoxique pouvant conduire à la promotion de cancers ou à l'apparition de lésions dans l'ADN. Les résultats de la communauté scientifique sont très controversés et souvent contradictoires.

A ce jour, les téléphones mobiles, mais également toutes sources émettant des RF, demeurent une source d'inquiétude de la population et notamment les effets à long terme d'une exposition. Aucune conclusion de leur effet sur la santé n'a été émise par manque de données cohérentes expliquant ces effets. De l'autre côté, leur utilisation massive par un large public de plus en plus jeune ne fait que croître.

3.3. Dosimétrie et réglementation

A l'inverse d'une exposition à des toxiques chimiques, l'exposition aux ondes EM est beaucoup plus difficile à quantifier. La dosimétrie a été développée pour répondre à cette difficulté et évaluer la quantité d'énergie absorbée par les systèmes biologiques.

3.3.1. *Formulation théorique*

L'évaluation de l'exposition s'appuie sur deux grandeurs caractéristiques du CEM : le champ électrique (E) et le Débit d'Absorption Spécifique (DAS, ou SAR pour l'acronyme anglo-saxon : Specific Absorption Rate). Ces deux grandeurs varient en fonction de la distance par rapport à la source. Le DAS est un indice indiquant la puissance d'un flux d'énergie véhiculée par les ondes RF absorbées par l'utilisateur d'un appareil radioélectrique, lorsque cet appareil fonctionne à pleine puissance et dans les pires conditions d'utilisation.

A une distance lointaine de la source de RF (antenne relais), on utilise le champ électrique (E) exprimé en V/m. Plus on se rapproche de la source, comme dans le cas du téléphone mobile, plus le calcul du champ électrique (E) est complexe. En champ proche, le paramètre le plus adapté est le DAS, exprimé en W/kg. Le DAS se calcule avec la formule suivante :

$$DAS = \sigma \frac{E^2}{\rho}$$

E^2 : valeur efficace de l'amplitude du champ électrique dans les tissus (V/m), c'est-à-dire la valeur crête divisée par racine de 2.

σ : conductivité du tissu (S/m).

ρ : masse volumique du tissu (°C/s).

Or, l'échauffement ΔT provoqué par le passage du courant et C_p , la capacité calorifique spécifique (quantité de chaleur fournie pour élever la température d'un degré Celsius), sont liés à E. De ce fait, l'équation suivante est obtenue :

$$E^2 = \frac{\Delta T}{\Delta t} \cdot \frac{C_p - \rho}{\sigma}$$

$\frac{\Delta T}{\Delta t}$: variation de température dans le tissu (°C/s).

C_p : capacité thermique du tissu (J /kg/K).

Le DAS est proportionnel à une augmentation de la température de l'élément exposé, permettant de calculer ce paramètre par la formule suivante :

$$DAS = c_p \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

De ce fait, le DAS peut être estimé/calculé soit par la valeur du champ électrique généré par la source, soit par mesure de l'échauffement émis par l'élément exposé.

3.3.2. Méthode d'évaluation du DAS

L'évaluation du DAS dans un système biologique fait appel à des techniques de simulations numériques ou à des mesures expérimentales. La méthode directe est complexe et fait appel à une sonde invasive. Cette dernière n'est pas utilisée dans les organismes vivants mais dans des « fantômes » faits à partir d'un gel mimant les propriétés physiques (diélectriques) du tissu biologique.

3.3.2.1. Approche numérique

L'approche numérique se base sur la modélisation des tissus humains ou animaux. Cette évaluation du DAS est très complexe. En effet, chaque système biologique présente plusieurs tissus dont les propriétés sont différentes. Il est possible de distinguer la conductivité qui est un facteur de proportionnalité entre la densité de courant qui circule dans la matière et le champ électrique qui a mis en mouvement les charges électriques. Ou encore, la permittivité qui correspond à la capacité de polarisation du matériau et donc sa capacité à transformer l'énergie électromagnétique en énergie de frottement ou énergie thermique. Pour obtenir ces modèles, l'imagerie à résonance magnétique (IRM) est utilisée (Simunic *et al.*, 1996).

Plus communément, l'évaluation du DAS est réalisée grâce à la méthode FDTD (*Finite Difference Time Domain*). Cette technique prend racine dans la découpe de l'espace en cubes et sur la résolution d'équations de Maxwell dans ce maillage. Les équations modélisent mathématiquement les interactions entre champ magnétique, champ électrique, charge électrique et courant électrique. Ainsi, un DAS est calculé au centre de chaque cellule d'1 mm de côté (Figure 9).

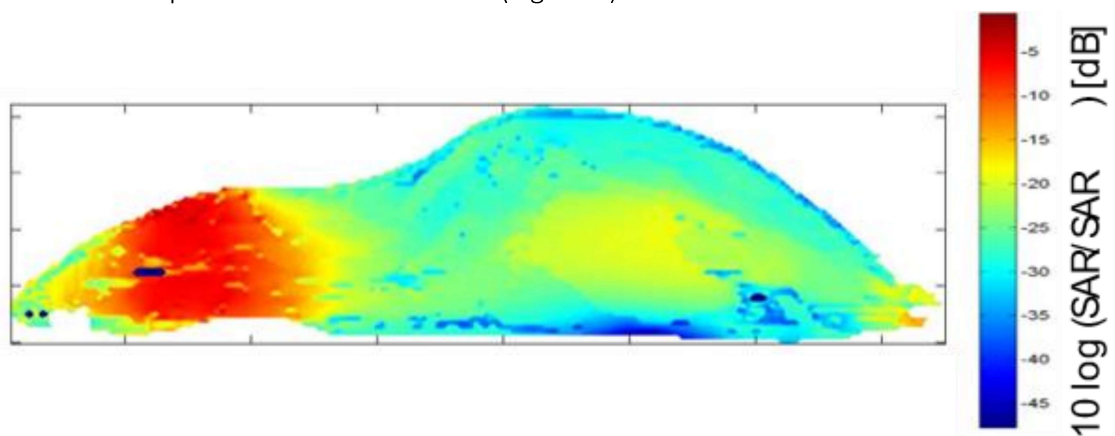


Figure 9 : Estimation du DAS par FDTD sur un rat soumis à un champ de 900 MHz (d'après Spathmann, 2012).

Il existe des modèles numériques de tête humaine comprenant dix tissus différents (peau, os, muscle, matière grise...) ou encore quarante-trois tissus différents pour le rat entier (Figure 10).



Figure 10 : Modèle numérique de rats (d'après le Brooks Air Force Base).

3.3.2.2. Approche expérimentale

Les estimations de DAS sont également possibles grâce à des modèles expérimentaux. Cette approche repose sur la mesure de température ou de champ électrique au sein de modèles expérimentaux dit « fantômes » ayant les propriétés physico-chimiques proches de celles du système biologique vivant (Figure 11)(Capstick et *al.*, 2017).

Du fait de la complexité des êtres vivants (peau, muscle, os...), les mesures du DAS ne sont que des estimations. A la suite de nombreuses études réalisées par l'approche expérimentale, un modèle « fantôme » représentatif est utilisé par le Comité Européen de Normalisation Electrotechnique (CENELEC) et l'IEEE (*Institute of Electrical and Electronics Engineers*) pour certifier les téléphones mobiles.

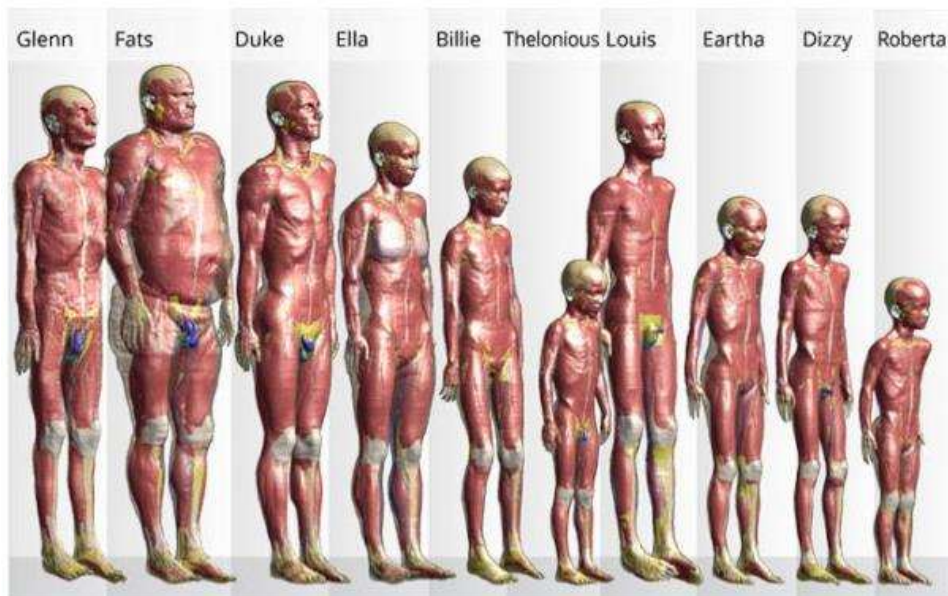


Figure 11 : Famille virtuelle, développée par IT'IS Foundation (Zurich, Suisse) pour une mesure numérique du DAS.

3.3.3. Normes et législation

Dès les années 1980, la commission internationale pour la protection contre les radiations non ionisantes (International Commission of Non-Ionizing Radiation Protection : ICNIRP) a dessiné des limites d'exposition aux CEM. C'est à partir de ces recommandations que chaque pays a pu établir ses propres normes et directives. Leurs formulations prennent en compte des risques aigus avérés, directement mis en évidence et reproductibles. Ce sont donc les effets thermiques qui ont été privilégiés. La valeur limite est définie par rapport à la valeur la plus basse à laquelle apparaît un effet, divisée par un facteur de sécurité. Ce dernier permet de tenir compte des diverses incertitudes.

Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), le DAS doit être supérieur à 4 W/kg pour que les effets des RF soient délétères pour la santé. En fonction des populations considérées, l'ICNIRP utilise deux marges de sécurité pour formuler ces limites. Ces dernières sont retenues au niveau européen dans la recommandation du conseil de l'Union Européenne le 12 juillet 1999 (1999/519/CE).

Dans le cas d'un public professionnel, travaillant au contact de sources RF, un facteur 10 s'applique entre la limite d'exposition et le seuil d'apparition des effets nocifs. Pour le grand public, c'est un facteur 50 qui est instauré. Ce dernier tient compte de l'absence des contrôles que des personnes non informées ont sur leur environnement et de la possibilité de sensibilité variable entre les individus. Pour l'exposition en champ proche, le DAS dépend de la partie du corps concernée. Ainsi, pour le corps entier, la valeur moyenne autorisée est de 0.08 W/kg (0.4 W/kg pour le travailleur). Pour les membres, le DAS local est cantonné à 4 W/kg (20 W/kg pour le travailleur). Pour la tête, il est de 2 W/kg (10 W/kg pour le travailleur). En ce qui concerne les champs lointains (antennes-relais), les valeurs limites proposées dépendent du type de réseau cellulaire et de la fréquence du signal. Ces valeurs concernent le champ électrique. La 2G à 900 MHz a un seuil de 41 V/m. Alors qu'à 1 800 MHz, il est de 58 V/m. Pour la 3G (signal UMTS, 900 MHz) et la 4G (LTE, 2600 et 800 MHz), la limite autorisée est de 61 V/m. Le droit français a transposé la recommandation européenne de 1999 par le décret n° 2002-775 du 3 mai 2002. De ce fait, l'arrêté d'octobre 2003 fixe les spécifications techniques applicables aux nouveaux équipements radioélectriques. Ainsi, les téléphones mobiles avec un DAS ne peuvent pas dépasser les 2 W/kg au niveau de la tête.

Chapitre 2 : Enfant et exposition aux CEM

1. Spécificités de l'exposition des enfants aux CEM

L'utilisation généralisée des appareils de télécommunications parmi les jeunes a conduit à orienter les recherches sur les différences d'exposition aux CEM entre les enfants et les adultes. Les deux principaux facteurs qui pourraient induire une différence d'exposition entre ces deux populations sont d'une part les différences des propriétés diélectriques des tissus en fonction de l'âge et d'autre part les spécificités morphologiques des enfants. En effet, le DAS est fonction du champ électrique local interne dans le corps et de la conductivité électrique des tissus en tout point.

1.1. Influence des propriétés diélectriques : permittivité et conductivité

Deux paramètres des tissus influent sur la valeur du DAS. D'une part, la permittivité relative des tissus, qui dépend de la fréquence des rayonnements et influe sur l'absorption des rayonnements par les tissus. C'est une propriété physique qui décrit la réponse d'un milieu donné à un champ électrique appliqué. Elle représente la capacité de polarisation du matériau et plus particulièrement sa capacité à transformer l'énergie électromagnétique reçue en énergie de frottement, donc potentiellement en énergie thermique. D'autre part, la conductivité électrique, également dépendante de la fréquence et de la nature des tissus, intervient directement dans le calcul du DAS. Elle caractérise l'aptitude d'un matériau ou d'une solution à laisser les charges électriques se déplacer librement et donc permettre le passage d'un courant électrique. Les premières publications en lien avec les propriétés diélectriques des tissus biologiques apparaissent dès les années 1945-1950. En lien avec le développement des technologies radar, le chercheur Gabriel recense des données animales et humaines (Gabriel, 1996). Celles-ci sont recueillies lors d'autopsies, ou pour des tissus comme la peau et la langue par des mesures effectuées *in vivo*. Il est précisé que les tissus animaux ont été utilisés principalement dans les deux heures suivant la mort, alors que les propriétés des tissus humains ont pu être mesurées 24 à 48 heures après le décès.

La fondation IT'IS met à disposition une base de données des paramètres diélectriques dans les différents tissus aux différentes fréquences. Cette base de données a été construite à partir des éléments fournis par Gabriel et de la littérature ultérieure (Figure 12).

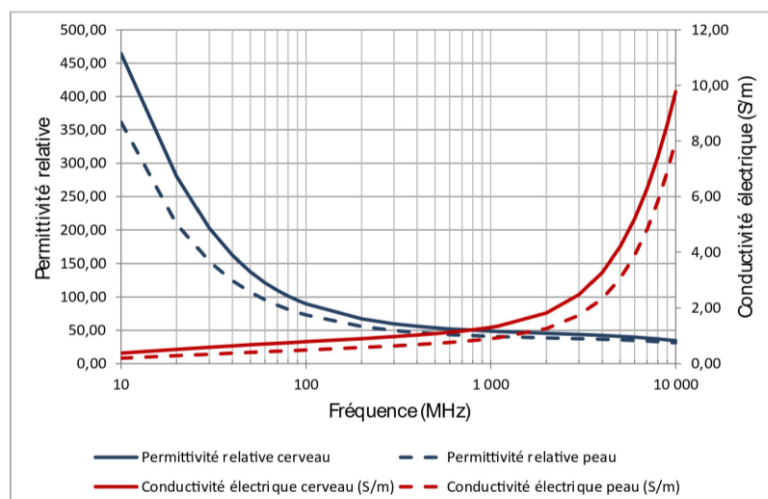


Figure 12 : Propriétés diélectriques des tissus de la peau et du cerveau en fonction de la fréquence (d'après ANSES, 2016).

1.1.1. Variation des propriétés diélectriques avec l'âge

Dès 2001, des chercheurs étudient la variation des propriétés diélectriques des tissus de rats en fonction de leur âge, dans la bande 130 MHz à 10 GHz (Peyman et *al.*, 2001). Les résultats montrent une décroissance générale des valeurs de propriétés diélectriques avec l'âge. Cette tendance est plus marquée pour le cerveau, les os et la peau, et moins pour les tissus abdominaux. La variation des propriétés diélectriques est expliquée par les modifications de la teneur en eau et de la composition des tissus.

Dans la continuité de leurs travaux, cette même équipe a étudié la sensibilité du DAS à la variation des propriétés électromagnétiques dans des modèles d'enfants de 3 et 7 ans et d'adultes exposés à des CEM de fréquences comprises entre 450 MHz et 2,4 GHz (Peyman et *al.*, 2007 ; 2009). Pour mener ces recherches, ils ont utilisé les propriétés diélectriques de tissus de porc de 10 kg (correspondant à un enfant de 1 à 4 ans), de 50 kg (enfant de 11-13 ans) et de 250 kg (adultes). Il a été considéré que l'animal était un bon substitut au tissu humain en ce qui concerne les propriétés diélectriques et leur évolution en fonction de l'âge. Les résultats montrent une réduction significative de la permittivité et de la conductivité avec l'âge sur 10 des 15 tissus évalués. Pour expliquer les différences dans les valeurs de paramètres diélectriques, l'hypothèse avancée par les auteurs est la variation de la teneur en eau des tissus en fonction de l'âge. De façon plus générale, plus les tissus sont jeunes, plus ils contiennent d'eau, et plus les valeurs des paramètres diélectriques sont élevées.

Les recherches menées aux fréquences utilisées pour les communications mobiles (> 300 MHz) montrent la diminution de la permittivité et de la conductivité avec l'âge. Là aussi, l'hypothèse serait une diminution de la teneur en eau des tissus au fur et à mesure de la croissance de l'animal (Peyman et *al.*, 2009 ; 2011b).

En 2011, une nouvelle équipe a construit un modèle mathématique pour évaluer les propriétés électromagnétiques des tissus (peau, muscle, tissu cérébral) à différents âges des enfants, en se basant sur leur courbe de croissance (poids et tailles moyens) et sur le recueil des propriétés électriques des adultes de Gabriel (Ibrani et *al.*, 2011). Les auteurs ont supposé que le corps humain est schématiquement composé d'eau et de tissus spécifiques de l'organe considéré. Bien que la composition de l'organe (concentration et nature des protéines, etc.) évolue au cours du temps, les auteurs ont admis que les tissus spécifiques de l'organe ne varient pas en fonction de l'âge, tandis que la teneur en eau intrinsèque à l'organe évolue au fil des années. Les résultats montrent que la différence de permittivité de la peau entre un enfant de 5 ans et un enfant de 10 ans pour la même fréquence est inférieure à 5 % (Figure 13). Chez un enfant de 5 ans, la différence entre les permittivités de la peau à 900 MHz, 1 800 MHz et 2,4 GHz atteint 6 %. Pour le tissu musculaire, la différence entre les permittivités d'un enfant de 5 et 10 ans à 900 MHz est inférieure à 2 %. La différence de permittivité entre une fréquence de 900 MHz et 2,4 GHz est d'environ 3 %. Les valeurs de permittivité les plus élevées sont obtenues pour le cerveau et les plus basses pour la peau. Les auteurs notent une différence d'au plus 10 % entre un enfant et un adulte pour la permittivité des tissus musculaires. Le comportement de la conductivité en fonction de l'âge est similaire à celui de la permittivité.

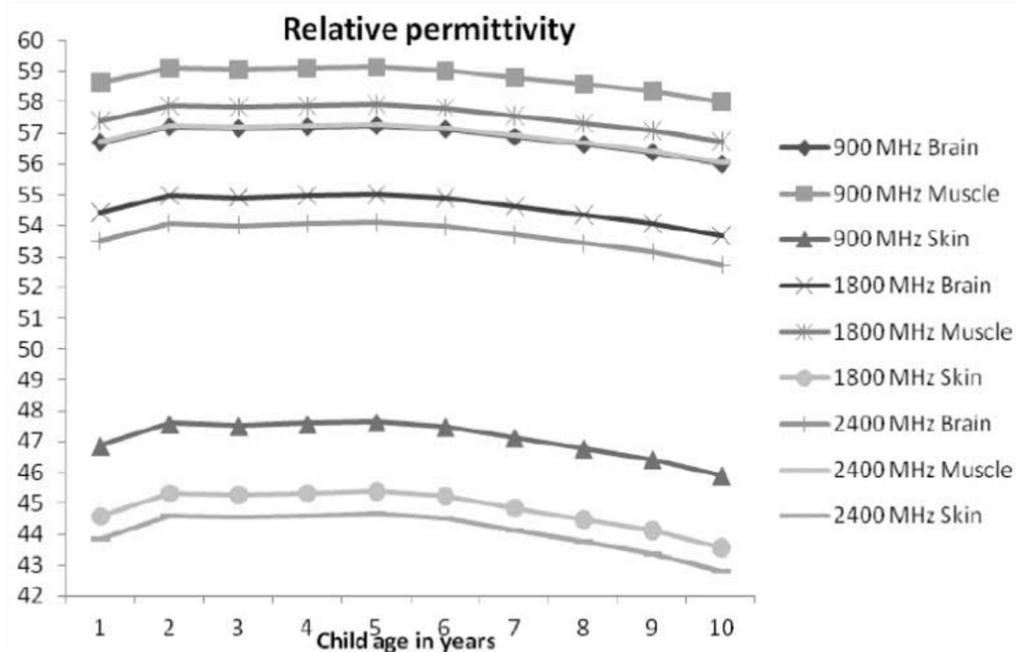


Figure 13 : Permittivité relative des tissus en fonction de l'âge de l'enfant et de la fréquence d'émission (d'après Ibrani et al., 2001).

Ainsi, dans le cerveau chez le cochon, la diminution du contenu en eau en fonction de l'âge combinée à l'augmentation de la myélinisation serait la raison de la baisse de la permittivité et de la conductivité de la matière blanche (aucune variation observée pour la matière grise) et de la moelle osseuse en fonction de l'âge (Peyman et al., 2007). Les os présentent les variations de la teneur en eau les plus importantes, en raison du degré de minéralisation de la matrice osseuse qui se calcifie durant la croissance, conduisant à une baisse significative de la permittivité et de la conductivité. La moelle osseuse présente des variations de propriétés diélectriques parmi les plus importantes. En effet, elle est composée de moelle rouge, le lieu de synthèse des globules rouges et blancs, et de moelle jaune qui contient des cellules graisseuses, du tissu conjonctif et qui produit certains globules blancs. Chez les animaux en croissance, la moelle rouge est prépondérante, alors que chez les animaux plus âgés, la proportion de graisse devient plus importante, et la moelle osseuse est majoritairement jaune. La moelle rouge contient plus d'eau que la moelle jaune, ce qui lui confère des valeurs de propriétés diélectriques supérieures (Peyman et al., 2009).

1.1.2. Impact des variations des propriétés diélectriques sur le DAS

Les études précédentes ont été complétées par des expérimentations mesurant l'impact des variations des propriétés diélectriques sur le DAS. Ainsi, des chercheurs ont évalué l'impact des variations des propriétés diélectriques en fonction de l'âge sur l'absorption locale et globale dans le crâne, en utilisant plusieurs modèles de tête humaine (âges : 3, 6, 7, 11, 34 et 38 ans) (Christ et al., 2010). Les valeurs de permittivité et de conductivité utilisées étaient celles de Peyman (2009) et de Gabriel (1996). Les simulations réalisées ont montré que l'exposition à un téléphone mobile dans deux bandes de fréquences (à 900 et 1 800 MHz) de certaines régions du cerveau de jeunes enfants, telles que l'hypothalamus et l'hippocampe, pouvait dans ces conditions dépasser l'exposition des adultes d'un facteur 1,6 à 3,2.

1.2. Influence des différences morphologiques avec l'âge

1.2.1. *Exposition des fœtus*

Afin de mesurer l'exposition des fœtus aux RF, des chercheurs ont évalué le DAS corporel dans les modèles NAOMI de femmes enceintes (aNaTOMIcal Women) et non enceintes pour des fréquences entre 20 MHz et 3 GHz (Dimbylow, 2005 ; Dimbylow et Bolch, 2007). Les résultats montrent que le DAS corporel dans le modèle de femme enceinte est inférieur au DAS du modèle de femme non enceinte, avec un écart en augmentation en fonction de l'âge gestationnel, pour être inférieur de près de 15 % chez la femme enceinte à 28 semaines. Ceci s'explique par le fait que le DAS corporel est inversement proportionnel à la masse, qui augmente pendant la grossesse, alors que la taille ne change pas.

L'exposition à une onde plane d'un modèle japonais de femme enceinte (26 semaines de gestation) a été examinée. Le DAS corporel calculé a révélé une faible différence par rapport au modèle de femme non enceinte. Les courants induits et le DAS des fœtus sont généralement équivalents ou inférieurs aux courants induits et au DAS de la mère (Nagaoka et *al.*, 2007).

En modélisant uniquement la région de l'abdomen, et en étudiant 9 âges gestationnels différents, une équipe a montré une augmentation significative du DAS et de la température pour les femmes en fin de grossesse (Wu et *al.*, 2006).

1.2.2. *Exposition du crâne*

Afin de calculer le DAS dans le crâne, une équipe a exposé un modèle de tête d'adultes et d'enfants à des rayonnements RF émis par une antenne dipôle à une fréquence de 900 MHz (Anderson, 2009). Le modèle correspond à une sphère formée de 3 couches concentriques de tissus (peau, squelette et cerveau) d'épaisseurs différentes. Pour obtenir un modèle représentatif, les données utilisées sont la conductivité des tissus, obtenue par les lois de mélange à partir de la teneur en eau du corps, l'épaisseur du crâne, l'épaisseur du cuir chevelu, l'épaisseur de l'oreille et la taille de la tête. Huit modèles différents ont été construits. Quatre modèles représentent des enfants de 4, 8, 12 et 16 ans, un modèle un jeune adulte de 20 ans, et deux autres représentent des adultes. Comparés au DAS moyen chez les adultes, le DAS maximum moyenné sur 1 g pour un enfant de 4, 8, 12, et 16 ans est augmenté respectivement d'un facteur 1,38, 1,28, 1,17 et 1,08. Les facteurs correspondants pour un DAS moyenné sur 10 g sont 1,31, 1,23, 1,15, 1,07, montrant une tendance similaire bien que moins prononcée.

Une autre équipe a calculé le DAS maximal moyenné dans 1 et 10 g de tissus et dans la tête entière en utilisant un modèle numérique de tête (Martinez Bursalo et *al.*, 2004). Les résultats montrent que le DAS maximal a tendance à diminuer avec la taille de la tête, tandis que le DAS dans la tête entière, et donc le pourcentage d'énergie absorbée, augmente. Les auteurs suggèrent donc que le DAS moyenné dans le cerveau entier serait plus élevé chez les enfants que chez les adultes.

En 2005, des chercheurs ont calculé le DAS en utilisant des modèles anatomiques de 2 enfants (âgés de 3 et 7 ans) et de 2 adultes (Keshvari et Lang, 2005). Aucune différence significative n'a été trouvée dans le DAS maximal entre les enfants et les adultes. Les auteurs ont conclu que les différences de DAS observées entre les enfants et les adultes proviendraient plutôt de la différence inter-individuelle

dans l'anatomie ou la géométrie de la tête que de l'âge de l'individu. La même année, d'autres chercheurs ont comparé des modèles d'enfant linéairement réduits et adaptés selon la forme spécifique du crâne juvénile (Bit Babik et *al.*, 2005). Le DAS maximal moyenné dans 1 g et dans 10 g de tissus et la profondeur de pénétration de l'énergie étaient équivalents dans tous les modèles, pour les mêmes conditions d'exposition.

En complément, une étude s'est intéressée à l'influence des nouveaux usages des téléphones mobiles (envoi de SMS, visionnage de vidéos) sur le DAS mesuré dans 3 modèles de têtes (deux têtes d'enfants de 9 et 15 ans et une tête d'adulte)(Hadjem et *al.*, 2005). L'exposition a été faite à des fréquences 900 MHz, 1 800 MHz et 2 100 MHz pour un téléphone mobile fonctionnant sur un réseau européen et à 835 MHz, 1 900 MHz et 2 100 MHz pour un téléphone mobile fonctionnant sur un réseau nord-américain. Le téléphone mobile était placé à 10 cm en face de la tête en position de « visionnage ». Quelles que soient les fréquences, aucune différence de DAS (local ou moyenné dans 10 g de tissu) n'a été observée entre les enfants et les adultes. De plus, quelles que soient les simulations, les valeurs du DAS étaient toujours inférieures à la limite réglementaire de 2 W/kg pour le DAS moyenné dans 10 g dans la tête.

Contrairement à ces trois derniers résultats, une équipe indique que le DAS maximal moyenné dans 10 g dans un modèle d'enfant de 12 ans est 30 % supérieur à celui obtenu dans la tête adulte (Wiert et *al.*, 2005). Les résultats ont été obtenus à partir d'un modèle d'adulte réduit de façon non uniforme et de données IRM.

En 2006, une étude incluant 14 laboratoires a étudié les différences entre les DAS des enfants et des adultes exposés à des fréquences de 835 ou 1 900 MHz (Beard et *al.*, 2006). Un modèle anatomiquement réaliste pour les adultes et un modèle de crâne d'enfant de 7 ans linéairement mis à l'échelle à partir d'un crâne adulte ont été utilisés. Le protocole a testé 2 positions de l'utilisation du téléphone : contre la joue et en mode vidéo (face au visage). À 1 900 MHz, les valeurs de DAS maximal moyennées dans 1 g de tissu du modèle de crâne adulte étaient plus élevées que celles de l'enfant dans toutes les positions du téléphone. En revanche, à 835 MHz, les valeurs de DAS étaient plus élevées dans le modèle de crâne d'enfant que dans le modèle de crâne adulte, en particulier pour la position inclinée.

Pour mesurer les niveaux de DAS liés à l'exposition RF à des fréquences de 900 MHz, 1 800 MHz, 2 100 MHz et 2 400 MHz, des modèles de tête d'enfant (5-8 ans et 8-15 ans) et d'adultes construits à partir de données d'IRM ont été utilisés (Wiert et *al.*, 2008). La variabilité au sein d'une même catégorie d'âge a été évaluée. Les différents niveaux de DAS calculés montrent, pour les tissus cérébraux périphériques, une variabilité importante du DAS moyenné dans 1 g en fonction de l'âge et de la morphologie (facteur 2 entre un enfant de moins de 8 ans et un adulte). Pour les auteurs, ces données sont cohérentes avec l'épaisseur moindre de la peau, de la boîte crânienne et du pavillon de l'oreille conduisant à une distance plus faible entre le téléphone et les tissus et donc une exposition plus élevée.

La littérature scientifique souligne l'importance des paramètres morphologiques dans la pénétration des RF à travers les structures biologiques. Des augmentations du DAS, notamment locales, sont retrouvées chez les enfants par rapport aux adultes dans différents types de modèles, en particulier

pour certains tissus comme la peau et les tissus cérébraux situées en périphérie, mais également certaines structures profondes comme l'hippocampe.

Enfin, l'impact de l'âge sur l'exposition à travers l'influence des propriétés diélectriques et de l'anatomie sur des modèles d'adultes et d'enfants a été étudié (Christ et *al.*, 2010b). Les données suggèrent que caractéristiques géométriques des enfants ainsi que les propriétés diélectriques des tissus jeunes ne conduisent pas à une augmentation systématique et généralisée du DAS local. En revanche, l'exposition de régions à l'intérieur du cerveau de jeunes enfants (hippocampe, hypothalamus) peut être supérieure d'un rapport 1,5 à 3 par rapport aux adultes. L'exposition de la moelle osseuse peut être supérieure d'un facteur 10 à celle des adultes. Ceci s'explique par la diminution importante de la conductivité électrique de ce tissu avec l'âge. De plus, en raison de la position du cerveau par rapport à l'oreille différente chez les enfants par rapport aux adultes, l'exposition du cervelet peut être augmentée d'un facteur 2,5 chez l'enfant.

2. Rappels physiologiques sur le développement de l'enfant

Les travaux scientifiques étudiant les effets des RF sur la santé sont principalement focalisés sur deux fonctions à savoir : la fonction cérébrale et la fonction reproductrice. En effet, le téléphone mobile étant majoritairement utilisé à proximité de la tête et rangé dans la poche du pantalon, le tissu cérébral et l'appareil reproducteur sont les parties du corps les plus exposées. Dans le cadre de cette thèse, seul l'aspect cérébral est abordé, c'est pourquoi la suite de ce chapitre se focalisera sur celui-ci.

2.1. Le développement cérébral humain

2.1.1. Généralités

Le développement cérébral occupe une période particulièrement longue de la vie. Le cerveau est composé de plusieurs types de tissus, de structures cérébrales et de circuits neuronaux. Toutes ces entités ont des trajectoires développementales différentes et subissent des changements dynamiques tout au long de la vie. Ainsi, ce processus est donc non linéaire et hétérogène à la fois au niveau structural et fonctionnel.

Les phases de maturation lors de la période fœtale et l'enfance sont les plus importantes. L'essentiel du potentiel mais également de la vulnérabilité du cerveau dépendent majoritairement des deux premières décennies de la vie. Le cortex ainsi que les structures sous-corticales se développent pendant la vie embryonnaire en séquences bien organisées de prolifération cellulaire, migration et maturation. De ce fait, à la naissance, le cerveau humain possède environ 100 milliards de neurones, les structures sous corticales sont clairement identifiables et ressemblent dans leur forme à celles de l'adulte. La taille du cerveau du nouveau-né ne représente qu'un quart à un tiers de son volume adulte et continue à grandir et à se spécialiser sous l'influence d'un programme génétique avec des modifications pilotées par l'influence de l'environnement, qu'il soit bénéfique ou délétère.

2.1.2. Les principales étapes du développement cérébral

2.1.2.1. La période prénatale

Le processus neuro-ontogénétique débute à environ 2-3 semaines d'âge gestationnel avec le repliement et la fusion de l'ectoderme pour former le tube neural (Figure 14). À 5-6 semaines de gestation, les neuroblastes prolifèrent rapidement dans la zone ventriculaire. La migration neuronale présente un pic entre la 12^{ème} et la 20^{ème} semaine de gestation et se termine entre la 26^{ème} et la 29^{ème} semaine de gestation. Durant cette période, les axones et dendrites des neurones commencent à s'étendre à partir de la 5^{ème} semaine de gestation formant un réseau primitif fonctionnel.

À 32 semaines, le cortex est déjà constitué des diverses couches contenant une diversité de cellules gliales, de différents types de neurones et les principaux systèmes de neurotransmetteurs. Au 3^{ème} trimestre de gestation, l'arborisation dendritique et la synaptogenèse s'accroissent pour produire un épaississement du cortex (Huttenlocher et Dabholkar, 1997). La 34^{ème} semaine de gestation marque le pic de la synaptogenèse pendant laquelle environ 40 000 nouvelles synapses sont formées chaque seconde. Ce processus continue jusqu'au début de la vie postnatale.

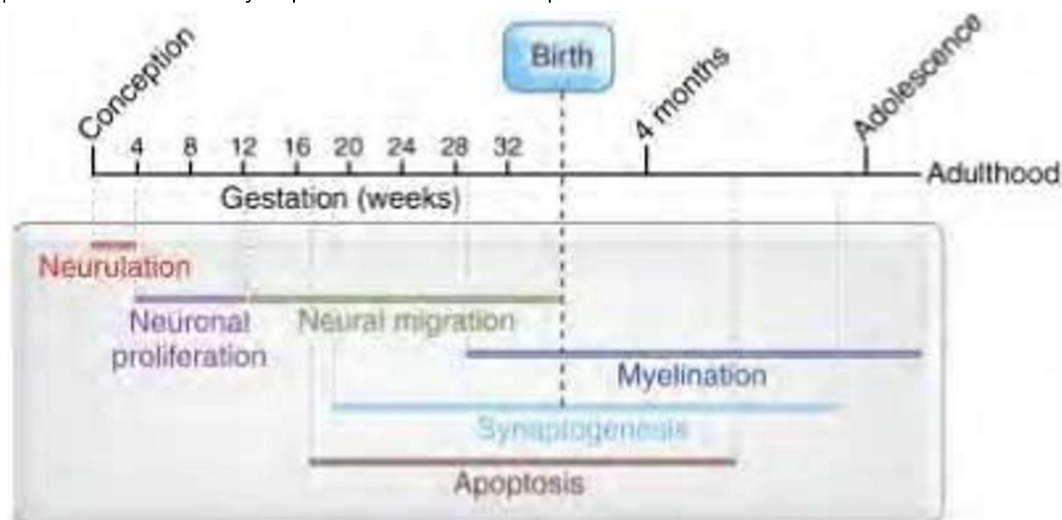


Figure 14 : Schéma des événements majeurs du développement cérébral (d'après Giedd, 1999).

2.1.2.2. La période postnatale

La période postnatale est marquée par des changements structuraux et fonctionnels. En effet, à 2-4 semaines, le cerveau du nouveau-né représente environ 36 % de sa taille adulte et grandit pour atteindre 70 % de sa taille à 1 an et 80 % à 2 ans (Knickmeyer et al., 2008). Il atteint 95 % de sa taille adulte vers l'âge de 6 ans avec un pic de volume de matière grise à 10,5 ans pour les filles et 14,5 ans pour les garçons. Bien que la neurogenèse et la migration soient encore présentes, cette croissance est majoritairement due à l'expansion de la glie et à la myélinisation. Jusqu'à l'adolescence, les circuits neuronaux continuent à se modeler en parallèle avec la formation de la myéline, la maturation du métabolisme cérébral et l'acquisition des fonctions cognitives.

2.1.3. Le développement structural

2.1.3.1. La matière grise

La matière grise du cerveau contient les corps cellulaires des cellules nerveuses. Son développement est séquentiel et présente des vitesses différentes de maturation (Figure 15) (Gogtay et Thompson, 2010). Pour débiter, les cortex primaires visuels et sensorimoteurs se développent le long des pôles frontal et occipital. Le reste du cortex se développe dans l'axe pariétal vers l'axe frontal pour finir par le cortex temporal supérieur contenant les aires associatives intégrant les informations de plusieurs modalités sensorielles (Gogtay et *al.*, 2004). En effet, le volume de matière grise dans le cortex occipital présente un pic rapidement après la naissance et est presque entièrement mature à la fin de la petite enfance alors que le volume de la matière grise du cortex préfrontal atteint un pic vers l'âge de 9 ans puis décline pour atteindre sa taille finale à la fin de l'adolescence voire chez le jeune adulte (Petanjek et *al.*, 2011).

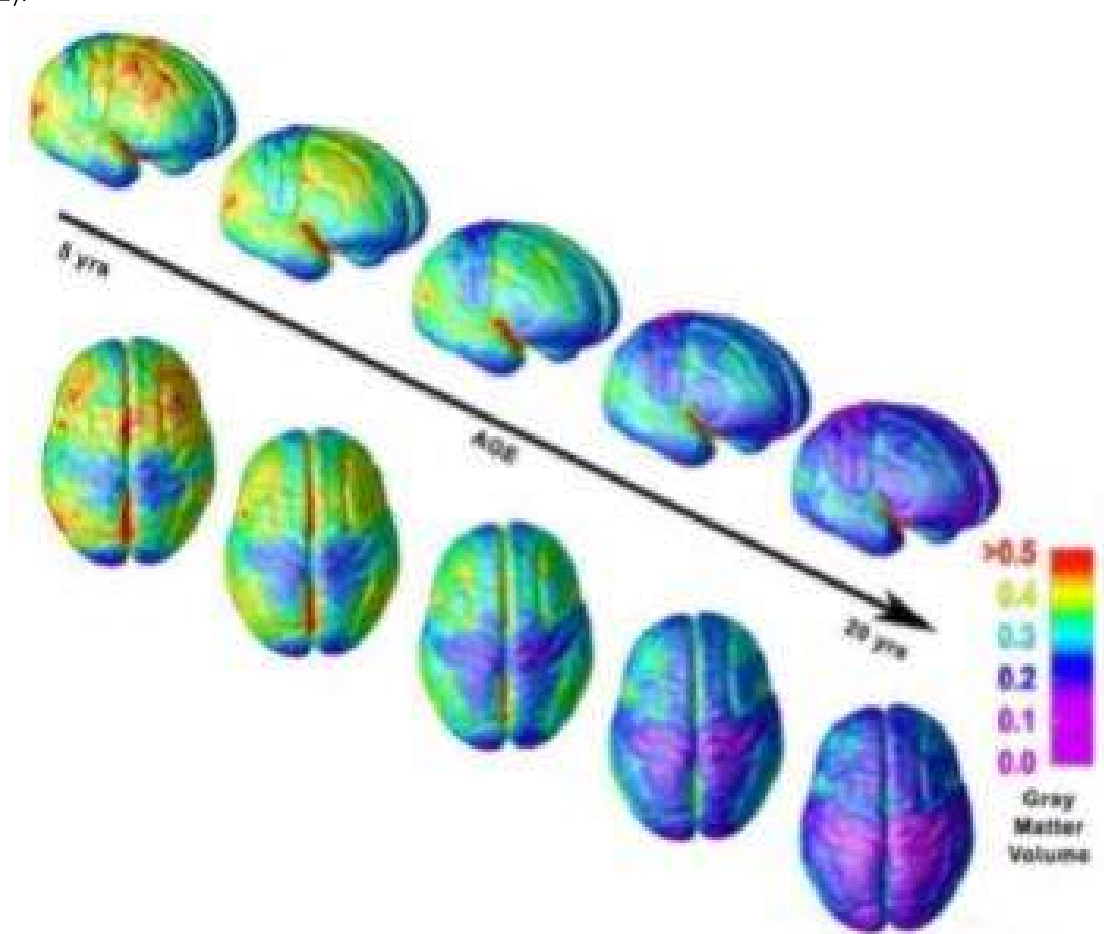


Figure 15 : Maturation régionale de l'épaisseur du cortex de 4 à 21 ans (d'après Lenroot et Giedd, 2006).

Vues latérales et du dessus de la maturation de la matière grise sur la surface corticale. La légende montre une représentation colorimétrique des unités de volume de matière grise.

Le développement de la synaptogenèse est étroitement lié au développement des régions corticales et est donc corrélé au volume de matière grise (Figure 16C). Entre 4 et 12 mois, la

synaptogenèse atteint un pic (150 % de la valeur adulte) dans le cortex visuel primaire, alors que dans le cortex préfrontal ce pic survient vers le 8^{ème} mois et se poursuit jusqu'à la 2^{ème} année (Tau et Peterson, 2010). Ainsi, le volume de matière grise présente une trajectoire développementale en forme de U inversé (Figure 16A).

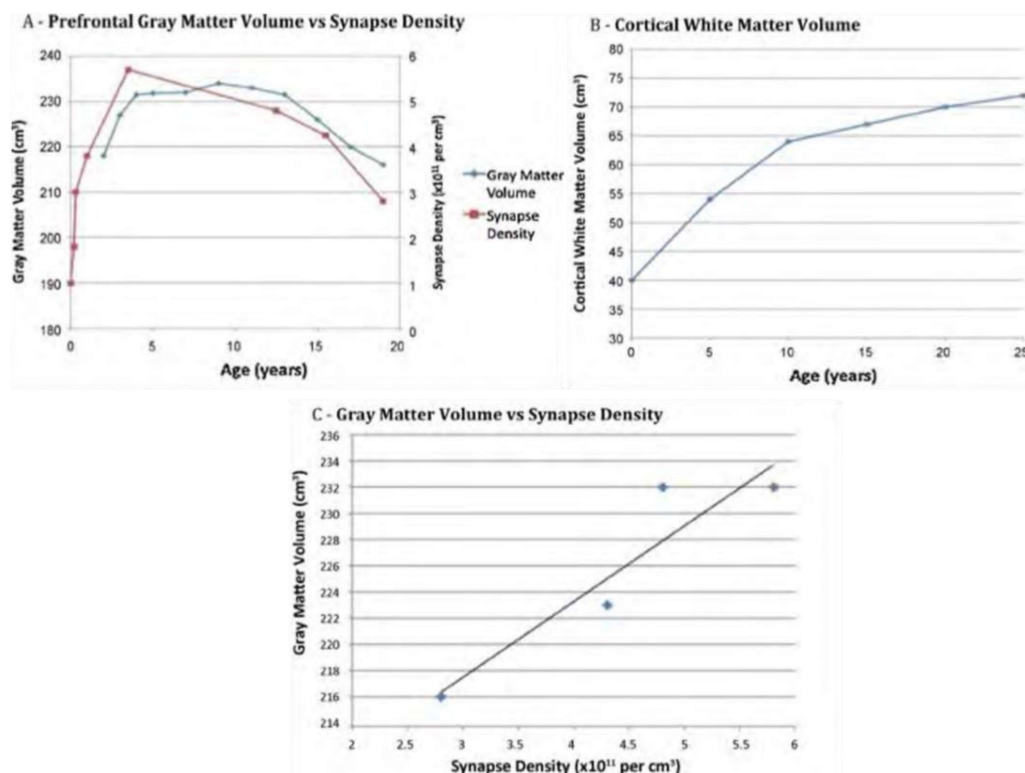


Figure 16 : Volumes de matières grise et blanche et densité synaptique en fonction de l'âge.

- (A) Volume de matière grise dans le cortex préfrontal et densité synaptique en fonction de l'âge. Rouge : Densité synaptique. Noir : Matière grise.
- (B) Volume de matière blanche corticale en fonction de l'âge
- (C) Volume de matière grise par rapport à la densité synaptique. Valeur de la régression $r=0.95$

2.1.3.2. La matière blanche et la myélinisation

La substance blanche est composée de fibres nerveuses, des axones myélinisés et non-myélinisés regroupés en faisceaux, qui connectent entre elles différentes aires de la substance grise. Le développement des circuits neuronaux est supporté par les cellules gliales et la myéline. En effet, la microglie, les oligodendrocytes et les astrocytes participent de manière importante aux fonctions neuronales incluant la régulation de la composition de l'environnement extracellulaire, le guidage de la migration neuronale, la modulation des connexions synaptiques et l'élimination des neurotransmetteurs.

La myélinogenèse est très active dans la 1^{ère} année de vie postnatale par l'augmentation du nombre de cellules gliales. Ce sont d'abord les voies sensorielles qui se « myélinisent », puis les voies motrices et ensuite les aires associatives. La myéline mature est visualisable entre la 20^{ème} et 28^{ème} semaine de gestation, d'abord dans les régions sous-corticales, puis plus tard dans les régions corticales. Des études IRM ont montré que l'apparence générale des structures chez l'enfant vers l'âge de 2 ans est

similaire à celle de l'adulte (Matsuzawa et *al.*, 2001). Contrairement à la matière grise, le volume de la matière blanche augmente tout au long de l'enfance et de l'adolescence jusqu'à l'âge adulte (Figure 16B) (Lenroot et *al.*, 2007).

2.2. Le développement de la barrière hématoencéphalique

2.2.1. Rappels et définitions

Dans le cerveau, l'environnement autour des cellules nerveuses nécessite un contrôle absolu. Ce dernier est réalisé d'une part par une protection mécanique telle que la boîte crânienne ou les méninges en protégeant le cerveau des agressions physiques, et d'autre part, par la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui joue le rôle d'une interface sélective entre le cerveau et le sang. La BHE exerce un contrôle strict des concentrations en solutés dans le tissu cérébral en maintenant l'homéostasie des fluides extracellulaires du cerveau par un prélèvement sélectif des nutriments de la circulation sanguine, mais aussi par l'efflux des déchets métaboliques et des molécules toxiques issus du sang.

La BHE est composée essentiellement de cellules endothéliales formant les capillaires cérébraux et est entourée par une membrane basale contenant des péricytes en contact étroit avec les cellules nerveuses comme les neurones ou les astrocytes (Figure 17) (Abbott et *al.*, 2010).

Les cellules endothéliales présentent des jonctions serrées entre elles réduisant fortement la diffusion passive de substances. Ainsi, elles forment une barrière physique permettant aux cellules endothéliales de contrôler finement le passage des molécules et substances variées. Les péricytes régulent les fonctions de la BHE. Les astrocytes peuvent être impliqués dans le développement et le maintien de la BHE.

Des altérations de la BHE ont été décrites dans de nombreux états pathologiques comme les maladies auto-immunes (sclérose en plaques), les pathologies infectieuses (méningites, paludisme, SIDA), mais aussi au cours de l'ischémie cérébrale, de l'hypertension, des traumatismes, ou encore dans certaines tumeurs cérébrales.

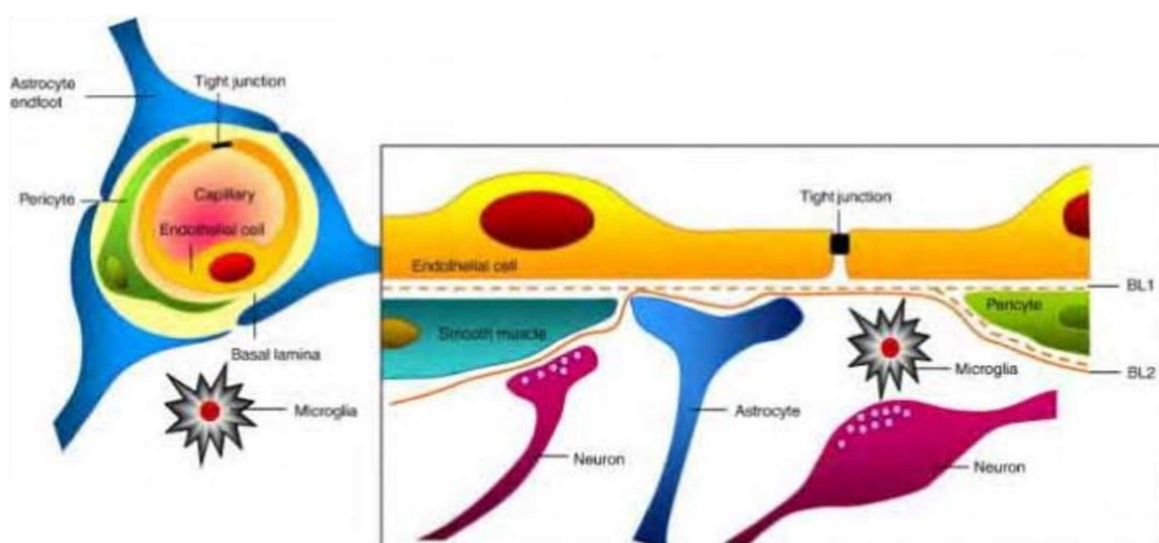


Figure 17 : Composants cellulaires de la BHE (d'après Abbott et *al.*, 2010).

2.2.2. Le développement

De nombreux mécanismes de la BHE de l'adulte sont présents dans le cerveau embryonnaire. C'est le cas par exemple des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales, qui sont fonctionnelles dès que les vaisseaux sanguins envahissent le cerveau, soit 10 - 11 jours post-conception chez le rat et la souris (Abbott et *al.*, 2010 ; Saunders et *al.*, 2012). Chez l'Homme, l'imperméabilité au colorant bleu trypan du début du 2^{ème} trimestre de gestation serait comparable à l'adulte. De même, les mécanismes de transport au niveau des interfaces sang-cerveau au cours du développement sont fonctionnels dans le cerveau fœtal et néonatal, avec pour certains de ces mécanismes des caractéristiques propres au développement. C'est le cas par exemple de l'entrée de plusieurs acides aminés, plus importante dans le cerveau immature que chez l'adulte, qui reflète des besoins métaboliques augmentés du cerveau en développement (Saunders et *al.*, 2012 ; 2014).

Ainsi, les caractéristiques de la BHE au cours du développement sont différentes de celles de l'adulte et reflètent les besoins physiologiques caractéristiques de l'âge. Le « leakiness », ou fuite de la BHE, chez l'embryon, correspond davantage à de l'immaturité. En effet, les vaisseaux sanguins immatures sont plus fragiles que ceux de l'adulte. Il faut donc considérer que l'ensemble de ces caractéristiques pourrait rendre le cerveau immature plus vulnérable aux médicaments, toxines ou conditions pathologiques, contribuant à un dommage cérébral ou des altérations neurologiques.

Chapitre 3 : Neurogenèse

1. La neuro-gliogenèse

La neurogenèse désigne la genèse de nouveaux neurones à partir de cellules souches neurales (NSCs) ainsi que leur intégration dans des circuits neuronaux préexistants. La gliogenèse est décrite comme la production de populations de cellules gliales non neuronales dérivées des NSCs. Ces processus sont majoritairement réalisés lors de l'embryogenèse (de la fécondation jusqu'à la 4^{ème} semaine de grossesse chez l'Homme ; de la fécondation à environ 10 jours chez la souris) jusqu'au 5^{ème} mois de grossesse mais également tout au long de la vie de l'individu. En effet, depuis le début du 12^{ème} siècle, les dogmes bien établis en neurosciences ont été remis en cause grâce aux progrès techniques de la recherche.

Les travaux de Joseph Altman dans les années 1960 marquent la découverte de la neurogenèse chez l'adulte. Ses recherches, menées chez le rat et le chat, démontrent la présence d'une neurogenèse post-natale dans des régions neurogéniques restreintes grâce à l'incorporation de la thymidine tritiée par autoradiographie (Altman, 1963 ; 1965 ; 1969a ; 1969b). Par la suite, Michel Kaplan a répliqué ce protocole en associant l'autoradiographie avec la microscopie électronique, et a démontré l'incorporation de la thymidine tritiée par des neurones des bulbes olfactifs (BO) et du gyrus denté chez le rat (Kaplan et Hinds, 1977 ; Kaplan, 2001). Enfin, dans les années 1980, l'équipe de Nottebohm a mis en évidence l'existence d'une région proliférative différente de la région d'intégration des neurones et a ainsi démontré l'existence d'une neurogenèse dans le cerveau adulte. Ces découvertes ont pu être mises en évidence grâce à de nouvelles techniques telles que le marquage au bromo-désoxy-uridine (BrdU, analogue de la thymidine) et à la microscopie confocale (Nottebohm *et al.*, 2002). C'est dans la dernière décennie du 20^{ème} siècle que les NSCs ont été isolées à partir de cerveaux adultes de mammifères et mises en culture sous la forme de neurosphères (Reynolds *et al.*, 1992 ; Morshead *et al.*, 1994).

Dans les années 1990, de nombreux travaux confirment la présence d'une neurogenèse postnatale au sein de deux régions neurogéniques restreintes chez les mammifères : la zone ventriculairesousventriculaire (Ventricular–Subventricular Zone ; V-SVZ) localisée au niveau des murs latéraux des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire (Subgranular Zone, SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (Lois et Alvarez-Buylla, 1993 ; Palmer *et al.*, 1997 ; Johansson *et al.*, 1999). Les NSCs persistent dans ces niches grâce à un micro-environnement spécifique favorable à la neurogenèse. En effet, ce sont des cellules progénitrices indifférenciées et multipotentes qui ont la capacité de s'auto-renouveler en produisant des cellules identiques à elles-mêmes et de produire de nouvelles cellules neuronales et gliales (Figure 18).



Figure 18 : Zones de neurogenèse dans le cerveau d'un mammifère adulte (d'après Institut des neurosciences Paris-Saclay).

En parallèle, l'équipe de Fred Gage a confirmé la neurogenèse adulte chez l'humain (Eriksson et *al.*, 1998). En réalisant des injections de BrdU puis en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre celui-ci, il a démontré que plusieurs centaines de neurones prenaient naissance dans l'hippocampe dans le cerveau adulte humain. De façon similaire, les travaux de Curtis ont permis de caractériser le système neurogénique ventriculo-olfactif chez l'humain contenant la SVZ, le courant rostral migratoire (RMS), le tractus olfactif et les bulbes olfactifs (Curtis et *al.*, 2007).

1.1. Neuro-gliogenèse embryonnaire

La neuro-gliogenèse débute à la fin de la neurulation (3^{ème} semaine de grossesse chez l'Homme ; jour 8 chez la souris). Cette dernière est une étape embryonnaire au cours de laquelle se met en place le système nerveux central (SNC). Elle se déroule en plusieurs étapes distinctes nommées neuralisation, invagination et fermeture du tube neural (Figure 19).

Lors de la neuralisation, une portion de l'ectoderme commence à se transformer en tissu nerveux sous l'action de signaux inducteurs mésoblastiques. Cette zone va prendre la forme d'une plaque neurale, localisée à l'endroit où la colonne vertébrale se situera une fois l'embryon formé. Une fois mise en place, cette plaque va s'amincir pour former une gouttière neurale, entourée par des crêtes neurales. A la troisième étape, la gouttière se plie sur elle-même au point que les deux crêtes se soudent les unes aux autres. La plaque neurale se referme sur elle-même, et forme un tube : le tube neural. La partie antérieure de ce tube donnera les cinq vésicules céphaliques : le télencéphale, le mésencéphale, le métencéphale, le diencephale et le myélencéphale.

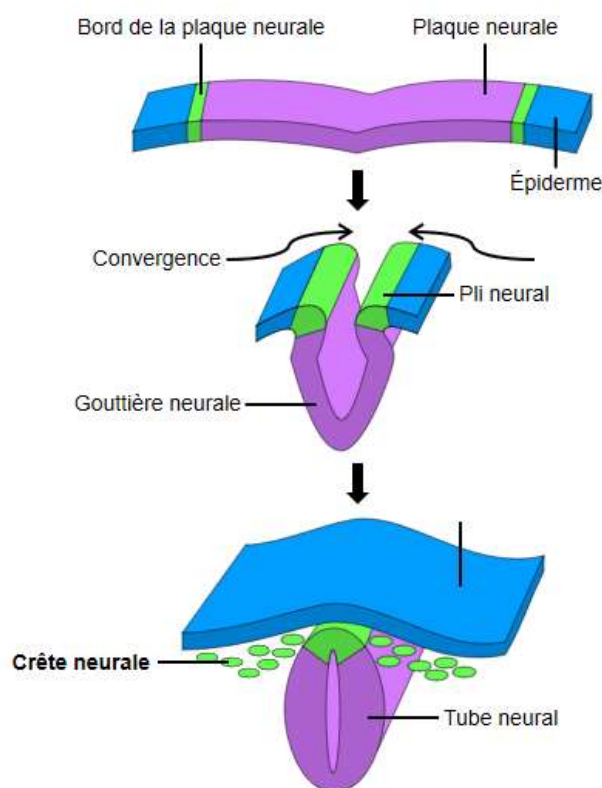


Figure 19 : Illustration des trois étapes de la neurulation (Adapté de Simoes-Costa et Bonner, 2015).

A la fin de la neurulation, le tube neural est composé d'une seule couche de cellules appelées cellules neuroépithéliales (NECs). Ce sont ces cellules qui vont initier la neurogenèse grâce à la formation d'un épithélium pseudostratifié. En effet, les noyaux des NECs vont effectuer une migration nucléaire intercinétique. Lors de ce phénomène, les noyaux subissent la mitose au pôle apical puis migrent vers le pôle basal lors de la phase S du cycle cellulaire. Au début de la neurogenèse, les NECs se replient pour former la plaque neurale puis s'invaginent pour former le tube neural. Cette transition polarise la plaque des NECs de telle sorte que le côté basal soit en contact avec la surface externe du cerveau et que le côté apical soit orienté vers l'intérieur. Les NECs se divisent de façon symétrique pour étendre la population de cellules souches et finiront par former la zone ventriculaire du côté apical.

Chez la souris, rapidement après la formation des premiers neurones vers le jour embryonnaire 10 (E10), les NECs se transforment en glie radiale apicale (aRG), qui conservent la polarité apico-basale et deviennent plus allongées. Leurs corps cellulaires résident dans la zone ventriculaire, tandis que leurs longs processus basaux s'étendent jusqu'à la lame basale et fournissent un échafaudage pour la migration neuronale vers la plaque corticale. Les aRG se caractérisent par leur capacité à s'auto-renouveler et à donner naissance simultanément à des neurones, principalement indirectement par le biais de progéniteurs intermédiaires basaux (bIP) (Noctor et *al.*, 2008 ; Rushing et Ihrie, 2016). Les bIP se délaminent de la surface ventriculaire et résident dans la zone sous-ventriculaire. Ils ne possèdent pas de polarité apico-basale et se divisent généralement symétriquement pour produire deux neurones. Les neurones néocorticaux sont organisés en six couches horizontales, les neurones de la couche profonde sont ceux nés en premier pendant la neurogenèse, suivis de la génération de neurones des couches supérieures.

Aux alentours de E17, la neurogenèse est terminée et les cellules souches et progénitrices neurales restantes passent à la gliogenèse. Elles vont générer différents types cellulaires comme des épendymocytes, des astrocytes et d'autres progéniteurs intermédiaires et immatures (Lois et Alvarez-Buylla, 1993 ; Merkle et *al.*, 2004 ; Spassky, 2005). L'ensemble de cette structure est appelé SVZ (Figure 20).

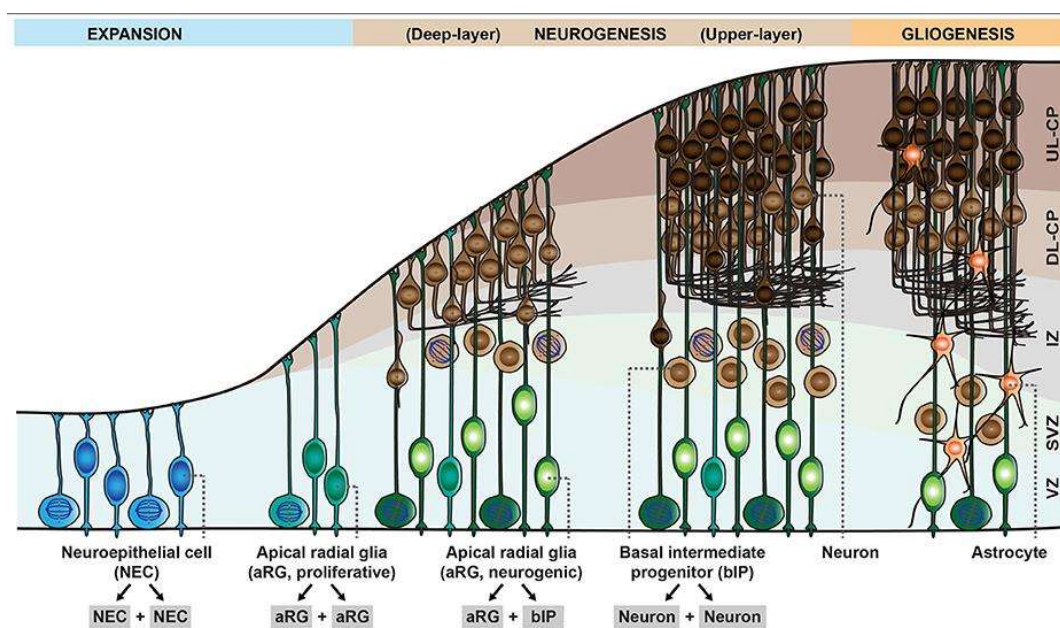


Figure 20 : Développement de la SVZ chez la souris (d'après Albert et Huttner, 2018).

1.2. Neuro-gliogenèse adulte

1.2.1. Zone ventriculaire/sous-ventriculaire

1.2.1.1. Anatomie de la niche V-SVZ

Chez les mammifères, la neurogenèse est un processus continue après la naissance et ceci dans deux régions restreintes : la V-SVZ et la SGZ (Doetsch et Alvarez-Buylla, 1996). La V-SVZ constitue la zone neurogénique la plus conséquente et possède des caractéristiques similaires à la VZ et à la SVZ embryonnaire (Doetsch *et al.*, 1997) Cette zone est constituée d'une VZ formée par des épendymocytes (cellules E) et d'une SVZ généralement formée de 4 types principaux de cellules : des astrocytes de type B1 et B2, des progéniteurs intermédiaires à division rapide (cellules C) et des neuroblastes ou neurones immatures (cellules A) (Figure 21).

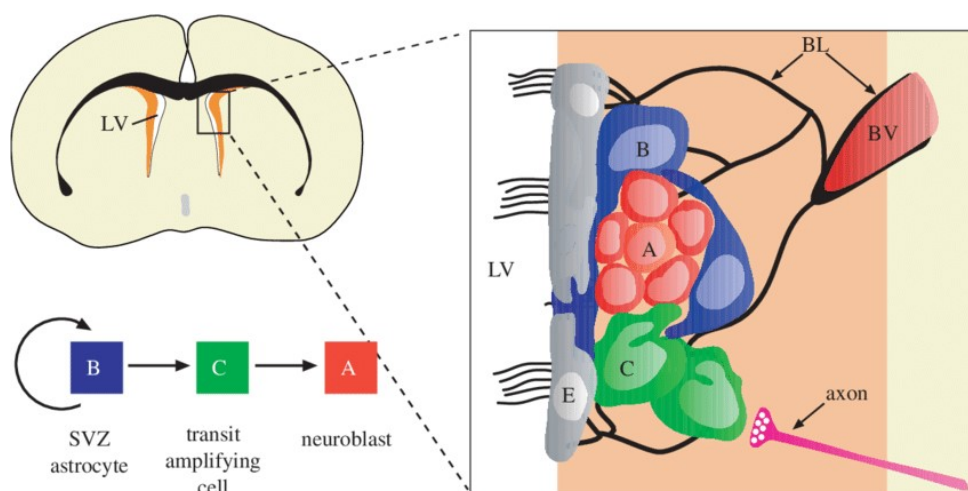


Figure 21 : Coupe de cerveau de souris adulte et composition de la V-SVZ (d'après Riquelme et al., 2008).

Les astrocytes de type B1 sont des NSCs de la V-SVZ. Largement quiescents *in vivo*, ils sont occasionnellement activés par différents signaux intrinsèques et extrinsèques. Ce type cellulaire possède toutes les caractéristiques spécifiques des cellules souches à savoir leur capacité d'auto-renouvellement et la multipotence. Ainsi, lorsqu'elles sont activées, les cellules B1 se divisent pour produire des bIP (cellules C). Les cellules C se divisent rapidement pour générer des neurones immatures ou neuroblastes (cellules A). Ces derniers migrent en chaîne en dehors de la V-SVZ par le RMS vers les bulbes olfactifs.

Avec l'âge, une diminution de la neurogenèse est constatée dans toutes les zones neurogéniques. Des changements intrinsèques et extrinsèques des cellules B1 et de leurs progéniteurs vont progressivement perturber l'organisation de la VZ. Des augmentations de gouttelettes lipidiques dans les épendymocytes vont être retrouvées et refléter des altérations métaboliques et de sécrétion.

1.2.1.2. Les épendymocytes

Chez les mammifères adultes, les épendymocytes apparaissent comme des cellules ciliées cuboïdes qui forment une couche continue tout au long de la paroi des cavités du système ventriculaire cérébral et spinal. Les cellules E dérivent des RGCs pendant le développement embryonnaire, notamment entre E14 et E16, et deviennent matures au 4^{ème} jour après la naissance. Elles ont la particularité de

développer des cils mobiles (10 à 20 μm de long) au 21^{ème} jour faisant d'elles des cellules multiciliées (axonème 9+2) (Spassky, 2005). Cette caractéristique permet de créer un flux de liquide céphalo-rachidien (LCR) dans les ventricules latéraux par un battement coordonné. L'ensemble de ces cils, appelé touffes multiciliées, protège le cerveau contre l'entrée de substances potentiellement néfastes en régulant le transport de molécules entre le LCR et le parenchyme cérébral (Figure 22) (Grondona *et al.*, 2013).

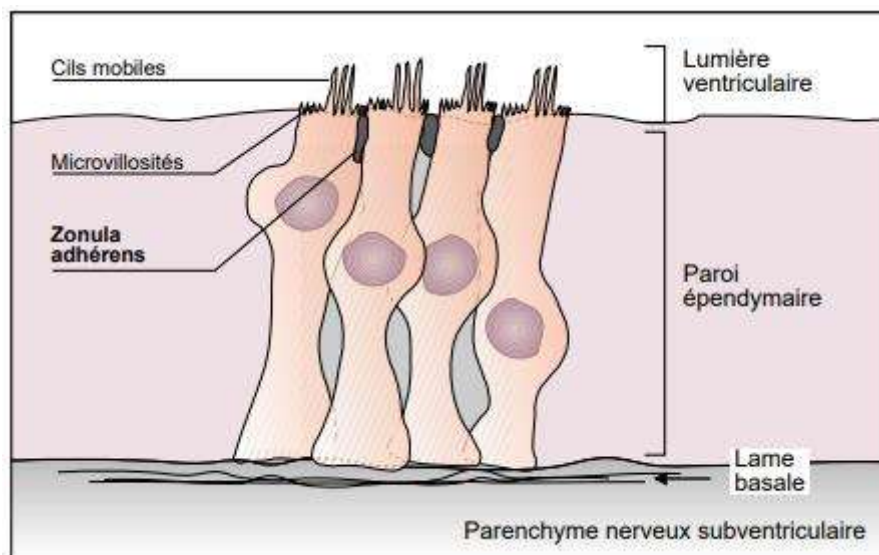


Figure 22 : Cellules de l'épendyme du ventricule latéral (d'après Peschanski, 1999).

La morphologie de l'épendyme dépend de la localisation des murs ventriculaires. Dans la niche neurogénique, les épendymocytes sont regroupés autour des cellules B1 formant une structure en rosette appelée « pinwheel ». Au centre, chaque rosette est composée du cil primaire non mobile (9+0) des cellules B1. En périphérie, deux types de cellules E sont retrouvés : des cellules E1 multiciliées avec des mitochondries près des corps basaux et des cellules E2 possédant 2 longs cils mobiles (9+2) avec de larges corps basaux et des mitochondries abondantes près du noyau. Ces dernières représentent moins de 5% des cellules de la surface ventriculaire (Figure 23) (Mirzadeh *et al.*, 2008).

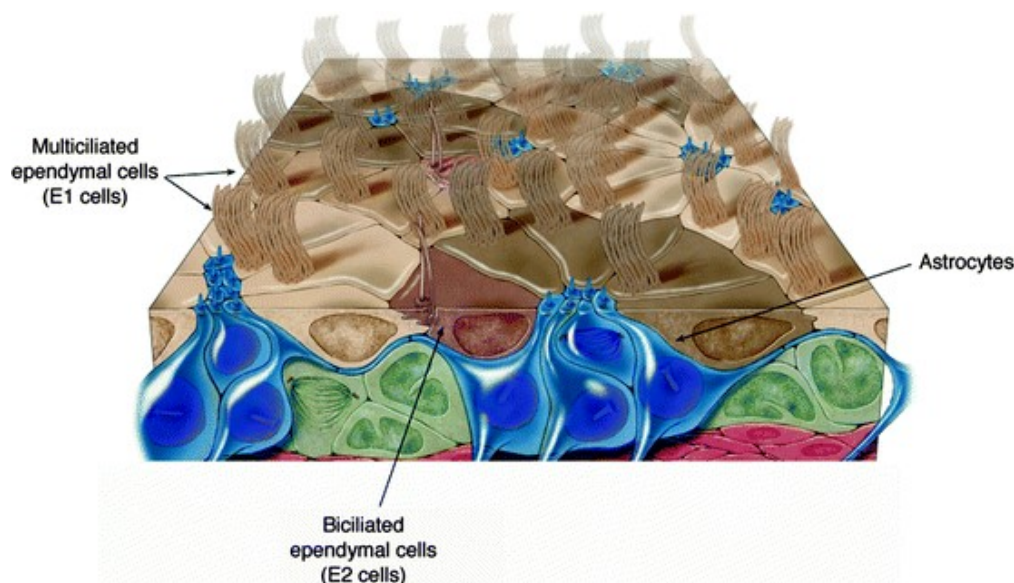


Figure 23 : Organisation de l'épendyme (d'après Lim et Alvarez-Buylla, 2014).

Les cils sont des complexes multiprotéiques composés de doublets de microtubules. Ils ont pour rôle la locomotion des micro-organismes et la génération de flux de fluides au-dessus des épithélia ciliés recouvrant de nombreux organes. La protéine FoxJ1 (forkhead domain-containing transcription factor) est associée à leur formation des cils mobiles chez les mammifères. En effet, elle va réguler le transport des corps basaux contenant la μ -tubuline vers la surface apicale des cellules E. En son absence, les RGCs de la SVZ embryonnaire échouent à la différenciation en épendymocyte conduisant à une dénudation de l'épendyme. Au niveau du SNC humain, cette perturbation est le premier évènement neuropathologique impliqué dans de nombreuses maladies du SNC telles que l'hydrocéphalie ou le *spina bifida aperta*.

L'intégrité de l'épendyme est critique pour la neurogenèse de la V-SVZ puisqu'une perturbation peut conduire à une désorganisation de la SVZ. Les cellules E contrôlent différents aspects de cette neurogenèse. En effet, ils sont responsables du destin cellulaire des progéniteurs influencés par la sécrétion de la protéine Noggin. Cette dernière est sécrétée par les épendymocytes et induit la différenciation neuronale des cellules B1. Ils sont également impliqués dans la migration rostrale des neuroblastes en lien avec le gradient de la protéine Slit2 et le contrôle de la prolifération des progéniteurs neuronaux (Grondona et *al.*, 2013). Ainsi, l'épendyme participe à la création d'un micro-environnement neurogénique essentiel à la niche de la V-SVZ.

1.2.1.3. Les astrocytes de la V-SVZ

La V-SVZ est composée de deux populations principales d'astrocytes : les cellules B1 et les cellules B2. Les cellules B1 proviennent des RGCs et correspondent à une sous-population d'astrocytes périventriculaires. Ils sont les progéniteurs primaires pour la production de neurones et d'oligodendrocytes. En effet, une fois activées en période post-natale, les cellules B1 se divisent de façon symétrique pour maintenir leur « *pool* », puis se divisent de façon asymétrique pour générer les bIP à l'origine des différentes lignées cellulaires. Localisées au centre des rosettes, les cellules B1 sont en contact avec les cellules E grâce à des jonctions d'adhésion et interagissent entre elles par des contacts cellule-cellule homotypiques de type jonctions gap (Tong et Alvarez-Buylla, 2014). Ces types cellulaires particuliers partagent des caractéristiques communes avec les astrocytes matures. En effet, il exprime des marqueurs associés aux astrocytes dont les combinaisons reflètent les états d'activation. On retrouve notamment l'expression de la GFAP (glial fibrillary acidic protein), la GLAST (glutamate aspartate transporter), le BLBP (brain lipid binding protein), le CD133, le EGFR (récepteur au facteur de croissance épidermique) ou encore le Sox2 (Alvarez-Buylla et *al.*, 2002 ; Doetsch et *al.*, 2002). La particularité morphologique des cellules B1 permet de définir trois domaines de polarité (Figure 24) :

- Le **domaine apical**, domaine I, regroupe l'interface LCR/épendyme en contact direct avec la lumière ventriculaire. Le contact avec le ventricule est établi par un cil primaire immobile. Ce dernier est chargé d'apporter des facteurs solubles pouvant moduler leur comportement et joue un rôle majeur dans la transduction des signaux Sonic Hedgehog (SHH) pendant le développement du tube neural.
- Le **domaine intermédiaire**, domaine II, correspond à la zone d'interaction entre les cellules B1, leur descendance et les autres cellules de la niche. C'est également dans cette zone que certains neurotransmetteurs tels que le GABA et le glutamate jouent un rôle essentiel au contrôle de la neurogenèse. Ils vont notamment réguler la prolifération des cellules B1 et des cellules C (Platel et *al.*, 2010).

- Le **domaine basal**, domaine III, constitue la niche périvasculaire. Les terminaisons basales des cellules B1 entourent les vaisseaux et la lame basale permettant un accès direct aux facteurs en circulation.

Lors de leur activation post-natale, les cellules B1 sont GFAP+/GLAST+/CD133+/Nestin+.

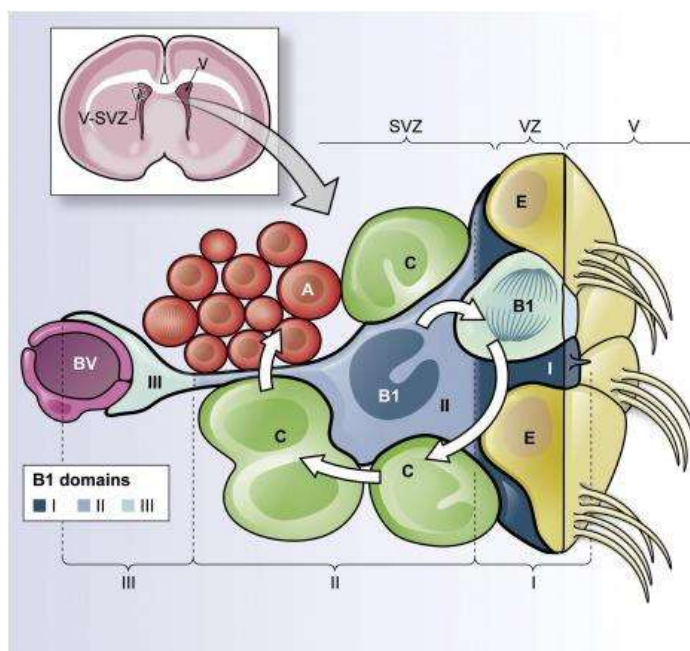


Figure 24 : Arrangement spatial des cellules B1 (d'après Fuentealba et al., 2012).

Les astrocytes de type B2, comme les épendymocytes, régulent le micro-environnement de la niche. Ce type cellulaire particulier forme une population d'astrocytes hautement prolifératifs et non neurogéniques. Ils sont localisés dans le striatum et n'ont pas de contact avec les ventricules. Ils jouent un rôle de support lors de la migration des cellules A vers les BO en formant un tube glial autour de ces dernières.

Il existe un troisième type d'astrocytes dans la V-SVZ chez les souris âgées de 4 semaines. Cette faible population a une apparence en étoile sans localisation spécifique et sans contact avec les ventricules (Platel et Bordey, 2016).

1.2.1.4. Les progéniteurs intermédiaires et immatures

Les cellules C forment un pool de progéniteurs mitotiquement actifs. Situés à proximité des vaisseaux sanguins, ils forment de petits clusters. Ce type cellulaire prolifère par divisions asymétriques et symétriques afin de générer différents progéniteurs immatures (Kazanis, 2009). Par l'expression de différents traceurs de transcription, une balance entre auto-renouvellement et prolifération/différenciation s'établit. L'expression de la neurogénine 2 (Ngn2) ou du facteur de transcription Pax6 oriente la différenciation vers la voie neuronale. Au contraire, l'expression du facteur de transcription Olig2 permet la différenciation vers la voie gliale (Cavaliere et al., 2012 ; Jones et Connor, 2012). Olig2 exerce une fonction de répression nécessaire pour prévenir la différenciation neuronale et diriger directement les progéniteurs de la SVZ vers les lignées astrocytaires et oligodendrocytaires. Les

cellules C, non engagées dans une voie de différenciation, expriment différents marqueurs tels que Nestin, Mash1, Dlx1 et Dlx2.

Les cellules A constituent les progéniteurs immatures des neurones des BO. Ces cellules migrent sur de longues distances grâce au RMS. Ce courant, formé d'une structure gliale particulière, est localisé dans la partie antérieure de la V-SVZ et s'étend le long des bords dorsaux et rostraux du ventricule latéral pour se terminer au centre du BO (Lledo et *al.*, 1998 ; Suzuki et Goldman, 2003). Les cellules A se déplacent à une vitesse de 30 $\mu\text{m}/\text{h}$ et peuvent se diviser pendant leur déplacement. La migration des neuroblastes est régulée par des gradients chémorépulseurs protéiques ainsi que des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. Une fois la migration effectuée, les cellules A se dispersent radialement et se différencient en interneurones. Ces derniers vont ensuite s'intégrer dans les circuits neuronaux pré-existants. Au moins 6 sous-types d'interneurones granulaires ou pérglomérulaires sont générés. Leur type est dépendant de leur position selon l'axe dorso-ventral et antéro-postérieur (Fuatealba et *al.*, 2015). Chez le rongeur, environ 30 000 nouveaux neurones sont générés dans les BO chaque jour (Alvarez-Buylla et *al.*, 2001). Les cellules C expriment des marqueurs spécifiques : la doublecortine (DCX), le Tuj1 (Neuron-specific class III bêta-tubulin) et la PSA-NCAM (Polysialic Acid- Neural Cell Adhesion Molecule).

La lignée cellulaire des oligodendrocytes est la dernière à être générée après les neurones et les astrocytes. Au cours du développement embryonnaire à la période post-natale, la production se fait en plusieurs vagues (El Waly et *al.*, 2014). Seule une sous-population minoritaire d'oligodendrocytes est générée dans la V-SVZ. La majorité étant retrouvée dans l'éminence ganglionnaire dans le cerveau central. Générés par les cellules B1, les progéniteurs immatures d'oligodendrocyte (OPC) migrent sur de courtes distances dans le fimbria fornix, le corps calleux et la substance blanche du striatum où ils se différencient en oligodendrocytes matures myélinisants (Menn et *al.*, 2006 ; Jones et Connor, 2012). Les OPC sont composés de cellules quiescentes ou en prolifération. Elles représentent entre 2 et 9 % des cellules du SNC. Les marqueurs spécifiques des OPCs sont : NG2, PDGFR β , O4 ; Olig2, Olig1 et Nkx2.2. Dans le cas de gliomes, de maladies neurodégénératives ou après des dommages cérébraux, il a été rapporté une augmentation de l'expression du facteur Olig2. Ce dernier induit une expansion du pool de progéniteurs neuronaux et affecte la spécification et la différenciation des oligodendrocytes. Le ligand SHH, morphogène critique pour le développement du cerveau, est un autre facteur impliqué dans la spécification des OPC. En effet, il permet l'orientation de la différenciation en OPC via des interactions spatio-temporelles avec différents marqueurs de transcription (Ortega et *al.*, 2013). En complément, le glutamate extracellulaire stimule les récepteurs NMDA induisant la différenciation en oligodendrocytes et la myélinisation (Cavaliere et *al.*, 2012).

1.2.1.5. Les cellules microgliales

Des cellules microgliales composent également la V-SVZ. Ces cellules correspondent aux macrophages résidents du SNC et représentent environ 10 % des cellules gliales du cerveau (Greter et Merad, 2013). Leur morphologie cellulaire reflète leur état d'activation (Streit et Xue, 2009). Leur rôle le plus connu est de fournir une réponse immunitaire contre des pathogènes en libérant des chimiokines ou des cytokines. Récemment, Lira-Diaz et Gonzalez-Perez (2016) ont démontré leur rôle essentiel dans

la neurogenèse, la protection neurale et la différenciation cellulaires pendant le développement cérébral. Pendant l'embryogenèse, la microglie maintient la balance neuronale en éliminant le surplus de neurones par phagocytose (Morrens et *al.*, 2012). Chez l'adulte, elle est présente dans la V-SVZ en contact étroit avec les cellules B1 et stimule la neurogenèse en libérant des facteurs solubles dans la niche par des mécanismes de rétrocontrôles. En condition pathologique, ces mécanismes sont accentués. Une fois activée, la microglie phagocyte les débris cellulaires et libère des facteurs neurotrophiques et des cytokines activant les cellules B1. Ces dernières vont activer la survie cellulaire et la régénération du site de lésion.

La phagocytose microgliale est un des principaux mécanismes de régulation et de maintien de l'homéostasie dans la production des progéniteurs dans le cerveau en post-natal.

1.2.1.6. *Vascularisation et innervation*

Les vaisseaux sanguins sont des composants intégrés dans la V-SVZ. Ils présentent des propriétés uniques permettant la prolifération et la régénération des cellules B1. En effet, ces dernières ainsi que les cellules C sont adjacentes au plexus vasculaire avec des zones de contact direct. Ce phénomène leur permet d'être les seules cellules à recevoir des signaux de la circulation sanguine, régulant ainsi leur auto-renouvellement et leur différenciation (Tavazoie et *al.*, 2008). Leur composition diffère des vaisseaux sanguins des régions non neurogéniques. On retrouve notamment des cellules endothéliales, des péricytes, des fibroblastes et des macrophages.

Les innervations ont pour rôle de libérer des neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de la neurogenèse de la V-SVZ. Ces innervations proviennent de neurones sérotoninergiques du raphé, de neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale ainsi que de neurones à choline acétyl-transférase du striatum (Lim et Alvarez-Buylla, 2014).

1.2.2. *Zone sous-granulaire de l'hippocampe*

La zone sous-granulaire de l'hippocampe est formée à partir du neuroépithélium denté. Sa formation implique des progéniteurs cellulaires particuliers éloignés de la VZ et à proximité de la pie-mère. La maturation de l'hippocampe est tardive et s'étend de l'embryogenèse tardive au développement postnatal précoce. Ce mécanisme est à l'origine du chevauchement de la formation du gyrus denté et de l'apparition des NSCs. C'est une zone proliférative active tout au long de la vie de l'individu devenant le site de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte ou la SGZ (Altman et Bayer, 1990).

La SGZ du gyrus denté de l'hippocampe est située entre le hile et la couche granulaire. Le micro-environnement permissif permet la prolifération des NSCs et leur différenciation en neurones granulaires du gyrus denté dont les projections axonales sont retrouvées vers la région CA3 de l'hippocampe. La SGZ est composée de deux populations d'astrocytes : les astrocytes radiaires et les astrocytes horizontaux. Les astrocytes radiaires, également appelés cellules de type 1 de la couche radiaire, représentent les NSCs. Ils sont situés en profondeur dans le parenchyme cérébral, loin des murs ventriculaires et sont

entourés par des neurones et de la glie. Les marqueurs spécifiques sont la GFAP, la Nestin, la vimentine, le S100 β et le Sox2. Les astrocytes horizontaux sont localisés sous la couche granulaire (Nestin-/S100b+) (Alvarez-Buylla *et al.*, 2002).

Plusieurs étapes sont nécessaires au développement des neurones matures. Les astrocytes radiaux peuvent générer des progéniteurs intermédiaires, appelés cellules de type 2 (IPC2a et IPC2b), ayant les mêmes caractéristiques que les cellules B1 de la SVZ. Elles sont proches de la structure des astrocytes. Les cellules de type 2 envoient de longs prolongements vers des corps cellulaires et des vaisseaux éloignés de la niche (Fuentesalba *et al.*, 2012). Les IPC2a prolifèrent ou se différencient en IPC2b, qui à leur tour se différencient en neuroblastes. Ces derniers vont se différencier en neurones immatures puis en neurones granulaires matures du gyrus denté (Gonçalves *et al.*, 2016). Les neurones nouvellement formés migrent sur une courte distance et projettent leurs axones vers les neurones CA3. Les progéniteurs migrent seulement sur quelques micromètres le long des fibres radiales de la couche sub-granulaire vers la couche granulaire du gyrus denté. De ce fait, ils ne sortent pas de l'hippocampe (Cayre *et al.*, 2009). Environ 9 000 nouvelles cellules sont produites par jour correspondant à 0.03 % de la population totale du gyrus denté (Figure 25).

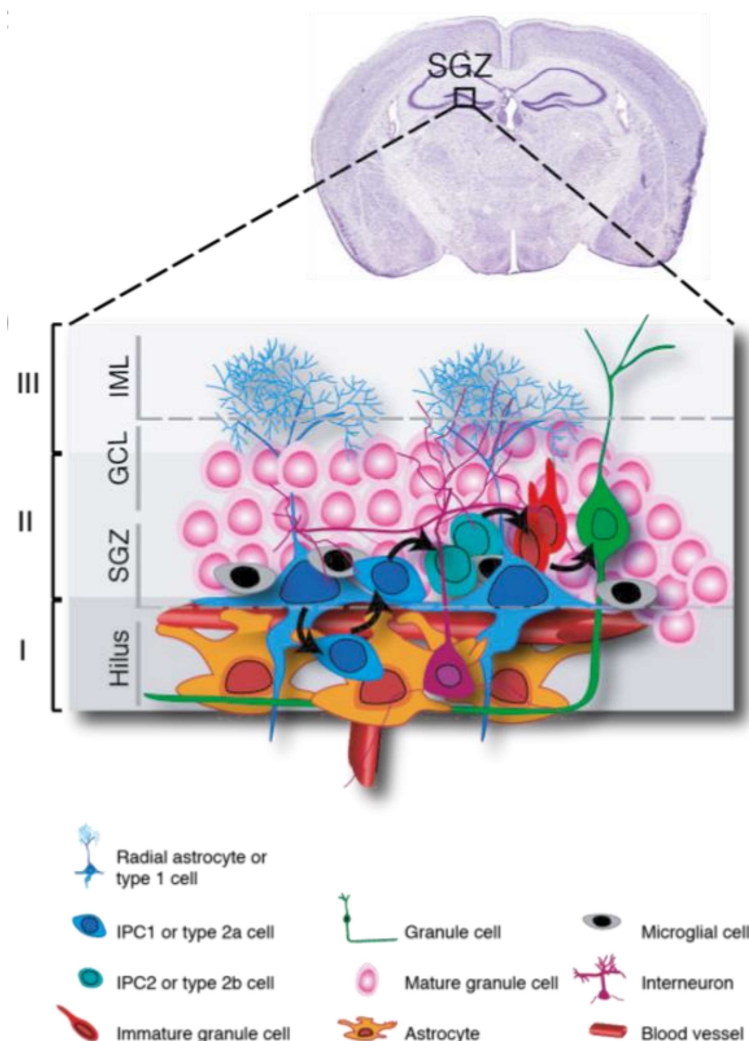


Figure 25 : Coupe de cerveau de souris adulte et composition de la SGZ (d'après Donegà *et al.*, 2013).

1.3. Voie de régulation de la neurogenèse

L'auto-renouvellement et la différenciation des progéniteurs sont régulés par un micro-environnement spécifique appelé « niche ». L'homéostasie de ces niches est contrôlée par des signaux intrinsèques et extrinsèques.

1.3.1. La voie Notch

La voie de signalisation Notch est un mode fondamental de communication entre cellules voisines. Elle est fréquemment impliquée dans des choix de différenciations cellulaires via le processus d'inhibition latérale qui limite la propagation d'un type de différenciation ou via l'induction latérale qui homogénéise les choix de destinées au sein d'une population. La voie canonique est requise pour le développement embryonnaire, la régulation homéostatique et le maintien des NSCs (D'Souza et *al.*, 2008).

La voie canonique de Notch joue un rôle très actif dans les NSCs de la V-SVZ. Elle régule le pool de cellules souches durant le développement et chez l'adulte, et réprime la différenciation neuronale et celle des oligodendrocytes au profit de la lignée astrocytaire (Grandbarbe, 2003) (Figure 26). En l'absence de cette voie, il a été observé une perte complète des NSCs dans le télencéphale en développement et adulte. Ce résultat montre le besoin absolu de la voie Notch pour le maintien des NSCs (Imayoshi et Kageyama, 2014).

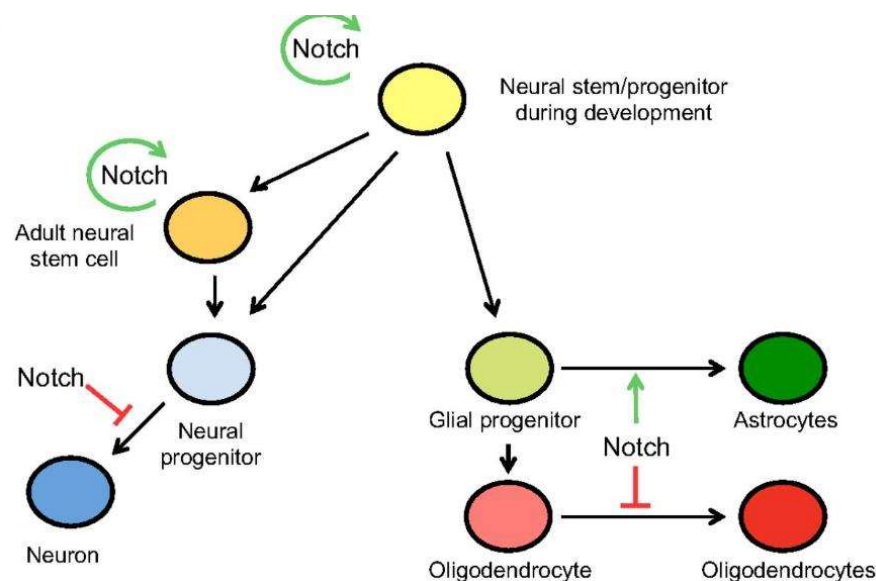


Figure 26 : Effets de la voie Notch sur la différenciation des NSCs (d'après la thèse de Justyne Feat, 2018).

Brièvement, les produits de gènes pro-neuronaux tels que les facteurs de transcription bHLH, Mash1 et Ngn/2 induisent la différenciation neuronale des progéniteurs. Ces gènes sont également activés par l'expression des ligands de la voie Notch Delta-like1 (Dll1) et Jagged1 (Jag1) activateurs du récepteur Notch. La fixation des ligands sur le récepteur Notch entraîne un clivage protéolytique de Notch par la protéine ADAM puis par l'enzyme g-sécrétase. De ce fait, le domaine intracellulaire de Notch, appelé NICD, est libéré puis transloqué dans le noyau où il forme un complexe avec la protéine Bp1 (recombining binding protein suppressor of hairless). Le complexe NICD-Bp1 joue un rôle d'activateur

transcriptionnel et induit l'expression des gènes répresseurs bHLH, tels que *Hes1* et *Hes5*. Ces derniers vont réprimer l'expression des gènes pro-neuronaux et de *Dll1* inhibant ainsi la différenciation neuronale (Figure 27)(Kopan et Ilagan, 2009).

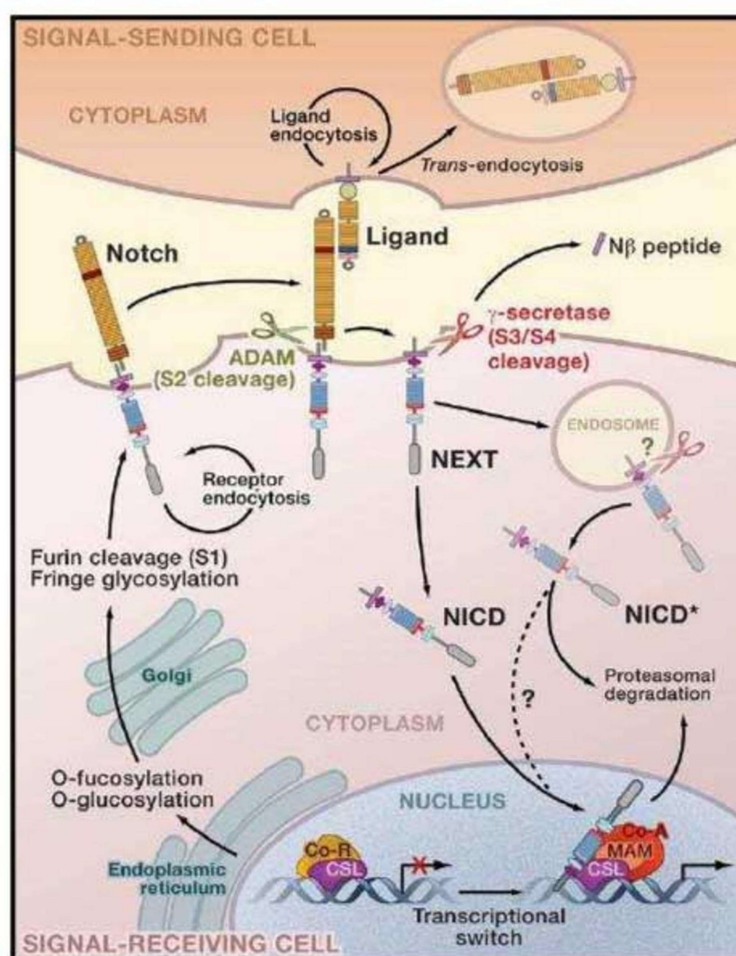


Figure 27 : Voie de signalisation Notch (d'après D'Souza et al., 2008).

1.3.2. La voie Hedgehog

La voie de signalisation Hedgehog (HH) contrôle un ensemble de processus activés au cours du développement embryonnaire comme la différenciation et la prolifération cellulaires et l'organogenèse. Chez l'adulte, cette voie est impliquée dans le maintien et la réparation des tissus.

La protéine SHH est un ligand actif majeur jouant le rôle de morphogène spécifiant le destin cellulaire le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière et le rôle de mitogène en régulant la cinétique du cycle cellulaire des progéniteurs cellulaires. Elle accélère notamment les phase G1 et G2. De plus, le ligand SHH participe au guidage des axones et à la formation des microcircuits corticaux dans le cerveau en développement (Agathocleous et al., 2007).

Dans la V-SVZ, SHH est produits par des petits groupes de neurones du cerveau ventral. Les cellules B1 sont principalement réactives à SHH grâce à leur cil primaire. Une fois secrétées, elles lient au récepteur transmembranaire homologue de Patched (PTCH). En l'absence de SHH, PTCH interagit avec la

protéine transmembranaire SMO (smoothened) la maintenant ainsi inactive. La fixation de SHH va libérer SMO et lui permettre d'induire une cascade d'évènements moléculaires, en particulier la translocation nucléaire des facteurs de transcription GLI (GLI1, GLI2 et GLI3) au niveau du cil primaire (Figure 28)(Feng et *al.*, 2016). Ces facteurs vont induire l'expression de nombreux déterminants du destin des cellules B1 tels que Nkx6n Nkx2.2, Olig2 et Irx3 (Kong et *al.*, 2015).

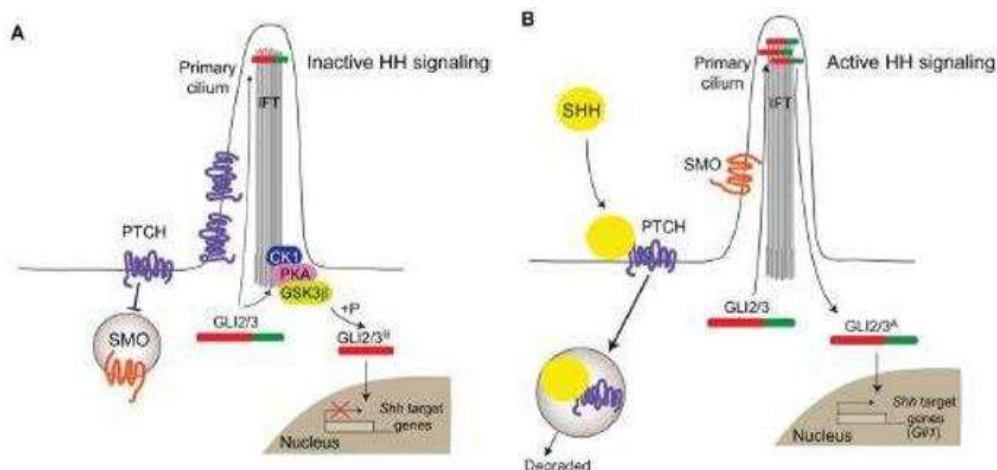


Figure 28 : Voie de signalisation Hedgehog (d'après Petrova et Joyner, 2014).

(A) Inactivation de la voie HH

(B) Activation de la voie HH : SHH est libéré par des cellules sécrétrices et se fixe sur ses récepteurs PTCH à la surface cellulaire pour lever l'inhibition du récepteur couplé à une protéine G SMO et permettre l'activation des facteurs de transcription GLI au niveau du cil primaire des cellules B1. La présence de SMO module la protéolyse et l'activité des facteurs de transcription de la faille GLI régulant en retour l'expression de nombreux déterminants du destin des cellules B1 tels que Nkx6.1, Nkx2.2, Olig2 et Irx3

Pendant le développement, SHH est requis pour la spécification des RGCs en OPC précoces dans les régions ventrales de la moelle épinière et du cerveau et induit la prolifération des cellules Olig2-positives (Ortega et *al.*, 2013). SHH régule la structuration et la prolifération des précurseurs cellulaires en périodes post-natales et est associé à la production des oligodendrocytes (Tong et *al.*, 2015).

1.3.3. La voie Wnt

La voie Wingless (Wnt) participe à l'embryogenèse et à l'établissement des niches neurogéniques. Dans ces dernières, elle est impliquée dans la prolifération et la différenciation des NSCs (Kriska et *al.*, 2016). Une perturbation causée par dérégulation et/ou des mutations des protéines impliquées dans cette voie est associée à différentes pathologies comme l'autisme, la maladie d'Alzheimer ou le cancer.

Les gènes Wnt sont hautement conservés. Les ligands Wnt sont des glycoprotéines. Chez les mammifères, 19 ligands Wnt ont été découverts (Toledo et *al.*, 2008). Le récepteur Wnt, appelé Frizzled (FZD), possède sept domaines transmembranaires et est associé à différents co-récepteurs tels que LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related preoteins). Il existe trois voies Wnt : une voie canonique β -caténine-dépendante et deux voies non canoniques β -caténine-indépendantes (Lim et Alvarez-Buylla, 2016).

La voie canonique correspond à une régulation des niveaux de β -caténine cytosolique (Figure 29A). En absence de ligands Wnt, le pool de β -caténine est maintenu à un faible niveau. En effet, les enzymes CK-1a et GSK-3b phosphorylent la région N-terminale de la β -caténine cytosolique conduisant à son ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéosome. En présence de ligand Wnt, le récepteur FZD et LRP5/6 forment un complexe. Ce dernier recrute la protéine Disheveled (DVL) entraînant à son tour le recrutement du complexe de destruction axine/CK-1a/GSK-3b/APC. Une fois recrutée, CK-1a phosphoryle LRP5/6 inhibant ainsi le complexe de destruction. La β -caténine est alors stabilisée et s'accumule dans le cytosol où elle est transloquée dans le noyau pour s'associer à des facteurs de transcription tels que TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) pour l'induction des gènes cibles Wnt tels que c-Myc, cycline D1 ou CamKIV (Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase type IV). Le complexe β -caténine/TCF est essentiel dans un grand nombre de processus développementaux tels que la plasticité synaptique à long terme et la survie cellulaire. Cependant, une mauvaise activation de ce complexe est rapportée dans de nombreuses maladies neurologiques comme le cancer, la maladie d'Alzheimer ou les troubles bipolaires (Abe et Takeichi, 2007).

Les deux voies non canoniques β -caténine-indépendantes se différencient en fonction des signaux intracellulaires déclenchés (Figure 29 B et C). La voie Wnt/JNK est impliquée dans la régulation de la polarité tissulaire et la migration cellulaire pendant le développement. La fixation du ligand Wnt sur le récepteur FZD active les protéines GTPase Rho et Rac stimulant respectivement à leur tour les protéines ROCK et JNK. Leur activation conduit à la production de facteurs de transcription tels que ATF2 (activating transcription factor 2). La voie Wnt/ Ca^{2+} est impliquée dans la formation des synapses. La fixation du ligand Wnt sur FZD stimule la protéine G activant à son tour la PLC. Cette dernière active la production de DAG et de IP3 déclenchant une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium au niveau du réticulum endoplasmique, une diminution de la cGMP (cyclic guanosine monophosphate) et une activation de CamKII/PKC/calciéurine. Au terme de cette cascade de signalisation, de nombreux facteurs de transcriptions sont produits dont CREB (cAMP Response Element-Binding Protein-1)(Oliva et *al.*, 2013).

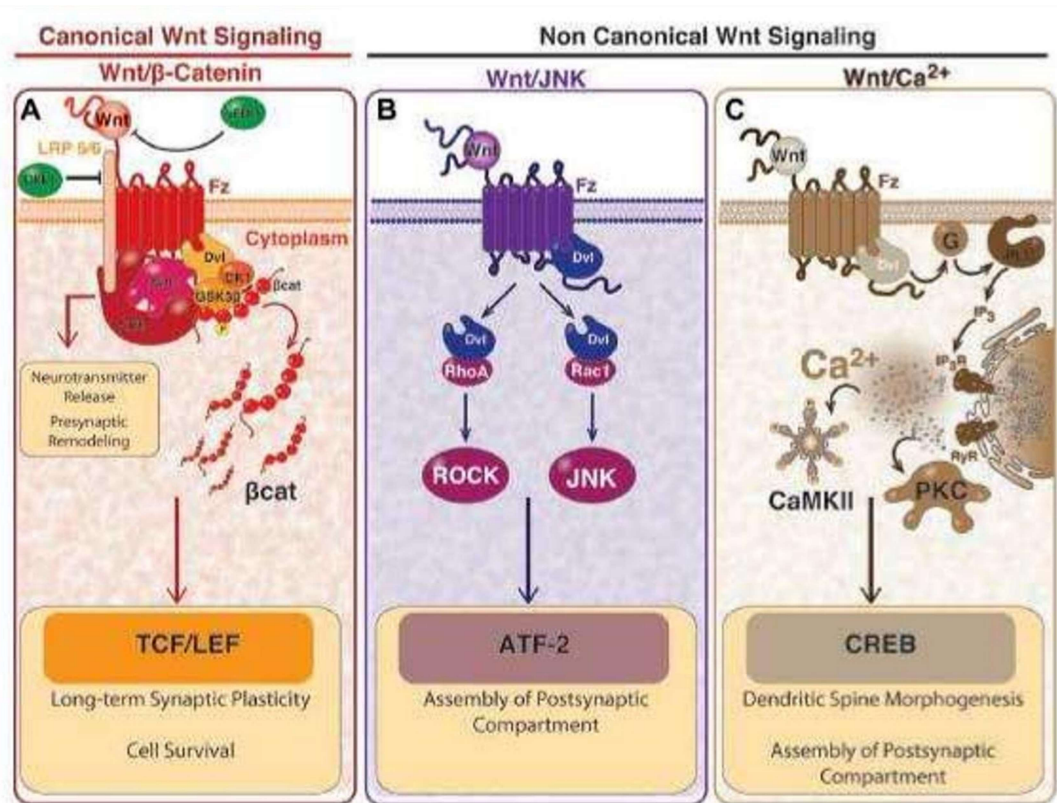


Figure 29 : Voies de signalisation Wnt (d'après Oliva et al., 2013).

(A) Activation canonique de la voie Wnt/ β -caténine. Cette voie débute avec la fixation du ligand Wnt sur les récepteurs FZD et les corécepteurs LRP5/6 conduisant au recrutement des protéines DVL et à la formation du complexe de destruction de la β -caténine. L'inhibition de ce complexe induit une accumulation de β -caténine et sa translocation dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles tels que LEF et TCF. Cette voie canonique participe à la plasticité synaptique et à la survie cellulaire.

(B) Activation non canonique de la voie Wnt/JNK. Dans cette voie, le ligand Wnt fixé au récepteur FZD induit l'activation des protéines Rho et Rac. Ces protéines interagissent avec ROCK et JNK respectivement pour permettre la transcription des gènes ATF2.

(C) Activation non canonique de la voie Wnt/ Ca^{2+} . Dans cette voie, le ligand Wnt fixé au récepteur FZD active une protéine G qui à son tour active la PLC pour la production de IP3. L'IP3 induit la libération de Ca^{2+} par le RE et conduit à l'activation des PKC et CaMKII. Dans cette voie, le facteur de transcription CREB est activé et joue un rôle dans la formation des synapses.

1.3.4. Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines nécessaires à l'initiation ou à la régulation de la transcription d'un gène (Figure 30). Ils interagissent avec l'ADN de façon directe en se fixant dessus ou de façon indirecte avec des co-répresseurs/activateurs s'associant à l'ARN polymérase influençant leur fixation sur l'ADN. Il existe deux classes de facteurs pro-neuronaux : les facteurs bHLH et les facteurs à homéodomaines. Les facteurs bHLH possèdent un motif structural avec deux hélices alpha permettant une homo ou hétérodimérisation avec d'autre bHLH et leurs cofacteurs. Ils regroupent les facteurs Mash1, Ngn1/2, NeuroD, Atonal et Olig1/2. Les facteurs à homéodomaines sont Pax6 (Paired domain), NK2 box, Dlx (Polyhistidine) et Lhx2 (LIM domain)(Jones et Connor, 2012).

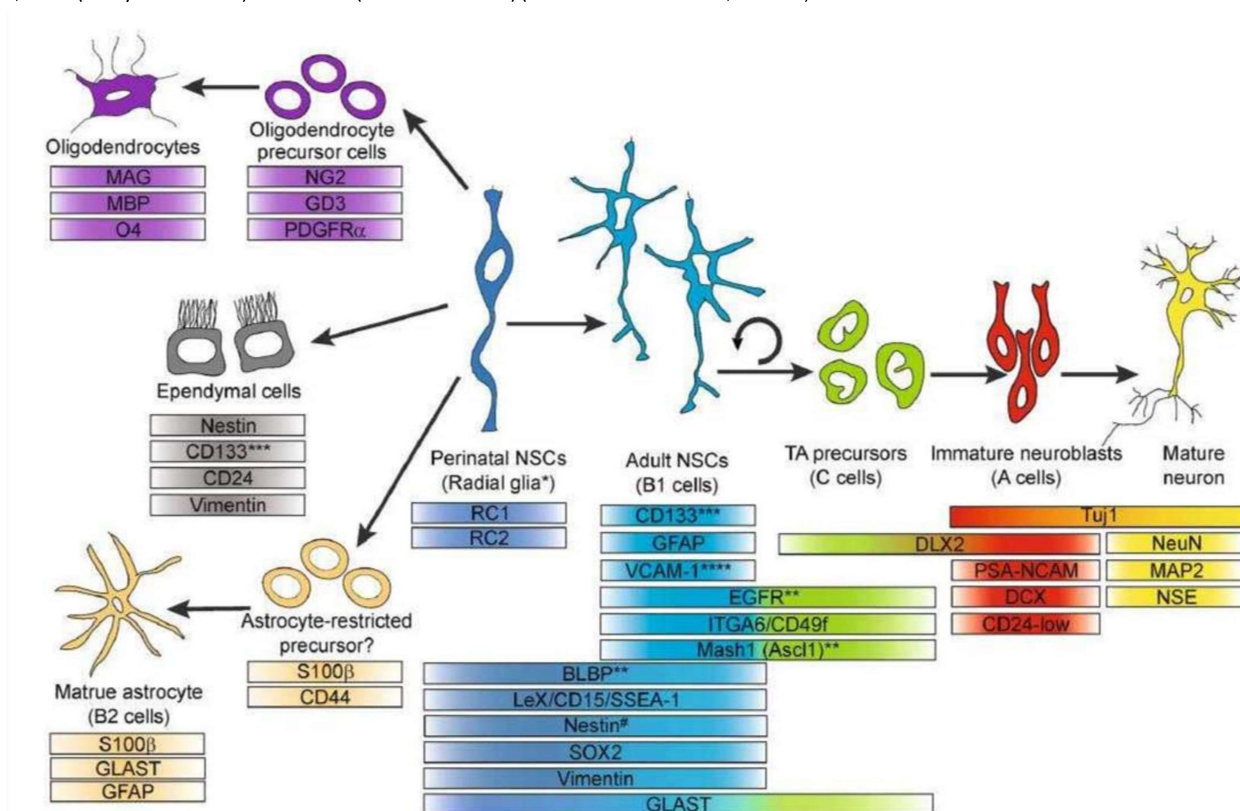


Figure 30 : Profils d'expression des lignées cellulaires neuronales postnatales et d'expression des marqueurs (d'après Rushing et Ihrle, 2016).

Les RGCs ne persistent que pendant la première semaine postnatale et ne se renouvellent pas d'elles-mêmes pendant cette période. Elles disparaissent après le deuxième jour postnatal chez la souris et donnent naissance à des astrocytes de type B2 parenchymateux (orange), des épendymocytes (gris), des oligodendrocytes (violet) et des NSCs de type astrocyte (cellules B1, bleu). Les cellules B s'auto-renouvellent et donnent naissance à des cellules C (verts), qui, à leur tour produisent des neuroblastes (rouges) qui se transforment en neurones (jaunes). **Ces marqueurs sont principalement exprimés par des cellules B1 activées. ***Le CD133 est présent sur les cils primaires des cellules B1, ainsi que sur les cellules E. ****VCAM-1 est exprimé sur des cellules B1 quiescentes. # A noter que Nestin n'est pas exprimée par toutes les RGCs et les cellules B1 mais est plutôt dynamiquement régulée.

Mash1, Ngn2 et Olig2 sont impliqués dans la régulation du devenir des NSCs pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte. Olig2 joue un rôle déterminant pour le développement de la SVZ en postnatal. Il est spécifiquement exprimé par les progéniteurs gliogéniques dans la SVZ postnatale et par les lignées gliales dérivées de cette zone. Olig2 possède une fonction de répression suffisante et nécessaire pour prévenir la différenciation neuronale et pour diriger directement les progéniteurs de la SVZ vers les oligodendrocytes mais également les astrocytes (Fukuda et *al.*, 2014). Mash1 est exprimé par les cellules C de la SVZ destinées à se différencier en interneurons GABAergiques des BO. Dans la SGZ, Mash1 est exprimé transitoirement dans les progéniteurs de type 2 destinés à se différencier en neurones granulaires glutamatergiques (Kim et *al.*, 2007). Ng2 est un facteur spécifique de la différenciation neuronale et est suffisant pour induire la production de neurines dopaminergiques matures et fonctionnels des BO (Kele, 2006 ; Thomas et *al.*, 2012). Lorsque Ng2 est associé à Mash1, ces facteurs jouent un rôle dans la formation des neurites, la survie et la prolifération cellulaire.

Sox2 est important pour la maturation neuronale, la formation des dendrites et la différenciation des neurones GABAergiques dans les BO. Sox11 a une expression temporellement restreinte dans les neurones immatures de la SGZ et de la SVZ. Sox9 agit en médiateur de la différenciation neuronale par induction des micro-ARN miR-124 (Wegner et *al.*, 2011).

Lors du développement, l'organisation du télencéphale est régulée par les facteurs à homéodomaine Pax6, Dlx2 et Emx2. Emx2, largement exprimé dans le cerveau en développement, joue un rôle pour la morphogenèse du SNC. Il est exprimé par les précurseurs intermédiaires de la SVZ et de la SGZ. En induisant une division symétrique des NSCs, Emx2 régule négativement la prolifération des cellules C (Zhang et Jiao, 2015). Pax6 est exprimé par les cellules A de la V-SVZ migrant dans le RMS vers les BO. Ce facteur induit la différenciation des cellules A en neurones dopaminergiques périglomérulaires (Hack et *al.*, 2005). Dlx2 (distal-less) est un facteur exprimé par les cellules C et les cellules A de la V-SVZ. Ce facteur induit la différenciation des précurseurs neuronaux en neurones dopaminergiques périglomérulaires dans les BO en coopération avec Pax6. Il participe également au maintien de la prolifération des cellules C. *In vitro*, Dlx2 permet la différenciation des cellules B1 en cellules C en augmentant l'expression du EGFR dans les cellules de la V-SVZ (Faigle et Song, 2015).

1.3.5. Les morphogènes BMPs

Les BMP (Bone Morphogenetic proteins) sont des membres de la superfamille des TGF- β (transforming growth factor). Ce sont des protéines clés jouant un rôle dans le développement embryonnaire notamment dans la formation des os et du cartilage mais également dans l'induction du neuroectoderme, la spécification des cellules des crêtes neurales et dans l'organisation neurale.

La voie principale de signalisation des BMP, appelée voie canonique, fait intervenir des récepteurs de type II (BMPRII) sur lesquels se fixe le ligand, et des récepteurs de type I (BMPRI)(Figure 31). Trois récepteurs différents de type II, BMPRII, ACTRIIA et ACTRIIB, et trois récepteurs de type I, BMPRIa, BMPRIb et ACTRIa ont été identifiés. La phosphorylation du BMPRI par le BMPRII déclenche la cascade de phosphorylation des effecteurs Smad 1,5 et 8 (small mothers against decapentaplegic homolog) et la formation d'un complexe avec Smad4 qui se relocalise dans le noyau et agit comme facteur de transcription sur des gènes cibles. Récemment, plusieurs voies indépendantes des protéines Smad,

nommées voies non canoniques, ont été impliquées dans la signalisation des BMP et font par exemple intervenir les MAPK (mitogen activated protein kinases).

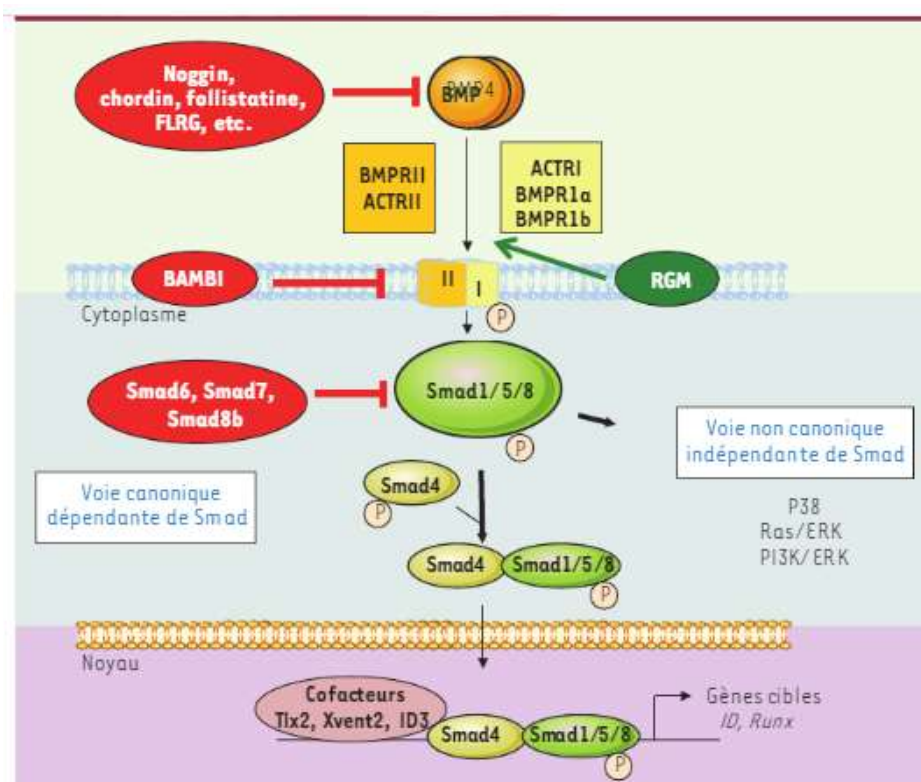


Figure 31 : Voie de signalisation des BMP (d'après Sagorny et al., 2012).

Dans la voie dite canonique faisant intervenir les Smad, les BMP forment des dimères qui interagissent avec des tétramères de récepteurs membranaires de type sérine thréonine kinase (deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II). Après phosphorylation des récepteurs de type II, le signal est transmis à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire des protéines Smad1, 5 et 8, phosphorylées à leur tour, et qui s'associent ensuite à Smad4 pour rejoindre le noyau et permettre la transcription de gènes cibles tels que les familles de gènes Id et Runx. Cette voie de signalisation est finement régulée, et ceci de manière complexe par des protéines extracellulaires (noggin, chordin ou follistatine), membranaires (BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor), RGM (repulsive guidance molecule)) ou intracellulaires (Smad6, Smad7 et Smad8b). En plus de cette voie de signalisation classique, les effets des BMP peuvent être relayés par des voies non canoniques, indépendantes des Smad et faisant notamment intervenir les MAP kinases.

Parmi les BMP, BMP4 est conservée chez les vertébrés et a un rôle important dans le développement du SNC pendant l'embryogenèse, à l'âge adulte et après un dommage cérébral. Par son activité, BMP4 active l'expression de gènes cibles impliqués dans la régulation de différents processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Bond et al., 2012). Ainsi, pendant le développement embryonnaire BMP4 induit la neurogenèse alors qu'en période postnatale il favorise la production d'astrocytes (Colak et al., 2008 ; Cole et al., 2016).

Au sein de la V-SVZ, les BMP régulent la niche neurogénique. En effet, elles favorisent la différenciation astrogliale des cellules B1 au détriment de la neurogenèse et de l'oligodendrogenèse (Gross et al., 1996). Les épendymocytes sécrètent Noggin, un antagoniste des BMP qui les fixe et empêche

ainsi l'activation des récepteurs aux BMP (Figure 32). Par ce mécanisme, Noggin induit la prolifération et la neurogenèse en créant un environnement neurogénique pour la V-SVZ (Lim et *al.*, 2000). Les cellules épendymales sécrètent également LRP2, un récepteur séquestrant BMP4. Il a été démontré chez des souris déficientes en LRP2, une augmentation de la signalisation BMP dans la V-SBZ et un défaut de neurogenèse (Gajera et *al.*, 2012). Le gradient BMP régulé par Noggin et LRP2 contrôle ainsi la neurogenèse et la gliogenèse. L'induction de la différenciation des cellules B1 en astrocytes par les BMP se fait par l'activation de la protéine SMAD1 et l'association avec des facteurs de transcription cytosoliques STATS.

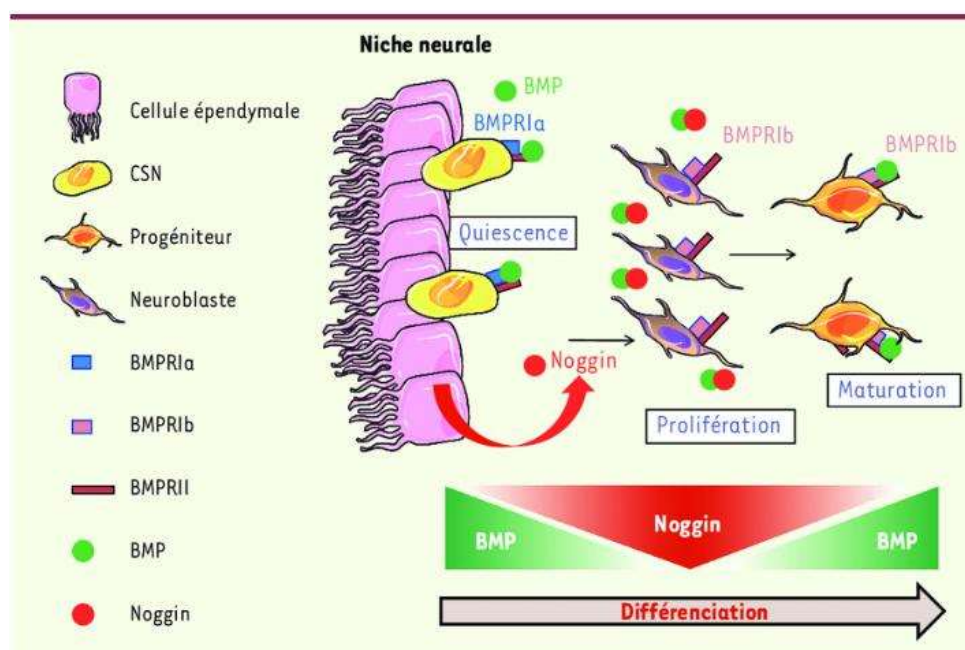


Figure 32 : Dualité fonctionnelle des BMP dans le système neural en cours de développement (d'après Sagorny et al., 2012).

Dans le système neural, les BMP régulent la quiescence des NSCs via le récepteur BMP de type Ia (BMPRIa), mais induisent la différenciation et la maturation des neurones via le récepteur BMP de type Ib (BMPRIb) exprimé par les progéniteurs et les neuroblastes. Ces effets complexes sur la différenciation neurale sont régulés spatialement par les cellules épendymales de la niche qui sécrètent l'inhibiteur Noggin, créant ainsi un gradient de signalisation BMP. L'inhibition des signaux BMP va permettre aux NSCs de quitter le stade quiescent pour proliférer puis se différencier. Enfin, lorsque les cellules en cours de différenciation migrent à la périphérie de la niche, la concentration en Noggin diminue et le signal BMP redevient alors actif, permettant la maturation des neurones.

1.3.6. Les neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs tels que le GABA et le glutamate, ainsi que les neuromodulateurs tels que la dopamine (DA) et la sérotonine (5-HT) influencent la prolifération et la neurogenèse de la V-SVZ et de la SGZ.

Dans la V-SVZ et le RMS, les cellules A sécrètent un GABA non synaptique. Ce dernier se fixe sur les récepteurs GABA_A des cellules B1 et inhibe ainsi leur prolifération. En retour, les cellules B1 et C

expriment le DBI (Diazepam Binding Inhibitor) dont le rôle est de réguler l'activité du GABA. Les cellules A expriment des récepteurs mGluRs, des récepteurs AMPA et des récepteurs kainate régulant leur prolifération, leur survie et leur migration (Figure 33)(Brazel et *al.*, 2005 ; Platel et *al.*, 2007).

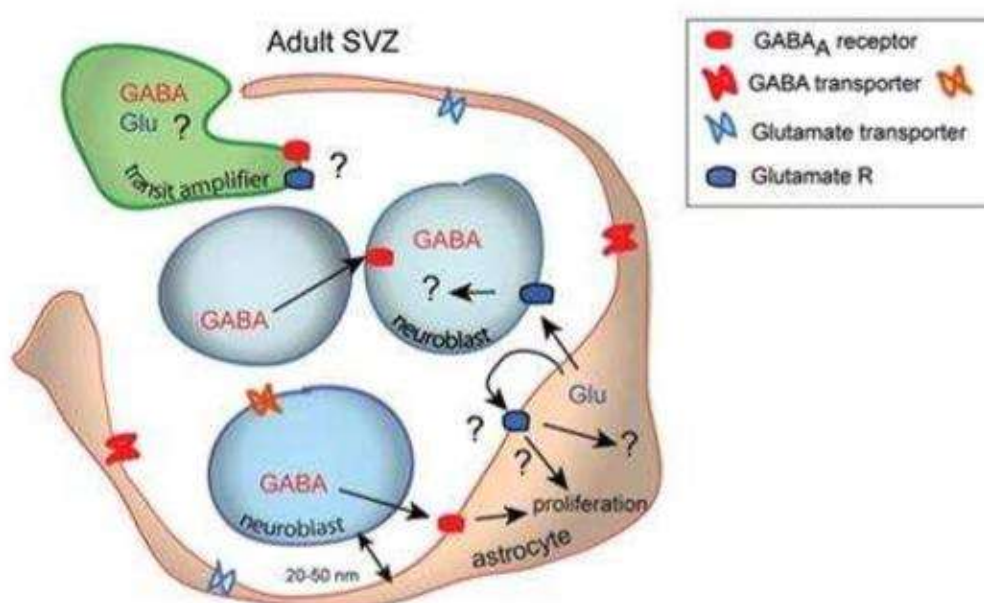


Figure 33 : Contrôle homéostatique de la production des neuroblastes par le GABA et le glutamate (d'après Platel et *al.*, 2007).

Les neuroblastes expriment les récepteurs GABA_A, les récepteurs NMDR et les récepteurs AMPA dans la SVZ et le RMS. Les neuroblastes libèrent le GABA qui active les récepteurs GABA_A sur les astrocytes environnants. A leur tour, les astrocytes qui entourent les neuroblastes libèrent du glutamate capable d'activer les récepteurs NMDA et les récepteurs AMPA sur les neuroblastes migrants. Les récepteurs mGluRs sont exprimés dans la SVZ mais l'identité des cellules portant ces récepteurs est inconnue. L'activation des récepteurs GABA_A par le GABA ambiant entraîne une diminution du nombre d'astrocytes et de neuroblastes prolifératifs alors que les récepteurs mGluRs activés par le glutamate ambiant induisent une augmentation du nombre des cellules prolifératives dans la SVZ. Les récepteurs glutamatergiques jouent un rôle dans la survie et le contrôle de la migration mais également dans la régulation de la prolifération tandis que les récepteurs au GABA modulent la production des neuroblastes.

La DA est une catécholamine synthétisée par les neurones de la substance noire, de l'aire tegmentale ventrale et de l'hypothalamus. Les cellules C possèdent des récepteurs à la DA, les récepteurs D1-like, retrouvés dans le cytoplasme et les cellules A des récepteurs D2-like au niveau de la membrane plasmique. La DA contrôle la prolifération des cellules de la SVZ et la neurogenèse (Höglinger et *al.*, 2004).

La 5-HT est une mono-amine synthétisée par les neurones du raphé. Elle joue un rôle en augmentant la fréquence de battement des cils des cellules E1 (Ohata et Alvarez-Buylla, 2016). De plus, les axones 5-HT interagissent directement avec les NSCs pour réguler la neurogenèse par les récepteurs 5HT_{2C} (Tong et *al.*, 2014).

1.3.7. Les facteurs neurotrophiques et les facteurs de croissance

La neurogenèse est également régulée par des facteurs neurotrophiques et des facteurs de croissance.

Les facteurs de croissance sont des protéines extracellulaires favorisant la croissance cellulaire et le maintien de différents processus biologiques. Leurs effets sont médiés par l'activation de différentes voies de signalisation telles que PI3K/Akt et Ras/MAPK (Katz et *al.*, 2007 ; Nieto-Estévez et *al.*, 2016). La protéine PI3K phosphoryle la protéine Akt grâce à la protéine PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase). Une fois phosphorylée, Akt induit la translocation des transporteurs du glucose vers la membrane plasmique ou cible la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin). La protéine mTOR1 active la protéine p70S6K régulant la synthèse protéique, alors que la protéine mTOR2 active une série de kinases incluant la protéine Akt affectant la prolifération, la migration et la localisation cellulaire. D'autre part, Akt permet l'activation des facteurs de transcription FOXOs (fork head transcription factor) régulant la prolifération cellulaire, le stress oxydatif et l'apoptose. Akt permet aussi l'activation de la protéine CREB régulant des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la survie et la différenciation.

Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans le contrôle de la neurogenèse dans la V-SVZ : IGF-1 (insulin-like growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor et PDGF (Platelet-derived growth factor). L'intégralité de ces facteurs partage une transduction du signal impliquant leur fixation sur des récepteur Trks (tyrosine kinase). Lors de la fixation du ligand sur le récepteur, un phénomène d'autophosphorylation permet l'activation du domaine intracellulaire du récepteur puis l'activation des voies de signalisation intracellulaire Pi3K/Akt et Ras/MAPK. (Faigle et Song, 2013) Le facteur IGF-1 est impliqué dans la prolifération et la différenciation des neurones et de la glie mais également dans la maturation neuronale. (Zhang et *al.*, 2014) FGF-2 et EGF sont les principaux mitogènes retrouvés *in vivo* et utilisés pour la prolifération *in vitro* des NSCs de la V-SVZ. Les cellules C et quelques cellules B1 expriment des récepteurs à l'EGF et au FGF. FGF-2 maintient l'auto-renouvellement des NSCs de la V-SVZ. L'EGF confère aux cellules C une multipotence leur permettant de donner des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes *in vitro* (Doetsch et *al.*, 2002). Le PDGF augmente la prolifération des cellules de la V-SVZ et principalement des OPC (Tong et Alvarez-Buylla, 2014)

Les facteurs neurotrophiques sont des protéines extracellulaires. Au niveau de la V-SVZ, le facteur principal est le BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Celui-ci se fixe sur le récepteur TrkB induisant une dimérisation du récepteur et une autophosphorylation conduisant au recrutement des différents effecteurs et à l'activation des cascades de signalisation (Faigle et Song, 2013). Il existe deux formes de BDNF : le pro-BDNF et le BDNF mature. Chacune de ces formes joue des rôles différents dans le développement neuronal. La forme pro-BDNF a une action sur la mort cellulaire et conduit à une diminution de l'efficacité de la transmission des synapses (Lu et *al.*, 2005). La forme mature a un effet positif sur la différenciation neuronale, la survie cellulaire et la potentialisation à long-terme. Dans la V-SVZ postnatale, les effets sur la neurogenèse sont attribués à la forme mature du BDNF (Bath et Lee, 2012).

Enfin, la signalisation Eph-éphrine joue un rôle important dans le contrôle de la neurogenèse embryonnaire et adulte. Dans la V-SVZ et la SGZ, cette voie contrôle la neurogenèse en influençant la prolifération et la différenciation des progéniteurs intermédiaires. Les cellules C et A expriment des récepteurs éphrine A2 tandis que les cellules B1 et E expriment des récepteurs EphA7. L'association EphA7-éphrineA2 régule de façon négative la prolifération des progéniteurs neuronaux (Holmberg, 2005). Cette voie de signalisation est également impliquée dans la migration des neuroblastes dans les V-SVZ adultes et la régulation directe ou indirecte de la prolifération cellulaire (Conover et *al.*, 2000).

2. Les troubles et modulations physiopathologiques de la neurogenèse

2.1. Lors de la neurogenèse développementale

Le développement du cortex cérébral nécessite des processus séquentiels complexes qui doivent être orchestrés avec précision. La localisation et la prolifération des progéniteurs neuronaux puis la migration des neurones définissent l'identité, le positionnement laminaire et la connectivité spécifique de chaque neurone. Des modifications à n'importe quelle étape de cette série d'événements, en raison de mutations génétiques ou de facteurs environnementaux, conduisent à des pathologies cérébrales appelées malformations du développement cortical (MCD). Ces dernières sont maintenant reconnues comme parmi les principales causes d'épilepsie pharmaco-résistante et d'invalidité intellectuelle.

2.1.1. Défauts de prolifération des progéniteurs

2.1.1.1. Prolifération excessive

Intuitivement, une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux devrait modifier la taille du cerveau car elle a un impact direct sur le nombre de neurones post-mitotiques qui seront générés. Des exemples classiques de ce type de défaut sont la mégalencéphalie et l'hémi-mégalencéphalie, dans lesquelles la taille du cerveau est macroscopiquement plus grande que la normale et ce de manière symétrique ou asymétrique. Cela s'accompagne généralement d'un retard de développement important, d'une déficience intellectuelle et d'une épilepsie infantile résistante aux médicaments. Des aberrations plus localisées de la prolifération des progéniteurs ont été supposées être également à la base de la dysplasie corticale focale de type II, caractérisée par des malformations localisées du cortex, des défauts de stratification et des neurones dysmorphiques, accompagnées à nouveau d'épilepsie infantile résistante aux médicaments (Guerrini et Dobyns, 2014).

Pour toutes ces pathologies, les études génétiques ont conduit à l'identification de plusieurs mutations germinales et somatiques cérébrales qui convergent sur la voie mTOR. En effet, des mutations ont été trouvées dans mTOR lui-même et dans ses régulateurs en amont, notamment PIK3CA, PIK3R2, AKT1, AKT3, TSC1, TSC2, NPRL2, DEPDC5 et STRADA, conduisant toujours à une hyperactivation de la kinase mTOR (Orlova et *al.*, 2010 ; D'Gama et *al.*, 2017 ; Ribierre et *al.*, 2018). mTOR est un régulateur crucial de la croissance et de la prolifération cellulaire, car il contrôle la synthèse des protéines, la dégradation des protéines, le métabolisme des lipides et la dynamique du cytosquelette en fonction des stimuli extracellulaires (Ryskalin et *al.*, 2017).

Des preuves de plus en plus nombreuses indiquent que les mutations somatiques peuvent affecter différemment le développement du cerveau en fonction du moment et du type de cellule dans

lesquels elles se produisent. Ceci signifie que les mutations antérieures affecteront un nombre plus élevé de cellules progénitrices par rapport aux cellules ultérieures, provoquant ainsi une aggravation de phénotype. Il a été récemment suggéré que l'étendue du « mosaïcisme » somatique des mutations liées à mTOR (c'est-à-dire le nombre de cellules positives pour une mutation somatique dans un échantillon de cerveau, tel qu'évalué par séquençage unicellulaire) est directement corrélé à la gravité de la maladie associée (D'Gama *et al.*, 2017).

2.1.1.2. Réduction de la prolifération

La prolifération réduite des cellules progénitrices neuronales est à la base de la microcéphalie primaire, dans laquelle les patients souffrent d'une déficience intellectuelle et d'une diminution substantielle de la taille du cerveau, même si la structure du cerveau et la stratification corticale sont généralement préservées. La microcéphalie primaire est considérée comme un trouble de la mitose neurogène.

Plusieurs mutations germinales ont été identifiées dans des gènes dont le produit protéique est directement impliqué dans la maturation des centrosomes et la formation du fuseau mitotique, tels que CDK5RAP2, ASPM, CENPJ, STIL, CEP135, CEP152, CEP63, NDE1, CDK6, WDR62 (Alkuraya *et al.*, 2011 ; Sir *et al.*, 2011 ; Hussain *et al.*, 2012 ; Hussain *et al.*, 2013 ; Farag *et al.*, 2013). Toutes ces protéines sont fortement exprimées dans les progéniteurs neuronaux prolifératifs de la VZ et de la SVZ au cours du développement cérébral. Leur perte de fonction entraîne divers défauts cellulaires en lien avec la fonction exacte qu'ils exercent. Dans certains cas, des centrosomes extra-numéraires sont produits, entraînant des fuseaux mitotiques multipolaires, une ségrégation chromosomique aberrante, une aneuploïdie aléatoire, un arrêt mitotique et la mort des cellules progénitrices neuronales (McLntyre *et al.*, 2012 ; Marthiens *et al.*, 2013). Dans d'autres, l'aberration de l'orientation du fuseau mitotique par rapport au plan neuro-épithélial conduit à un changement prématuré symétrique à asymétrique dans la division cellulaire, provoquant ainsi une expansion réduite du pool de progéniteurs et une réduction conséquente de la production de neurones post-mitotiques (Fish *et al.*, 2006).

2.1.1.3. Localisation hétérotopique des cellules progénitrices

Un autre type de défaut pouvant affecter la phase neurogène du développement cortical a été mis en évidence par l'identification de mutations dans le gène EML1 chez les patients présentant une hétérotopie sous-corticale, c'est-à-dire des groupes hétérotopiques de neurones situés à l'extérieur de la plaque corticale, généralement dans la substance blanche sous-corticale (Kielar *et al.*, 2014).

EML1 est une protéine associée aux microtubules exprimée dans les cellules progénitrices de la VZ pendant le développement cortical, ainsi que dans les neurones post-mitotiques de la plaque corticale. Sa perte de fonction conduit à un mauvais placement des cellules progénitrices en dehors de la VZ et de la SVZ dans la zone intermédiaire et la plaque corticale, où la prolifération est normalement absente. Cela provoque la production de neurones hétérotopiques et la création d'une barrière physique pour les neurones normalement migrateurs produits à partir de progéniteurs non hétérotopiques dans la VZ et la SVZ, conduisant à la formation d'une hétérotopie étendue.

Le mécanisme exact par lequel les progéniteurs hétérotopiques sont produits lors de la perte de fonction d'EML1 n'est pas clair, mais peut être lié à une régulation modifiée par microtubules de la fixation apicale-basale des cellules gliales radiales.

2.1.2. Défauts de migration neuronales

2.1.2.1. Altérations de l'échafaudage de la glie radiale

En plus de leur rôle de progéniteurs neurogènes, les cellules gliales radiales soutiennent et guident également la migration des neurones post-mitotiques de la VZ et de la SVZ vers la plaque corticale. En tant que telle, la rupture de l'échafaudage de la glie radiale conduit facilement à des défauts de migration neuronale autonome non cellulaire. Cela a été décrit pour l'hétérotopie nodulaire périventriculaire liée à l'X (HNP) causée par des mutations de perte de fonction dans le gène filamin A (FLNA).

Les patients atteints d'HNP présentent des nodules bilatéraux de neurones hétérotopiques faisant saillie dans les ventricules latéraux, sous un cortex cérébral apparemment normal. Les hommes hémizygotes ont une létalité prénatale élevée, tandis que les femmes hétérozygotes présentent des crises à début variable et des anomalies cardiovasculaires (Nakamura et *al.*, 2011).

FLNA est une protéine pléiotrope impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine : elle lie et réticule les filaments d'actine dans les réseaux orthogonaux, elle régule les molécules de signalisation impliquées dans l'adhésion et la migration des cellules et elle module l'activation des petites GTPases impliquées dans le remodelage de l'actine.

La protéine est fortement exprimée dans le cortex en développement, en particulier dans les cellules gliales radiales, mais persiste également dans le cerveau adulte dans les neurones post-mitotiques. L'électroporation *in utero* de courts ARN interférents contre FLNA dans des embryons de rat a montré que la déplétion de FLNA entraîne un retard significatif de la migration neuronale radiale et la formation de nodules hétérotopiques tapissant la surface ventriculaire, comme observé chez les patients atteints d'HNP. Ceci est associé à une perturbation du neuro-épithélium ventriculaire avec des cellules gliales radiales se détachant de la surface ventriculaire.

2.1.2.2. Altérations cellulaire autonome de la migration neuronale

Des exemples classiques de troubles causés par des défauts intrinsèques de la migration neuronale sont la lissencéphalie et l'hétérotopie des bandes sous-corticales. La lissencéphalie est caractérisée par un cortex lisse avec une épaisseur accrue et la production de seulement 2 à 4 couches corticales. L'hétérotopie des bandes sous-corticales ou double cortex se caractérise par la présence d'une bande de matière grise entre un cortex pachygyral à 6 couches et la paroi ventriculaire. Ces deux pathologies sont généralement associées à une épilepsie pharmaco-résistante survenant dans l'enfance, à des retards psychomoteurs sévère à profonds et à des déficits cognitifs.

La cause génétique la plus courante de ces maladies est représentée par les mutations germinales et hétérozygotes somatiques dans les gènes codants pour les protéines LIS1 et DCX (Matsumoto et *al.*,

2001 ; Haverfield et *al.*, 2009). Ces deux gènes sont impliqués dans la modulation du cytosquelette des microtubules des neurones en migration. LIS1 interagit avec la dynéine qui est la protéine constituant les bras latéraux des doublets de microtubules et avec des protéines accessoires telles que la dynactine, régulant ainsi de manière complexe l'activité de transport rétrograde des substances dans la cellule. Ce fait est d'une grande importance dans l'axone neuronal et dans le mouvement des cils et des flagelles dans les axonèmes (Baumbach et *al.*, 2017). La protéine DCX se lie aux microtubules et régule leur stabilité et leur dynamique en intégrant différentes voies de signalisation dans les cellules en migration (Horest et *al.*, 1999 ; Schaar et *al.*, 2004). Les deux protéines interagissent physiquement, ce qui suggère qu'elles se croisent dans la régulation de la fonction des microtubules (Caspi et *al.*, 2000).

La régulation négative *in utero* de l'une ou de l'autre protéine dans les embryons de rat entraîne une migration défectueuse des neurones de la VZ vers la plaque corticale, avec une accumulation anormale de neurones multipolaires dans la SVZ (Bai et *al.*, 2003 ; Tsai et *al.*, 2005). Dans le cas de la régulation négative de DCX, la formation de bandes hétérotopiques sous-corticales a également été observée chez les rats postnatals, probablement en raison de la migration neuronale bloquée dans la zone intermédiaire.

Des mutations supplémentaires dans le spectre lissencéphalique ont été identifiées dans les gènes codant pour les sous-unités de la tubuline (TUBA1A, TUBB2B, TUBG1) et les protéines motrices (KIF2A, KIF5C, DYNC1H1) (Parrini et *al.*, 2016).

2.1.2.3. *Formation défectueuse de la membrane basale entraînant une migration excessive*

La dystroglycane est une protéine initialement identifiée dans le muscle squelettique comme un composant central du complexe dystrophine-glycoprotéine. Ce complexe protéique transmembranaire relie la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Il est fortement exprimé dans de nombreux tissus, y compris le cerveau, où il est nécessaire pour la bonne organisation des membranes basales. La dystroglycane est composée de deux sous-unités, la protéine extracellulaire α -dystroglycane étroitement associée au β -dystroglycane transmembranaire. La sous-unité α est impliquée dans l'interaction des ligands extracellulaires, tels que la laminine, de manière dépendante à la glycosylation. La sous-unité β interagit avec les molécules du cytosquelette et de signalisation.

Dans des syndromes sévères avec dystrophie musculaire, atteinte oculaire et malformations cérébrales, comme le syndrome de Walker-Warburg, plusieurs mutations récessives de perte de fonction ont été identifiées dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycosylation de l' α -dystroglycane (ISPD, POMT1, POMT2, POMGNT1, LARGE1, FKTN, FKRB). (Willer et *al.*, 2012) La cause des anomalies musculaires, oculaires et cérébrales réside dans la formation défectueuse de la membrane basale dans ces tissus, en raison d'une interaction réduite du dystroglycane avec les protéines de la matrice extracellulaire. Dans le cerveau, en particulier, le dystroglycane exprimé dans les « pieds » des cellules gliales radiales entre en contact avec la membrane basale. Cette interaction est nécessaire pour maintenir l'intégrité de la membrane basale et pour former la glie limitante qui définit la surface du cerveau. (Myshrall et *al.*, 2012)

Une perturbation de cette interaction, c'est-à-dire lors de la suppression d'une α -dystroglycane ou en raison de sa glycosylation défectueuse, conduit à une altération de l'ancrage basal glial radial et à la formation de brèches dans la surface basale, provoquant ainsi une superposition neuronale aberrante et une lissencéphalie. (Hu et *al.*, 2007 ; Ackroyd et *al.*, 2011)

2.1.2.4. *Impact des défauts de développement sur la maturation neuronale et la connectivité*

Les modifications de la neurogenèse et du développement neuronal conduisent à un spectre de troubles allant des malformations macroscopiques et des altérations plus ou moins sévères de la stratification corticale, à des retards très subtils dans le timing de la migration neuronale. La finalité de ces événements conduit à une altération du « câblage » neuronal. En effet, l'établissement de circuits neuronaux appropriés nécessite une régulation précise du positionnement neuronal, de la dendritogenèse, de l'axogenèse et de la connectivité synaptique d'entrée/sortie dans l'espace et le temps.

Les récentes études fonctionnelles dans des modèles de maladies à degrés variables de malformation corticale démontrent des anomalies de croissance des neurites et de la formation des synapses, sur la transmission synaptique et la connectivité à longue portée. Le mise en silence *in utero* de DCX dans des embryons de rat a révélé que les neurones hétérotopiques empilés dans la substance blanche ventriculaire sont fonctionnellement connectés à d'autres régions du cerveau, mais présentent des caractéristiques de neurones immatures à des stades postnatals, un développement dendritique altéré et une formation altérée des synapses glutamatergique et γ -aminobutyrique (Martineau et *al.*, 2018).

L'ablation conditionnelle de FLNA dans une cohorte de neurones de projection corticale chez la souris entraîne une croissance dendritique excessive, avec pour conséquence une désorganisation des contacts synaptiques et des altérations de l'activité synaptique dans le cortex postnatal.

Concernant la connectivité à longue portée, une mutation faux-sens dans TUBB2B a été identifiée dans une famille affectée par la fibrose congénitale des muscles oculo-moteurs (CFEOM) et la polymicrogyrie. Cette mutation a conduit à une réduction des projections callosales homotopiques. L'électroporation *in utero* du mutant TUBB2B dans les embryons de souris reproduit le phénotype humain. Elle se caractérise par une connectivité homotopique diminuée dans le corps calleux et une innervation perturbée des cibles locales et à longue distance chez les animaux postnatals (Cederquist et *al.*, 2012).

2.2. Lors de la neurogenèse adulte

2.2.1. *Stimulation par l'enrichissement, l'exercice ou la gestation*

De plus en plus de preuves accordent à la neurogenèse adulte des fonctions cérébrales spécifiques, telles que l'apprentissage des odeurs pour la neurogenèse dans la SVZ, et la formation de la mémoire spatiale ainsi que les effets comportementaux des traitements antidépresseurs pour la neurogenèse dans la SGZ de l'hippocampe (Kempermann et *al.*, 2004, Zhang et *al.*, 2008). De nombreux

facteurs environnementaux, ainsi que la stimulation des activités neuronales ont une influence sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte.

Les conditions de vie des animaux en laboratoire sont plutôt sommaires et il a été montré que la neurogenèse pouvait être stimulée lorsque l'on enrichissait l'environnement des souris. L'enrichissement de l'environnement consiste à placer les animaux dans des cages plus grandes, dans de plus grands groupes, favorisant ainsi les interactions sociales entre les animaux. Si la multiplication des cellules souches et des progéniteurs nerveux de la SVZ n'est pas stimulée, la survie des nouveaux neurones dans le bulbe olfactif est nettement diminuée (Rocheffort et *al.*, 2002).

Chez les rongeurs, les capacités olfactives semblent corrélées avec l'intensité de la neurogenèse dans la SVZ. Si les capacités olfactives des animaux sont peu exploitées, alors la survie des neurones dans le bulbe olfactif est fortement réduite (Corotto et *al.*, 1994).

Par ailleurs, des études ont montré que l'exercice physique augmentait la multiplication et la différenciation des NSCs et progéniteurs nerveux dans l'hippocampe. L'accroissement du nombre de neurones produits à la suite de l'exercice pourrait résulter d'une élévation du taux de sérotonine ou de facteurs neurotrophiques qui stimuleraient la survie des neurones nouvellement formés. Les neurones ainsi générés s'intègrent dans l'hippocampe et améliorent les capacités de mémorisation des souris, évaluées grâce à des tests comportementaux (van Praag et *al.*, 2000).

Chez la souris, l'augmentation des taux d'œstrogènes circulants pendant la gestation stimule la production de neurones au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (Tanapat et *al.*, 1999). Par ailleurs, il a été montré que la synthèse de prolactine chez les souris, au cours de la gestation et post partum, augmente la neurogenèse dans la SVZ ainsi que la production de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif (Shingo et *al.*, 2003).

2.2.2. Reprise de la neurogenèse après un accident vasculaire cérébral ischémique

L'accident vasculaire cérébral ischémique, ou infarctus cérébral, est lié à l'occlusion d'une artère cérébrale ayant pour conséquence de priver de sang une partie du cerveau. Les tissus en aval ne reçoivent alors plus d'oxygène, de glucose ou d'autres métabolites nécessaires à leur fonctionnement, entraînant la mort des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes dans la région ischémisée (Dirnagl et *al.*, 1999).

La stimulation des NSCs endogènes peut permettre le remplacement neuronal des zones ischémisées. En utilisant la technique d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez les rongeurs adultes, on observe une stimulation de la prolifération cellulaire et la neurogenèse dans la SVZ et la SGZ (Zhang et *al.*, 2001 ; Arvidsson et *al.*, 2002). Ainsi, une augmentation de la prolifération cellulaire est observée dans les deux zones neurogéniques à partir du 2^{ème} jour, pour atteindre son maximum entre 1 et 2 semaines, et finalement revenir à son niveau basal après 3 à 5 semaines. Les neuroblastes issus de la SVZ peuvent remplacer les neurones endommagés après lésion cérébrale dans l'hippocampe, le striatum, le néocortex et d'autres régions endommagées du système nerveux central (Jin et *al.*, 2003 ; Kuge et *al.*, 2009).

Cependant, le nombre de neurones produits par les NSCs endogènes est très faible (environ 0,2% des cellules striatales perdues), et la survie des nouveaux neurones dans les régions ischémisées est limitée (Arvidsson et *al.*, 2002).

2.2.3. Vieillessement des niches neurogéniques

Une diminution des capacités attentionnelles et de la vitesse de traitement de l'information, ainsi qu'une baisse de la mémoire et de la mobilité sont observées chez les personnes âgées (Moffat et *al.*, 2001 ; Toner et *al.*, 2009). Le vieillissement est également un facteur de risque associé à plusieurs maladies neurodégénératives se caractérisant par une forte mort neuronale et un déséquilibre de la neurogenèse au niveau des niches neurogéniques (Curtis et *al.*, 2005 ; Ziabreva et *al.*, 2006). Le tissu cérébral des personnes âgées (60-87 ans) garde toutefois la capacité de se régénérer à la suite d'une lésion, par exemple un infarctus cérébral (Macas et *al.*, 2006).

Bien que la neurogenèse persiste à l'âge adulte au bord des ventricules latéraux et dans le gyrus denté de l'hippocampe, elle décline fortement avec le vieillissement en conditions physiologiques, impactant le renouvellement des neurones et les capacités de régénération des zones neurogéniques, entraînant une altération progressive des capacités cognitives et motrices. Ainsi, on remarque par exemple la détérioration de la capacité à discriminer deux odeurs très proches ainsi que la moins bonne mémoire et navigation spatiale chez les souris âgées (Enwere et *al.*, 2004 ; Ming et Song, 2011).

La production de nouveaux neurones diminue dans le bulbe olfactif et la SGZ avec l'âge (Bouab et *al.*, 2011). Ce déclin de la neurogenèse est directement lié à une forte baisse du potentiel prolifératif (Tanaka et *al.*, 2007 ; Ben Abdallah et *al.*, 2010). Ceci est essentiellement due à la diminution du nombre de NSCs et de progéniteurs neuronaux (Ahlenius et *al.*, 2009 ; Bouab et *al.*, 2011). Bien que des résultats contradictoires aient été rapportés, les études les plus récentes s'accordent sur le fait que la diminution de la neurogenèse de la SGZ et de la SVZ murine au cours du vieillissement proviendrait, non pas d'un épuisement du stock de cellules souches, mais essentiellement d'une altération de leur prolifération entre autres liée à une altération du micro-environnement de la niche (Pineda et *al.*, 2013 ; Piccin et *al.*, 2014). Par ailleurs, il semble que la capacité intrinsèque de prolifération et de différenciation des progéniteurs neuronaux ne soit pas altérée puisqu'ils conservent leur capacité à proliférer *ex vivo*, du moins jusqu'à l'âge moyen, et qu'ils continuent à générer des neurones matures similairement au jeune adulte (Ahlenius et *al.*, 2009).

Avec le vieillissement, l'organisation structurale des niches neurogéniques change irrémédiablement. Au niveau de la SVZ, les ventricules latéraux se referment progressivement dans les parties ventrale et médiane, restreignant la région neurogénique à la région dorso-latérale du ventricule. On y observe une diminution uniforme du nombre de structures en rosace au contact du ventricule (Shook et *al.*, 2012). L'épendyme subit également des changements structuraux avec l'apparition d'astrocytes s'intercalant entre les cellules épendymaires et une accumulation de gouttelettes lipidiques qui suggèrent des changements dans le métabolisme de la niche (Luo et *al.*, 2008 ; Capilla-Gonzalez et *al.*, 2014). Enfin, une analyse fine de la structure de la SVZ par microscopie électronique chez des souris âgées de 2 mois à 22 mois a montré son affinement progressif, en accord avec la diminution du nombre de progéniteurs neuronaux (Figure 34).

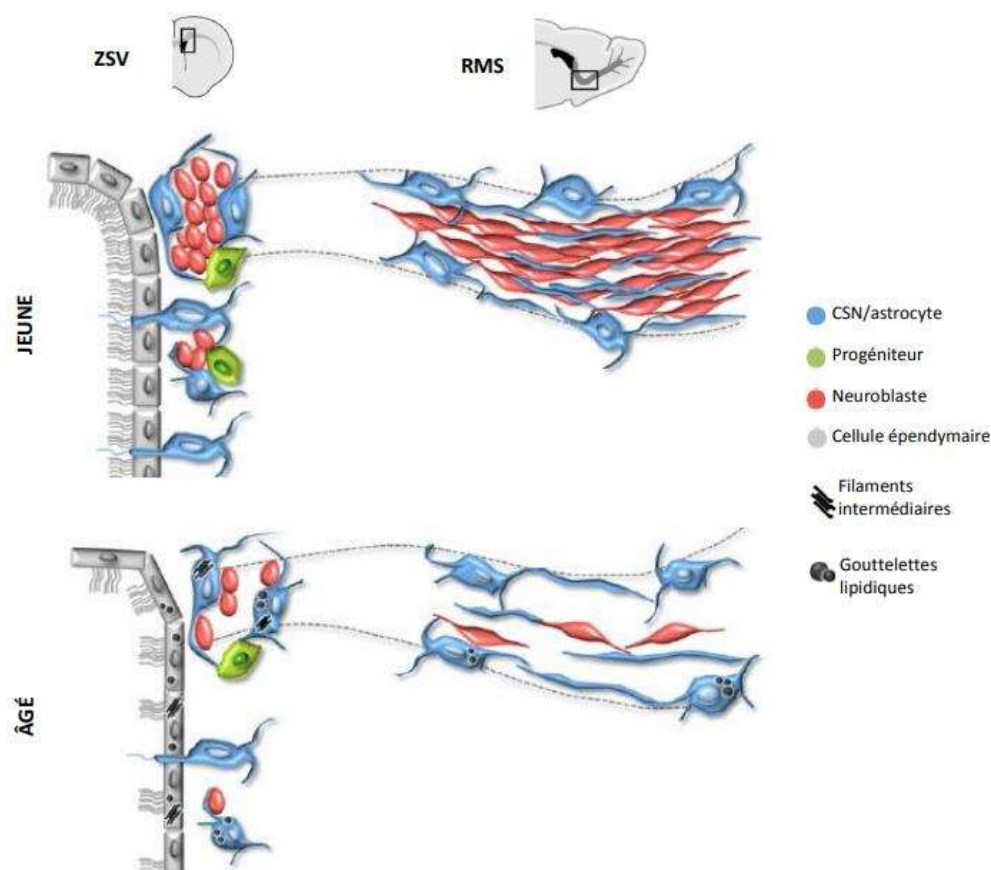


Figure 34 : Représentation du vieillissement de la SVZ murine (d'après Capilla-Gonzalez et al., 2015).

2.3. Effets connus des rayonnements ionisants sur la neurogenèse

2.3.1. Irradiation du SNC

Les rayonnements ionisants sont des rayonnements électromagnétiques ou corpusculaires capables de produire une ionisation, c'est-à-dire capables d'arracher un électron à une molécule, lors de son passage à travers la matière. La dose absorbée correspond à la quantité d'énergie moyenne délivrée par le rayonnement traversant la matière. Cette quantité d'énergie est exprimée en Gray (Gy). Chez l'Homme, la radiothérapie est l'un des traitements principaux des tumeurs cérébrales et des cancers « tête et cou ». Elle consiste à cibler les masses tumorales à l'aide de radiations ionisantes afin de les détruire. Des altérations structurelles et fonctionnelles sévères apparaissent pour des traitements à forte dose (>60 Gy) (Tofilon et Fike, 2000). Des doses plus faibles (18-24Gy) peuvent créer des troubles cognitifs, mais ne semblent pas entraîner d'altérations majeures de la morphologie cellulaire (Roman et Sperduto, 1995). Afin de limiter ces effets secondaires, la radiothérapie est le plus souvent délivrée par doses fractionnées inférieures ou égales à 2 Gy.

2.3.1.1. Les effets cellulaires des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants induisent des altérations structurales de l'ensemble des constituants cellulaires. En effet, ils peuvent ainsi modifier les bases de l'ADN, induire des cassures de l'ADN, et endommager les protéines et les lipides. Les rayonnements ionisants induisent la radiolyse de l'eau

généralisant des Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs ; H_2 , H_2O_2 et les radicaux libres OH et H_2O) et provoquant par conséquent un stress oxydant. De plus, ces éléments peuvent interagir avec les composants biologiques, entraînant leur modification chimique. Ainsi, les lipides peuvent être peroxydés, les protéines oxydées et l'ADN endommagé.

Au niveau cellulaire, les rayonnements ionisants ont deux conséquences majeures : un arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation de l'ADN ou l'induction de l'apoptose lorsque les cassures de l'ADN ou les altérations des macromolécules sont trop importantes pour être réparées. L'induction de l'apoptose passe par l'activation de la protéine p53. Dans de nombreux types cellulaires, l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire induit par les radiations ionisantes dépend de p53, qui trans-active l'expression du gène codant pour p21waf, une protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire (el-Deiry et *al.*, 1993).

2.3.1.2. *Les effets de l'irradiation sur la SVZ et la SGZ*

Les dommages dus aux traitements de radiothérapie peuvent venir d'une sensibilité des progéniteurs nerveux, qui limiterait la capacité de régénération de la SVZ (Tofilon et Fike, 2000). De même, les cellules de la SGZ sont particulièrement sensibles à l'irradiation, entrant en apoptose dès 0,4 Gy (Nagai et *al.*, 2000).

Chez les rongeurs, le pic d'apoptose se situe entre 6 et 12h après exposition de la tête aux radiations et l'apoptose est quasiment terminée 24h après exposition (Mizumatsu et *al.*, 2003). Après une dose de rayons X de 2 Gy sur le cerveau de rats adultes, on observe une diminution rapide des mitoses le long de la SVZ mais l'index mitotique est rétabli après 1 mois. Après 12 mois les SVZ des animaux irradiés semblent identiques aux SVZ des animaux non irradiés. En revanche, les animaux irradiés à 40 Gy présentent une très faible régénération des cellules de la SVZ (Cavanagh et Hopewell, 1972). Ces résultats suggèrent que la réponse à l'irradiation dans les zones neurogéniques du cerveau adulte est dépendante de la dose administrée.

Il a été remarqué en irradiant des cerveaux de jeunes rats adultes avec des doses variant de 2 à 15 Gy, que l'irradiation atteignait tous les types cellulaires peuplant la SVZ. Cependant, les progéniteurs et les cellules en prolifération semblaient radio-sensibles dès 1 ou 2 Gy tandis que les cellules de type astrocytaire GFAP+ sont beaucoup moins radiosensibles. La prolifération cellulaire dans la SVZ a repris quelques jours après une irradiation à doses modérées (2-10 Gy) alors que pour des doses excédant 10 Gy, le blocage de la neurogenèse semble permanent (Tada et *al.*, 1999).

Les NSCs survivent à des doses de 10 Gy, mais perdent leur capacité à produire de nouveaux neurones (Achanta et *al.*, 2012). Une irradiation ciblée de la SVZ à forte dose (15 Gy) bloque la production de nouveaux neurones dans les bulbes olfactifs pendant plusieurs mois (Lazarini et *al.*, 2009). De même, l'irradiation ciblée de la SGZ à forte dose (10 Gy) bloque la neurogenèse hippocampique pendant plusieurs mois (Ford et *al.*, 2011).

Chapitre 4 : Effets des RF du téléphone portable chez l'enfant et recherche des mécanismes de neurotoxicité

1. Effets des RF du téléphone portable chez l'enfant

1.1. Données issues des modèles animaux

Lorsque des données obtenues directement chez l'Homme ou indirectement sur des tissus humains ne sont pas disponibles, mais que des effets sont observés chez l'animal, il est important de s'interroger sur la plausibilité de l'existence d'effets similaires chez l'Homme.

Les rongeurs sont souvent utilisés comme modèle d'étude des effets potentiels des RF. En effet, leur petite taille permet d'exposer plusieurs individus en même temps et dans des conditions plus ou moins identiques. De plus, leur durée de vie limitée autorise une exploration des effets pendant les différents stades de leur vie ainsi que sur plusieurs générations. De nombreuses méthodes ont été utilisées par les chercheurs pour corrélérer l'âge de rongeurs avec celui de l'Homme. Ainsi, sur la base de l'espérance de vie d'environ 2 à 2,5 ans chez le rat au laboratoire et 80 ans chez l'Homme :

- 1 année chez l'Homme équivaudrait à environ 14 jours chez le rat ;
- 1 jour de vie chez le rat est estimé à environ 30 jours chez l'Homme.

En revanche, sur les différentes périodes de développement, ces estimations changent (Tableau 2).

Tableau 2 : Corrélation entre l'âge des rats et de l'Homme en fonction des différentes phases de la vie (d'après Quinn, 2005 ; Sengupta, 2013).

	Sur la durée de vie totale	Sur la période de sevrage	Pendant la puberté	À l'âge adulte	Au cours de la ménopause	Lors de la sénescence
1 jour de rat équivaut à	26,7 jours humains	8,6 jours humains	110 jours humains	34,8 jours humains	31,0 jours humains	21,4 jours humains
1 année humaine équivaut à	13,8 jours de rat	42,4 jours de rat	3,3 jours de rat	10,5 jours de rat	11,8 jours de rat	17,1 jours de rat

1.1.1. Eléments de comparaison entre le développement cérébral chez les animaux de laboratoire et chez l'Homme

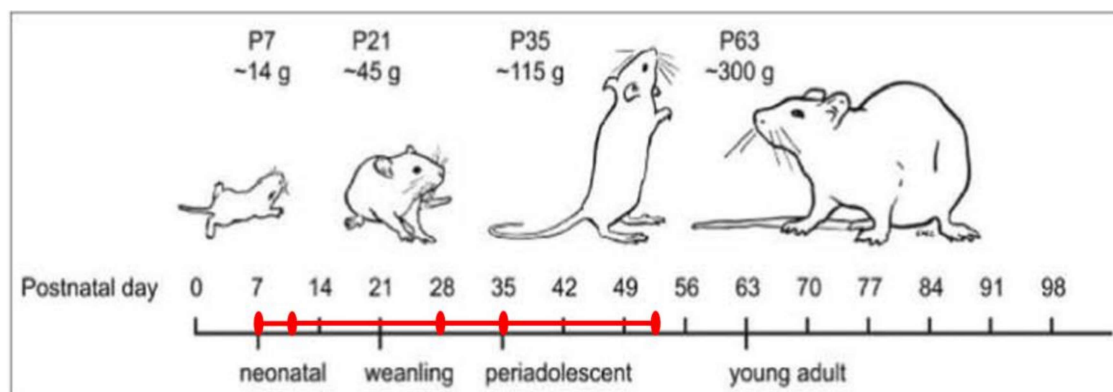
Qualitativement, chez l'Homme comme chez les autres mammifères, le cerveau en développement est différent du cerveau adulte. Cependant, les études montrent que le développement régional global est similaire entre les rongeurs (souris et rat) et l'Homme. Il est de même pour l'ordre dans lequel les différentes structures cérébrales se développent : la moelle épinière et les structures postérieures en premier, l'hippocampe et les cortex limbiques en dernier. Le développement du cervelet couvre une période très étendue, depuis la gestation et qui se prolonge au-delà de la naissance chez l'Homme comme chez le rongeur.

Il est important de noter que la majorité des structures cérébrales organisées en réseaux neuroanatomiques chez l'Homme, sont aussi présentes chez le rongeur et sous-tendent globalement les mêmes fonctions (Rice et Barone 2000). Cependant, il existe des différences pour certaines structures comme le système olfactif beaucoup plus développé chez le rongeur, alors que le néocortex l'est

beaucoup plus chez l'Homme. Enfin, l'Homme a un cerveau gyrencéphalique, alors que le rat a un cerveau lissencéphalique.

Bien qu'il existe des similitudes entre le développement des rongeurs et l'Homme, la temporalité peut être très différente. L'une des caractéristiques du développement cérébral du rongeur est qu'il est surtout postnatal et rapide (environ 3 mois depuis la conception dont 21 jours *in utero*), alors que chez l'Homme le développement prénatal cérébral est considérable et se poursuit après la naissance pendant environ 20 ans. Ainsi, le développement du rat se décline en mois, contre des années chez l'Homme.

La naissance ne représente pas une période particulière de changement absolu dans le développement du cerveau, ni la fin d'un processus de développemental particulier, et ce quelle que soit l'espèce. Malgré une accumulation des connaissances sur le développement du cerveau humain et celui du rongeur, il existe une réelle difficulté à établir une correspondance précise en jours/mois ou années entre les différentes périodes du développement. Il existe cependant un consensus sur le fait que le rat ou la souris naît beaucoup plus immature que l'Homme au point de vu du développement cérébral notamment (environ le début du 3^{ème} trimestre de la gestation chez le fœtus humain) et qu'à 10-12 jours, le jeune rat présente un développement cérébral qui peut être comparé à celui du nouveau-né humain. Le début de la puberté et de l'adolescence est estimé vers 28 jours chez le rongeur. Ce dernier est considéré comme adulte vers 60 jours (Figure 35)(Spear, 2000).



Âge du rat	10 – 12 jours	12 – 28 jours	28 – 35 jours	35 – 50 jours
Âge humain	Naissance	Enfant de 8 – 10 ans	Adolescent de 11 – 13 ans	Adolescent de 14 – 18 ans

Figure 35 : Développement cérébral chez le rat et l'Homme (modifié à partir d'Alling, 1985).

1.2. Etudes sur le système nerveux

1.2.1. Effets sur la BHE

Lors d'une étude, les têtes des rats âgés de 4 ou 10 semaines ont été exposées 90 min par jour, 6 jours par semaine pendant une ou deux semaines à un signal de 1 439 MHz (Kuribayashi et al., 2005). Les niveaux de DAS étaient de 2 ou 6 W/kg. Les effets sur la BHE ont été évalués par la quantification d'ARNm de gènes spécifiques de la structure tels que ceux codants pour la p-glycoprotéine, l'aquaporine-4 et la claudine-5. L'expression de ces 3 gènes n'est pas modifiée après exposition au signal RF, quels que soient les niveaux d'exposition et l'âge des animaux. De plus, la perméabilité vasculaire a été évaluée par

l'observation des coupes de cerveau au microscope à fluorescence (FITC-dextran) et par immunohistochimie de l'albumine. Les résultats ne montrent aucune altération d'une exposition aux RF. Les auteurs concluent que l'exposition aux ondes électromagnétiques à 1 439 MHz n'a pas d'effet délétère sur la BHE chez des rats jeunes ou adultes.

En 2006, des chercheurs ont exposé des souriceaux nouveau-nés à un signal GSM à 900 MHz 60 min / jour pendant les 7 premiers jours après la naissance (Finnie et *al.*, 2006a). Le DAS était de 4 W/kg. Aucune extravasation d'albumine chez les souriceaux nouveau-nés n'a été observée. Ces mêmes auteurs n'avaient pas trouvé d'effet dans les mêmes conditions d'exposition sur des cerveaux de fœtus de souris exposées durant toute la gestation (Finnie et *al.*, 2006b). Enfin, cette même équipe n'avait pas mis non plus en évidence de modification de la perméabilité de la BHE après une exposition chronique pendant toute la vie (2 ans) à un DAS de 4 W/kg (60 min / jour, 5 jours par semaine) ayant débuté à l'âge de 8 semaines (Finnie et *al.*, 2002).

Enfin, en 2007, des rats Wistar âgés de 21 jours ont été exposés pendant 5 semaines consécutives (2 h / jour et 5 jours / semaine) à un signal GSM à 900 MHz (Kumlin et *al.*, 2007). L'étude de la perméabilité de la BHE par la technique utilisant le bleu Evans ne montre pas d'effet de l'exposition aux RF.

Chez l'animal, les études convergent vers une absence d'effet d'une exposition à un signal RF sur la BHE chez le rat ou la souris immature. Le rapport de l'Anses publié en 2013 indiquait qu'aucun effet neurotoxique d'une exposition aux radiofréquences n'avait été mis en évidence sur la BHE, en dehors des effets thermiques, quels que soient les modèles biologiques testés.

1.2.2. Effets sur la réponse cellulaire, le stress oxydant et la neuro-inflammation

1.2.2.1. Etudes in utero

Une équipe a exploré l'expression de protéines de stress (HSP 25, 32, 70) dans le cerveau de fœtus de souris exposées *in utero* (GD 1 – GD 19) à un signal GSM 900 MHz, 60 min par jour (Finnie et *al.*, 2009). Le DAS était de 4 W/kg. Aucune différence d'expression des protéines de stress inductibles (HSP 32 et 70) n'a été observée entre les différents groupes au niveau du cerveau des fœtus.

En 2010, des chercheurs ont évalué les effets sur la gliose et l'apoptose de rats exposés 2 heures par jour, 5 jours par semaine de façon prénatale seulement (GD 6 – GD 21) (Aït-Aïssa et *al.*, 2010). Le signal était un signal Wi-Fi de 2,45 GHz avec 3 niveaux de DAS (0,08 ; 0,4 et 4 W/kg). La détection de gliose (dosage de la protéine GFAP) et de cellules apoptotiques (méthode TUNEL de détection des cassures d'ADN) a été réalisée au niveau de différentes régions du cerveau des jeunes rats (hippocampe, cortex, striatum, amygdale et zone pré-optique). Aucune altération n'a été observée à la suite de l'exposition prénatale.

1.2.2.2. Etudes combinées pré et post natales ou postnatales seules

Lors d'une étude, des rats de 35 jours ont été exposés à un signal RF de 2,45 ou 16,5 GHz. (Paulraj et Behari, 2006a) Les niveaux de DAS étaient de 1,0 et 2,0 W/kg. Les animaux ont été exposés 2 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 35 jours. Le test des comètes réalisé sur le tissu cérébral a révélé une augmentation des cassures simple-brin de l'ADN chez les rats exposés par rapport au groupe témoin, quelle que soit la fréquence du signal.

Cette même équipe a mesuré l'activité de la protéine kinase C (PKC) sur des cerveaux de 6 rats âgés de 35 jours exposés 2 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 35 jours (Paulraj et Behari, 2006b). Le DAS était de 0,11 W/kg à une fréquence de 2,45 GHz. L'activité de la PKC a été mesurée soit dans tout le tissu cérébral, soit uniquement dans l'hippocampe ou alors dans le restant du cerveau après prélèvement de l'hippocampe. Les auteurs ont mis en évidence une diminution significative de l'activité de la PKC dans l'hippocampe par rapport à celle du reste du cerveau et à celle du groupe contrôle, ainsi qu'une diminution dans le cerveau total. De plus l'analyse histologique montre une augmentation de la population gliale au niveau du cortex cérébral dans le groupe exposé.

En 2010, des chercheurs ont étudié les effets d'une exposition chez des rats de 6 semaines (Ammari et *al.*, 2010). La fréquence était de 900 MHz pendant 45 minutes par jour à un DAS de 1,5 W/kg ou 15 minutes par jour à un DAS de 6 W/kg, 5 jours par semaine pendant 8 semaines. L'expression de la GFAP a été quantifiée dans 5 structures cérébrales (cortex préfrontal, cortex cérébelleux, gyrus dentelé de l'hippocampe, globus pallidus latéral du pallidum et striatum) 3 ou 10 jours après la fin de l'exposition. Trois jours après la fin de l'exposition, une augmentation significative de la GFAP est observée pour les deux niveaux d'exposition dans toutes les structures. Dix jours après la fin de l'exposition, l'augmentation reste significative seulement dans le globus pallidus pour l'exposition au DAS faible, et dans 3 structures (hippocampe, cortex préfrontal et globus pallidus) pour l'exposition au DAS élevé. Les auteurs concluent qu'une exposition sub-chronique à un signal de 900 MHz peut augmenter un marqueur d'activation gliale de manière transitoire et réversible dans le cerveau du rat, ici suggérant ainsi une réaction de type inflammatoire.

La même année, une équipe a étudié l'effet des RF sur le cerveau en développement de jeunes rats âgés de 35 jours (Kesari et *al.*, 2010). La fréquence était de 2,45 GHz modulées à 50 Hz et les animaux ont été exposés 2 heures par jour pendant 35 jours, à un DAS de 0,11 W/kg. Chez les animaux exposés, le test des comètes révèle une augmentation significative des cassures doubles brin de l'ADN. De plus, les animaux exposés présentent une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase et glutathion peroxydase) ainsi que de l'histone H1 kinase, mais une augmentation de l'activité de la catalase. Pour les auteurs, ces éléments sont en faveur d'une production d'espèces réactives de l'oxygène suggérant la probabilité d'une promotion cancéreuse.

Les effets sur la gliose et l'apoptose ont été évalués chez des rats exposés 2 heures par jour, 5 jours par semaine en pré- et post- natal (GD 6 – PND 35). Le signal était un signal Wi-Fi de 2,45 GHz avec 3 niveaux de DAS (0,08 ; 0,4 et 4 W/kg)(Aït-Aïssa et *al.*, 2010). L'étude de la gliose et de cellules apoptotiques dans différentes régions du cerveau des jeunes rats (hippocampe, cortex, striatum, amygdale et zone pré-optique) n'a montré aucune altération à la suite de l'exposition pré- et post-natale.

Une étude s'est penchée sur les effets d'une exposition chronique sur la calbindine D28-K et sur l'expression de la GFAP chez des souris ICR mâles de 6 semaines (Maskey, et *al.*, 2010). L'exposition à un signal GSM à 835 MHz a duré 3 mois avec un DAS de 1,6 W/kg. Les résultats montrent une augmentation du marquage de la GFAP au niveau de l'hippocampe, avec une présence de cellules apoptotiques dans certaines aires de l'hippocampe. Les auteurs concluent à un effet des RF sur la viabilité cellulaire, menant à une astrocytose réactionnelle due à la compensation de la perte neuronale.

Les effets d'une exposition aiguë sur le stress cellulaire et la réponse gliale ont été étudiés (Watilliaux et *al.*, 2011). Des jeunes rats âgés de 5, 15 ou 35 jours ont été exposés 2 heures à un signal

de type GSM à une fréquence de 1 800 MHz. Les niveaux de DAS étaient de 1,7 et 2,5 W/kg. Le stress cellulaire a été évalué par la détection des heat shock proteins (HSP60, HSP 90 et HSC70) tandis que la réponse gliale (astrocytes et microglie) a été mesurée par un marquage immunohistochimique de diverses protéines comme la GFAP, la sérine-racémase, GLT1, GLAST et CD 68 dans 4 sous-régions cérébrales. Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition, aucune modification de l'expression de ces protéines n'a été observée. Cette étude est particulièrement informative, car elle a examiné les expositions chez des animaux immatures de différents âges et concerne plusieurs paramètres de l'inflammation au niveau des cellules gliales et de la microglie. Ces données semblent montrer que le cerveau très immature ne présente pas une sensibilité particulière à une exposition aiguë aux RF, par rapport à un cerveau plus développé comme celui du rat de 35 jours. Par ailleurs, les auteurs remarquent qu'il n'est pas exclu que l'anesthésie pendant l'exposition ait interféré avec une réponse cellulaire aux RF.

La neuro-inflammation a été étudiée chez des jeunes rats (6 semaines) et chez des adultes en début de vieillissement (12 mois)(Bouji et *al.*, 2012a). L'exposition a eu lieu pendant 15 minutes par un générateur de signal type GSM à 900 MHz et à un DAS de 6 W/kg. La GFAP a été mesurée dans le cortex, l'hippocampe et le striatum. Les interleukines IL-1 β et IL-6 ont été quantifiées dans le cortex, le cervelet, les régions sous-corticales et les bulbes olfactifs 48 h après la fin de l'exposition. Chez les rats exposés à l'âge de 6 semaines, aucun effet des RF sur l'expression de la protéine GFAP ou les interleukines n'a été observé dans les différentes structures cérébrales étudiées. Chez les rats exposés à l'âge de 12 mois, les résultats sont similaires à ceux observés chez les jeunes rats.

1.2.3. Synthèse et niveau de preuve concernant l'effet des RF sur le système nerveux

Effets des RF sur l'apparition de gliose

Chez le rat, cinq études ont examiné les effets des RF, soit en exposition postnatale (4 études) soit prénatale (1 étude) sur la protéine GFAP, marqueur d'activation des astrocytes et de réponse gliale, dans différentes structures cérébrales. Les études de Bouji et *al.*, et de Watilliaux et *al.*, montrent qu'une exposition aiguë à un signal GSM 900 ou 1 800 MHz (15 min – 2 h, DAS entre 1,7 et 6 W/kg) aux RF entre l'âge de 5 et 42 jours chez le jeune rat n'affecte pas l'activité de cette protéine 24 heures ou 48 heures après la fin de l'exposition. En revanche, une exposition chronique de 2 ou 3 mois ayant débuté à l'âge de 6 semaines entraînerait une augmentation transitoire de l'expression de la GFAP dans certaines régions cérébrales (Ammari et *al.*, 2010 ; Maskey et *al.*, 2010a). L'exposition chronique *in utero* ou pendant la gestation et la lactation n'entraînerait pas ces mêmes effets (Petitdant et *al.*, 2018 ; Aït-Aïssa et *al.*, 2010).

Effets des RF sur les cassures de l'ADN

Chez l'animal, deux études vont dans le sens d'une augmentation des cassures d'ADN, après exposition de 35 jours aux RF chez des rats âgés de 35 jours (Paulraj et Behari, 2006a ; Kesari et *al.*, 2010).

Effets des RF sur le stress oxydant

Chez l'animal, trois études se sont penchées sur la production de stress oxydant dans différentes structures cérébrales après exposition aux RF. Les résultats sont hétérogènes, puisque chez le rat, Maaroufi et *al.*, (2014) ne rapportent pas de stress oxydant dans les différentes structures cérébrales

étudiées, alors que les études de Kesari et *al.*, (2010a et 2010b) sont en faveur d'une production de stress oxydant par diminution de l'activité des enzymes antioxydantes. Il est à noter que les marqueurs de stress oxydant étudiés diffèrent en fonction des études pouvant très largement contribuer à l'hétérogénéité des résultats.

Effets des RF sur le stress cellulaire

Chez l'animal, deux études ont examiné les effets d'une exposition aux RF sur le stress cellulaire visualisé par les protéines de choc thermique. Bien que le protocole d'exposition (pré- vs postnatal), la durée d'exposition (aiguë vs chronique) ainsi que l'espèce animale (souris vs rat) soient différentes, ces 2 études concordent sur l'absence de stress cellulaire après exposition aux RF (Finnie et *al.*, 2009b ; Watillaux et *al.*, 2011).

1.3. Effets sur la morphologie cérébrale

Les effets tératogènes d'une exposition pré- et postnatale aux RF ont été étudiés (Cobb et *al.*, 2000). Des rats ont été exposés à un champ électromagnétique large bande (UWB) 24 heures sur 24, 7 jours sur 7 soit *in utero* (GD3 jusqu'à la naissance) soit en pré- et post- natale (GD 3 à PND 10). Le DAS a été évalué à 45 mW/kg. La morphologie de l'hippocampe a été évaluée en mesurant l'épaisseur de la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe et des cellules granulaires du gyrus denté ainsi que la présence de cellules en dégénérescence dans le gyrus denté. Les résultats montrent une augmentation de la longueur médio-latérale de l'hippocampe chez les animaux exposés par rapport aux animaux non exposés. Cependant aucun changement de la densité cellulaire, du nombre de cellules en dégénérescence ou encore de la morphologie cellulaire dans le gyrus denté n'a été remarqué.

Lors d'une étude, des rats Wistar âgés de 21 jours ont été exposés 2 heures par jour et 5 jours par semaine pendant 5 semaines consécutives à des ondes GSM à 900 MHz (Kumlin et *al.*, 2007). Les niveaux de DAS étaient de 0,3 et 3 W/kg. Les modifications morphologiques du SNC ont été étudiées par des analyses histochimiques de l'hippocampe. Les résultats ne mettent pas en évidence d'effet sur la morphologie cérébrale générale, sur le nombre de neurones morts ou nouvellement formés dans le gyrus denté de l'hippocampe.

Une étude s'est penchée sur les effets d'une exposition chronique sur la calbindine D28-K et sur l'expression de la GFAP chez des souris ICR mâles de 6 semaines (Maskey, et *al.*, 2010). L'exposition au signal GSM à 835 MHz a duré 3 mois avec un DAS de 1,6 W/kg. Les résultats soulignent une diminution significative de l'immuno-réactivité (8 à 10 % au maximum) dans les différentes sous-régions de l'hippocampe. Une augmentation du marquage de la GFAP au niveau des astrocytes est constatée, ainsi qu'une altération de la viabilité cellulaire. Les auteurs concluent à des effets potentiellement plus délétères lors d'une exposition longue par rapport à une exposition plus courte sur les neurones de l'hippocampe.

Compte tenu du faible nombre d'études ayant examiné cet effet, il est impossible, à ce jour, de conclure à un effet ou non des RF sur la morphologie de l'hippocampe.

1.4. Effets sur les fonctions cognitives et le comportement

1.4.1. *Etudes chez l'Homme*

1.4.1.1. *Etudes de type expérimental*

En 2005, l'effet d'une exposition aux RF sur les performances cognitives à court terme chez 32 des enfants âgés de 10 à 14 ans a été évalué (Haarala et *al.*, 2005). L'exposition a été réalisée avec un signal GSM à 902 MHz et à des DAS moyens estimés sur 1 g et 10 g de tissu respectivement de 1,44 W/kg et 0,990 W/kg, avec un pic à 2,07 W/kg. Les enfants ont été exposés aux RF ou aux signaux factices à 24 heures d'intervalle dans un ordre aléatoire. Huit tests expérimentaux ont été utilisés dans un ordre aléatoire : 4 tests provenant du CogniSpeed (temps de réaction) et 4 tests de mémoire à court terme. Les résultats n'ont pas mis en évidence de différence dans le temps de réaction et l'exactitude des réponses. Les auteurs concluent qu'un téléphone mobile actif n'affecte pas les performances cognitives à court terme chez les enfants âgés de 10 à 14 ans.

En complément de l'étude précédente, une série de tests de cognition (Cognitive Drug Research) a été réalisée sur 18 enfants âgés de 10 à 12 ans exposés à un téléphone mobile (Preece et *al.*, 2005). Les enfants ont été exposés selon 3 conditions différentes dans un ordre aléatoire le même jour : off, puissance maximale à 0,2 W ou à 2 W. Le DAS maximal estimé était de 0,28 W/kg. Les résultats ont montré une diminution du temps de réaction en présence du signal GSM avec l'augmentation de la puissance. De même, une tendance à une plus grande exactitude et un plus grand index de sensibilité des résultats a été retrouvée chez les sujets exposés. De plus, des effets sur le temps de réaction ont également été observés dans le passé chez des adultes (Preece et *al.*, 1999, Koivisto et *al.*, 2000).

En 2013, une étude s'est intéressée à la sensibilité potentielle aux CEM émis par les téléphones mobiles chez 22 adolescents de 11 à 13 ans (Loughran et *al.*, 2013). Lors du protocole trois sessions de 30 minutes d'exposition ont eu lieu. À chaque session, les adolescents ont été soumis à un signal GSM à 900 MHz, à 2 niveaux de DAS (1,4 W/kg et 0,35 W/kg), et à une exposition factice. Après chaque session, il a été demandé aux participants s'ils étaient en mesure de percevoir les ondes. De plus, une échelle visuelle de 0 à 100 mm a été proposée à chaque session avant l'EEG. Les adolescents ont été chargés d'évaluer les paramètres suivants : fatigue, humeur, énergie et concentration. L'étude n'a pas mis en évidence d'altération ou d'amélioration des tâches cognitives en fonction du niveau d'exposition ni du temps.

1.4.1.2. *Etudes épidémiologiques*

Études portant sur des enfants ayant été exposés in utero ou au cours de la petite enfance (< 6 ans)

De nombreuses recherches ont étudié le lien entre la survenue de troubles du comportement chez des enfants et leurs expositions pré- et post- natale (jusqu'à l'âge de 7 ans) aux RF des téléphones mobiles. Une première étude a été conduite sur un sous-échantillon de plus de 13 000 mères incluses entre 1997 et 1999 dans la Danish National Birth Cohort (Divan et *al.*, 2008). Contactées 7 ans après leur grossesse, les mères ont complété elles-mêmes un questionnaire concernant leur enfant âgé de 7 ans. Il leur était aussi demandé de mentionner l'utilisation d'un téléphone mobile pendant leur grossesse et l'utilisation éventuelle d'un téléphone mobile ou d'un téléphone sans fil par leur enfant. L'échantillon (n = 13 159, taux de réponse : 65 %) a été réparti en 4 groupes de mères selon l'exposition des enfants :

- Les mères dont les enfants ont pu être exposés à la fois en période pré- et post- natale (n = 1 421);

- Les mères dont les enfants ont pu être exposés uniquement en période prénatale (n = 1 895) ;
- Les mères dont les enfants ont pu être exposés uniquement en période postnatale (n = 2 281) ;
- Les mères dont les enfants n'ont pas été exposés (n = 6 471).

Une association est retrouvée entre la survenue de troubles du comportement général des enfants et l'exposition des enfants en période prénatale seulement (OR = 1,54 [1,32 - 1,81], postnatale seulement (OR = 1,18 [1,01 - 1,38]) et à la fois en périodes pré- et post- natale (OR = 1,80 [1,45 - 2,23]). Par ailleurs, lorsque les associations sont mesurées avec des troubles spécifiques du comportement (émotivité, hyperactivité, problèmes de comportement et problèmes relationnels), les OR restent significatifs pour l'exposition prénatale seule et combinée pré- et post- natale, avec des OR plus élevés dans l'exposition combinée.

L'exposition aux RF est supposée supérieure lorsque l'enfant utilise le téléphone (exposition postnatale) que lorsqu'il est *in utero* (exposition prénatale), or, les OR tendent à montrer une association plus forte entre la survenue de troubles du comportement et une exposition prénatale et pré- et post-natale combinée qu'avec une exposition postnatale seule.

La population de cette première étude d'enfants de 7 ans (n = 12 796) a été réanalysée en comparaison d'une autre population d'enfants nés entre 1998 et 2001, issus de la même cohorte de mères (n = 28 745). De nouvelles analyses tenant compte notamment d'un nombre plus important de facteurs de confusion ont été réalisées (Divan et al., 2010). Les données obtenues montrent des résultats similaires à l'étude précédents, essentiellement en rapport avec une exposition prénatale (exposition prénatale seulement : odd ratio (OR) = 1,4 [1,2 - 1,5]). Le test de tendance sur l'intensité de l'exposition de la mère pendant la grossesse est significatif (p = 0,004) (OR téléphone « on » < 50% = 1,4 [1,0 - 2,1] ; OR téléphone « on » de 50 à 99 % du temps = 1,7 [1,2 - 2,3] ; OR téléphone « on » 100 % du temps = 2,0 [1,4 - 2,7]).

Une nouvelle analyse de cette même cohorte de mères portait sur les enfants qui avaient un retard de développement (Divan et al., 2011). Les résultats ne mettent pas en évidence de relation entre l'usage du téléphone mobile pendant la grossesse et la présence de retard cognitif ou de langage à 18 mois (OR = 1,1 [0,9 - 1,3]) ou la présence d'un retard de développement moteur (OR = 0,9 [0,8 - 1,0]).

Une nouvelle étude a porté sur la relation entre une exposition prénatale et les troubles du développement (Vrijheid et al., 2010). Ainsi, le développement psychomoteur et mental d'une cohorte d'enfants (n = 530) a été évalué à 14 mois (Bailey Scales of infant development) alors que l'exposition des mères au téléphone mobile a été évaluée lors de la 32^{ème} semaine de grossesse. Les résultats montrent que les enfants de mères utilisatrices ont un développement mental légèrement plus précoce que celui des mères non utilisatrices. Une relation inverse est observée pour le développement psychomoteur. Aucune tendance avec l'intensité de l'usage du téléphone mobile par la mère n'est mise en évidence. Les résultats de cette étude corroborent ceux d'études précédentes sur l'absence de lien entre exposition périnatale aux CEM-RF et développement psychomoteur.

Une étude de cohorte de 8 266 mères enceintes aux Pays-Bas a enquêté sur la relation entre l'exposition au téléphone mobile et les troubles du comportement chez 2 618 enfants de 5 ans (Guxens et al., 2013a). L'évaluation de l'usage de téléphone pendant la grossesse a été évalué rétrospectivement par un questionnaire lorsque l'enfant avait 7 ans, et les troubles du comportement ont été rapportés à l'aide du questionnaire sur les points forts et les difficultés (Strengths and Difficulties Questionnaire SDQ).

par l'enseignant et les parents lorsque l'enfant avait 5 ans. Aucune association avec l'augmentation de l'usage du téléphone mobile de la mère n'est observée.

Études portant sur des enfants ayant un usage du téléphone mobile au-delà de la petite enfance (> 6 ans)

La MobilEe-Study est une étude portant sur 1 484 enfants allemands âgés de 8 à 12 ans et 1 508 adolescents de 13 à 17 ans entre 2006 et 2008 (Kühnlein, 2009). Leur exposition aux RF entre 900 MHz, 1 800 MHz et 2 400 MHz a été enregistrée pendant 24 heures au moyen d'un exposimètre individuel. Les données ont été exploitées afin d'évaluer l'association entre l'exposition aux RF et la survenue de troubles comportementaux et mentaux (Thomas et al., 2008 ; 2010a). La santé mentale a été évaluée par le Strengths and Difficulties Questionnaire. L'exposition au plus haut quartile est statistiquement associée à de plus nombreux problèmes comportementaux de l'enfant (OR = 2,9 [1,4 - 5,9]) et de l'adolescent (OR = 3,7 [1,6 - 8,4]). En revanche, aucune association entre l'exposition et les problèmes émotionnels ou relationnels n'a été retrouvée, que ce soit pour les enfants ou les adolescents. Chez les adolescents, une augmentation (non significative) de l'Odds-ratio pour l'hyperactivité est observée (OR = 2,1 [0,9 - 4,8]), ce qui n'est pas observé chez les plus jeunes. Cependant, il s'agit d'une étude transversale sans ajustement sur d'autres facteurs de confusion potentiels (problèmes psychiatriques des parents, informations sur la grossesse de la mère...) or, la présence d'éventuels troubles psychiatriques dans la famille pourrait modifier ces résultats.

Des chercheurs ont interrogé 317 enfants âgés de 11 à 14 ans (Abramson et al., 2009). L'exposition a été auto évaluée et les réponses à une batterie de tests cognitifs ont été analysées : tests psychométriques (CodHealthTM) et test de Stroop (capacité à traiter de façon simultanée 2 éléments, un mot et une couleur). Chez les enfants qui rapportent une plus grande durée de conversation (appels ou SMS), le temps de réaction est plus court mais la précision moindre (réponses plus impulsives) aussi bien pour des tâches simples que pour des tâches d'association.

Afin d'évaluer des effets à plus long terme, les mêmes enfants ont été réinterrogés un an plus tard. Les mêmes tests cognitifs ont été réalisés, et les résultats ont été comparés par rapport à ceux effectués un an auparavant. Cette fois, aucune association n'a été observée entre le nombre d'appels et les modifications de la précision de la réponse pour les tests. Cependant, le temps de réponse pour 2 tâches de mémorisation augmente pour les enfants qui présentaient le plus grand nombre d'appels téléphoniques et la plus grande utilisation de SMS au début de l'étude. Aucune modification dans l'exactitude des réponses n'a été trouvée.

1.4.2. Etudes chez l'animal

Une étude a porté sur le développement (ouverture des yeux, éruption dentaire...), le comportement (vocalisation de stress, locomotion, mémoire spatiale), la capacité reproductrice chez les mâles, et la morphologie hippocampique après une exposition pré- ou pré- et post- natale aux RF (Cobb et al., 2000). Des rats ont été exposés *in utero* (GD 3 jusqu'à la naissance) ou de façon pré- et post- natale (GD 3 à PND 10) à un CEM large bande. Le DAS a été évalué à 45 mW/kg. Les résultats suggèrent qu'une exposition pré- et post- natale n'affecte pas les performances cognitives des jeunes rats. De même, une exposition prénatale n'affecte ni les performances d'apprentissage spatial en piscine de Morris, ni l'activité locomotrice des rats testés à l'âge de 40 et 50 jours, respectivement. Cependant, les rats exposés

in utero présentent, à 8, 10 et 13 jours, plus de vocalisations de stress que les rats contrôls shams quand ils sont séparés de leur mère.

Des rats Wistar âgés de 21 jours ont été exposés 2 heures par jour, 5 jours par semaines pendant 5 semaines consécutives à des ondes GSM à 900 MHz (Kumlin et *al.*, 2007). Les niveaux de DAS étaient de 0,3 et 3 W/kg. Le développement du SNC a été évalué par des tests de mesure de l'activité générale, de l'anxiété, de la mémoire spatiale, de la réactivité générale et d'inhibition du réflexe de sursaut. Les résultats montrent qu'une exposition semi-chronique aux RF n'affecte ni l'activité locomotrice, ni l'anxiété, ni les réponses de sursaut. En revanche, les auteurs observent une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire 24 heures après l'exposition au niveau de RF le plus élevé ? dans le test de la piscine de Morris. Les auteurs ne concluent pas à des effets bénéfiques d'une exposition sub-chronique aux RF sur la mémoire, mais suggèrent de plus amples recherches.

En 2010, des chercheurs ont exposé des rats (GD 7 à PDN 21) à un signal W-CDMA à 2,14 GHz, 20 heures par jour (Takahashi et *al.*, 2010). Le DAS a été évalué entre 0,068 et 0,146 W/kg pour l'exposition la plus forte, et entre 0,026 et 0,067 W/kg pour l'exposition la plus faible. Les capacités en mémoire spatiale et l'activité locomotrice ont été évaluées chez les descendants. Quel que soit le niveau, l'exposition aux RF n'a affecté ni l'activité dans le champ ouvert entre 5 et 8 semaines post-natales, ni les performances de mémoire spatiale à court terme à 9 semaines post-natales.

En 2013, une publication rapporte l'effet d'une exposition 1 heure par jour pendant 28 jours de jeunes rats (6-8 semaines) à un téléphone mobile en mode silencieux (50 appels manqués/heure) (Narayanan et *al.*, 2013). Le signal était de type GSM à 900 MHz et le DAS de 1,15 W/kg. L'activité locomotrice et l'anxiété ont été mesurées dans un labyrinthe en croix surélevé au 29^{ème} jour. Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition, les rats exposés ne présentaient aucune altération de l'activité locomotrice générale. En revanche, une diminution significative du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts a été constatée dans le groupe exposé par rapport au groupe contrôle. De plus, une augmentation du nombre de défécations et une diminution des toilettages et des redressements ont été observées chez les rats exposés. Ces modifications pourraient être le reflet d'une augmentation du niveau d'anxiété des rats exposés, par rapport aux rats contrôles.

La même année, une équipe a exposé des rates gestantes à un signal pulsé de 900 MHz, 6 heures par jour et ce pendant toute la durée de la gestation (Haghani et *al.*, 2013). Dix nouveau-nés dans chaque groupe ont subi une évaluation de leur comportement moteur et de leur activité locomotrice ainsi qu'une exploration des propriétés électrophysiologiques des cellules de Purkinje du cervelet. Les résultats montrent que l'exposition prénatale aux RF n'affecte ni la force musculaire, ni l'équilibre et ni l'activité locomotrice globale des rats exposés, par rapport aux témoins. Seul, le nombre de redressements est diminué dans le test du champ ouvert. Cependant, les auteurs notent des altérations des propriétés électrophysiologiques des cellules de Purkinje du cervelet issus des rats exposés. En effet, ils retrouvent des changements dans leur activité spontanée, une baisse de leur excitabilité et des propriétés de décharges répétées de ces neurones en réponse à divers courants induits dans la préparation, ainsi qu'une baisse de la fréquence de décharge de ces mêmes cellules.

En 2018, l'homéostasie gliale de la progéniture, le déclenchement sensori-moteur, l'émotivité et la recherche de nouveauté ont été évalués après une exposition maternelle au téléphone portable. (Petitdant et *al.*, 2018) Les mères gestantes étaient exposées à un signal GSM 900 MHz à un DAS de 1

W/kg et 4 W/kg. Les scores d'inhibition du réflexe de sursaut, du conditionnement de la peur, du champ ouvert et du labyrinthe en croix surélevé ont été évalués à l'adolescence et à l'âge adulte. De plus, la GFAO et l'interleukines 1 β ont été quantifiées. L'activité en plein champ a été réduite à 4 W/kg chez le rat adolescent. Le GFAP et les IL, la mémoire émotionnelle et les comportements liés à l'anxiété n'ont pas été modifiés.

1.4.3. Synthèse et niveau de preuve concernant l'effet des radiofréquences sur le comportement et les fonctions cognitives

Effets des RF sur le comportement

Chez l'enfant, les études de Divan et al., (2008, 2010), et celles de Thomas (Thomas et al., 2010a) convergent vers un lien possible entre les symptômes de troubles comportementaux chez des enfants de moins de 7 ans et l'exposition aux RF évaluée par l'intensité d'usage du téléphone mobile par la mère, en particulier lors de la période prénatale.

Cependant l'évaluation rétrospective de l'exposition lors de ces études peut avoir entraîné des biais de mémorisation. De plus, les niveaux d'exposition du fœtus liés à l'usage du téléphone mobile par la mère pendant la grossesse sont vraisemblablement faibles.

En conclusion, une association entre l'usage du téléphone mobile et des troubles du comportement chez l'enfant pourrait exister. Les éléments de preuves disponibles ne permettent pas de conclure de manière forte à l'existence ou non d'un effet des RF sur le comportement des enfants.

Chez l'animal juvénile, deux études se sont intéressées à l'effet d'une exposition aux RF sur l'anxiété chez de jeunes rats. La première ne montre aucun effet d'une exposition aux RF (Kumlin et al., 2007) alors que la seconde montre une augmentation de l'anxiété (Narayanan et al., 2012). Ces résultats apparemment contradictoires pourraient révéler des effets âge-dépendants. Ainsi, il est difficile de conclure sur la base de deux études quant à un effet des RF sur l'anxiété du jeune rat. En ce qui concerne la locomotion aucune altération n'a été retrouvée.

Par conséquent, les éléments de preuve disponibles ne permettent pas de conclure à l'existence ou non d'un effet des RF sur l'anxiété chez l'animal.

Effets des RF sur les fonctions cognitives

Chez l'enfant, deux études épidémiologiques rapportent une amélioration de certaines fonctions cognitives après exposition au téléphone mobile *in utero* ou lors de l'enfance (Vrijheid et al., 2010 ; Thomas et al., 2010). Dans une autre étude, les enfants ou adolescents ayant une plus grande utilisation du téléphone portable présentent des temps de réaction plus courts, mais des résultats moins exacts que les non utilisateurs (Abramson et al., 2009).

Cependant, ces résultats ne sont pas confirmés par la majorité des études expérimentales dans lesquelles il n'y a pas de différence dans l'exécution de tâches cognitives entre les jeunes exposés et les non exposés aux RF.

Par conséquent, les éléments de preuve disponibles permettent de conclure à un effet limité des RF sur les fonctions cognitives des enfants.

Chez l'animal, aucun effet n'est observé sur l'apprentissage et la mémoire spatiale à court-terme lors d'une exposition prénatale seule ou pré- et post- natale combinée ou uniquement postnatale aux RF (Cobb et *al.*, 2000 ; Takahashi et *al.*, 2010 ; Maaroufi et *al.*, 2009 ; 2014). Une amélioration des performances est observée après 5 semaines d'exposition chez le rat de 21 jours (Kumlin et *al.*, 2007). Cependant, ces résultats ne sont pas retrouvés par Maaroufi et *al.*, (2009 et 2014).

Chez l'animal, les éléments de preuve disponibles ne permettent pas d'identifier d'effets persistants ou de forte amplitude .

En conclusion, les données disponibles ne permettent pas de démontrer l'absence d'effet des RF sur les fonctions cognitives de l'enfant.

1.5. Etudes sur la cancérogenèse

1.5.1. *Chez l'Homme*

1.5.1.1. *Exposition aux tours d'émissions de radio et télédiffusion et stations de base de téléphonie mobile*

Une étude écologique réalisée en Corée du Sud a étudié les taux de mortalité par cancer sur la période 1994-1995 dans dix zones estimées exposées aux RF dans la bande FM de tours de radio de plus de 100 kW et dans 40 zones témoins (4 par zone exposée) (Park et *al.*, 2004). Le ratio du taux de mortalité par leucémie, ajusté sur l'âge était plus élevé chez les enfants de 0-14 ans dans les zones exposées. Le manque de puissance de l'étude ne permet pas de mettre en évidence de lien avec les tumeurs du cerveau.

En 2008, une étude cas-témoins portant sur les hémopathies malignes (leucémies lymphoïdes chroniques, leucémies myéloïdes chroniques, syndromes myéloprolifératifs, myélo-dysplasies) de l'enfant de 3 à 14 ans dans l'entourage de 24 tours d'émission radio et TV a été réalisée (Merzenich et *al.*, 2008). Le recensement des cas a été réalisé de 1984 à 2004 à partir des registres des cancers. Ainsi, l'étude portait sur 1 959 cas et 5 848 témoins. L'exposition individuelle aux champs RF a été calculée grâce à un logiciel initialement développé pour assurer une bonne couverture radiophonique et télévisuelle aux ménages allemands. Un système d'information géographique intégré a permis l'évaluation de l'exposition au niveau des lieux de résidence des cas et des témoins. L'évaluation de l'exposition des populations a été réalisée à partir des calculs des champs RF provenant de la télévision et des ondes radio AM et FM. Ce système de modélisation a été validé par comparaison avec des mesures environnementales de RF et les résultats ont montré que les champs mesurés et calculés sont très fortement corrélés. Les résultats démontrent :

- Une absence d'association entre l'exposition aux RF émises par les antennes de radiotélédiffusion et la fréquence de survenue de leucémies infantiles ;
- Une stratification sur le temps (1983 - 1991 et 1992 - 2002) n'a pas mis en évidence une différence avant et après l'introduction du téléphone mobile ;
- L'analyse des seuls enfants âgés de 0 à 4 ans n'a pas changé les résultats.

La limite la plus importante de cette étude repose sur le fait que seule l'adresse au moment du diagnostic du cas a été prise en compte. Or, les enfants ont pu vivre à d'autres adresses, la dernière pouvant être assez récente pour ne pas contribuer à l'exposition en cause.

Des chercheurs en Grande-Bretagne ont étudié de 1999 à 2001 l'exposition *in utero* aux stations de base pour 1 397 enfants de moins de 4 ans, atteints de cancers (tumeurs solides et leucémies) et de 5 588 témoins (Elliott *et al.*, 2010). L'exposition aux stations de base (GSM à 900 MHz et 1 800 MHz) a été estimée par une modélisation basée sur des mesures sur le terrain et tenant compte de plusieurs paramètres (distance entre l'adresse du domicile au moment de la naissance et l'antenne la plus proche, directivité et densité de puissance de cette antenne). Les résultats de l'étude sont les suivants :

- Une absence d'association avec la distance : OR (0 - 612 m) = 1,0 ; [IC 95 % : 0,7-1,4] ;
- Une absence d'association avec la densité de puissance : OR (> 0,017 mW/m²) = 0,8 ; [IC 95 % : 0,5-1,1].

Les limites de cette étude sont que les sources d'exposition aux RF autres que les antennes-relais au domicile n'ont pas été prises en compte. De plus, l'adresse à la naissance n'est pas forcément l'adresse lors de la grossesse limitant la portée des conclusions.

Une étude a examiné l'association entre l'exposition aux RF émises par les tours d'émissions FM ou TV et les cancers de l'enfant (registre suisse des tumeurs de l'enfant)(Hauri *et al.*, 2014). A partir des données obtenues, deux analyses ont été réalisées : une analyse de Cox sur la période 2000-2008 (time to event) et une analyse de densité d'incidence dans la population des jeunes suisses habitant dans le pays entre 1985 et 2008. Les résultats ne montrent aucun effet de l'exposition ni sur le risque de cancers en général, ni sur les leucémies. En revanche, sur les tumeurs cérébrales, un OR augmenté est retrouvé dans la première étude (test de tendance significatif) chez les sujets ayant l'exposition la plus forte.

De plus, lorsqu'une stratification sur la période d'exposition est réalisée (avant et après l'introduction du téléphone mobile), le résultat de l'analyse de densité d'incidence sur les tumeurs du cerveau est significatif pour la première période (1985-1995).

On peut noter que l'exposition au téléphone mobile personnel n'est pas prise en compte et pourrait être un facteur de confusion sur la période la plus récente (1995-2008). Cette étude présente une méthodologie très soignée et très solide.

1.5.1.2. Exposition via le téléphone mobiles

L'étude Mobi-Kids est une étude cas-témoins en cours dans 13 pays. Sur une période de 5 ans seront inclus dans l'étude près de 2 000 patients de 10 à 24 ans atteints de tumeurs cérébrales et 4 000 témoins du même âge. Elle utilise des données validées sur l'exposition chez les enfants et les jeunes adultes et prend en compte de nombreux facteurs de confusion potentiels. Ses résultats devraient permettre d'apporter un certain nombre d'éclaircissements.

Les analyses internationales sont actuellement en cours, prenant en compte les résultats des études de validation et des questionnaires non-répondants. Deux types d'analyses seront menées : l'une portant sur le lien entre tumeurs cérébrales et caractéristiques de l'utilisation des mobiles (nombre d'années, durée des appels, nombre d'appels), et l'autre en fonction de l'exposition aux RF et aux ondes d'extrêmement basse fréquence à la localisation de la tumeur.

Au vu de la forte utilisation des téléphones chez les jeunes, les résultats de cette étude sont très importants pour évaluer l'existence ou non d'une augmentation du risque d'une des tumeurs les plus fréquentes dans cette tranche d'âge et dont l'étiologie est mal connue.

Si les résultats ne montrent pas d'effet, cette étude, combinée avec d'autres, permettront de conclure qu'il n'existe pas de risque majeur, bien qu'elle ne pourra pas exclure la possibilité d'un risque faible. Si au contraire les résultats montrent un effet, ceci sera important pour renforcer les politiques de prévention.

1.5.2. Chez l'animal

Lors de deux études, des chercheurs ont examiné l'effet de l'exposition chronique sur toute la vie à deux niveaux de puissance (DAS de 0,67 et 2 W/kg) sur la vitesse de développement de tumeurs dans le système nerveux de rats (cerveau et moelle épinière) (Shirai et al., 2005 ; 2007). L'exposition locale a eu lieu pendant 2 ans à partir de l'âge de 5 semaines à raison de 90 minutes par jour, 5 jours par semaine. Les signaux étaient de type TDMA à 1 439 MHz en 2005 et W-CDMA à 1 950 MHz en 2007. Un initiateur de tumeurs (N-nitrosoN-éthylurée, ENU) a été administré aux rates à 18 jours de gestation (non exposé sans ENU (groupe contrôle), un groupe ENU seul, un groupe ENU + exposition factice, un groupe ENU + DAS faible et un groupe ENU + DAS élevé). En 2005, les résultats observés montrent une diminution de l'incidence des tumeurs pituitaires à 2 W/kg chez les mâles. Dans l'étude de 2007, il n'y a pas d'effet même si une tendance à l'augmentation de l'incidence et du nombre de tumeurs cérébrale est observée chez les femelles exposées.

En 2007, une équipe a utilisé des souris Patched1 (Ptcl+/-) qui ont la particularité de montrer une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et de développer des tumeurs dans multiples organes (notamment cerveau et peau) (Saran et al., 2007). Dans cette étude, 200 souriceaux Ptcl+/- et 200 souriceaux non mutés ont été inclus. Ils ont été exposés dès le 2ème jour post-natal à un signal GSM à 900 MHz à raison de 30 minutes par jours pendant 5 jours. Le DAS était de 0.4 W/kg. Après exposition, les souris ont été maintenues en vie afin d'étudier les taux de survie dans les différents groupes. Les résultats ne montrent aucun effet de l'exposition sur la survie, ou sur l'incidence des tumeurs. Cette étude montre qu'une exposition aiguë à un signal GSM en période néonatale sur des animaux prédisposés à développer des tumeurs n'a eu de conséquences ni sur l'apparition de tumeurs ni sur la survie des souris nouveau-nées.

Des chercheurs ont examiné l'effet génotoxique d'une exposition chronique chez la souris à partir de l'âge de 45 jours (n = 1 170) par le test des micronoyaux (Ziemann et al., 2009). Les souris ont été exposées à un signal GSM ou DCS à raison de 2 heures par jours, 5 jours par semaine. Les niveaux de DAS étaient de 0,4, 1,3 ou 4 W/kg. L'apparition de micronoyaux a été explorée au sein des cellules sanguines. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence quelles que soient les conditions d'exposition.

Une étude s'est intéressée à l'effet cancérigène des RF au cours d'une co-exposition en présence d'ENU (Tillmann et al., 2010). Les expositions duraient 20 heures par jour pendant 2 ans à un rayonnement électromagnétique de type 3G (UMTS) à 4,8 W/m², avec ou sans l'ENU. Les résultats de ces travaux mettent en évidence des augmentations significatives de l'incidence des tumeurs chez les animaux co-exposés aux RF par rapport à ceux exposés à l'ENU seul. L'incidence du carcinome bronchoalvéolaire multiple et de l'adénome hépatocellulaire multiple étaient significativement augmentées chez les animaux co-exposés (ENU + RF) par rapport au groupe ENU seul. En revanche, aucun effet n'était observé chez les animaux exposés aux RF uniquement. Cette étude bien menée ne met pas

en évidence un effet cancérigène des RF seules, mais les présente comme un potentiel cofacteur cancérigène.

Des rats Sprague-Dawley âgés de 5 semaines ont été exposés à un signal de type CDMA à 89 MHz et W-CDMA à 1.95 GHz simultanément pendant un an à raison de 45 minutes par jour, 5 jours par semaine (Jin et *al.*, 2011). Les niveaux de DAS étaient de 2 W/kg chacun, soit un total de 4 W/kg. Une analyse histopathologique de la majorité des organes a été réalisée (cerveau, thymus, cœur, foie, rate, rein, ovaires, testicules, ganglions lymphatiques). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les groupes exposés et le groupe témoin.

La même équipe s'est intéressé à l'effet cancérigène des RF en exposant des souris de manière chronique (42 semaines), à des signaux de type CDMA et W-CDMA simultanément pour un DAS total de 4 W/kg (Lee et *al.*, 2011). La survie, l'apparition de tumeurs, les diffusions métastatiques et les paramètres immunohistochimiques ont été étudiés. Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les groupes exposés et témoins.

Les effets cytotoxiques et génotoxiques d'une exposition de 45 jours (2 heures par jour) sur les cellules de la moelle osseuse issues de jeunes rats exposés à partir de l'âge 15 jours post-natal ou de rats adultes exposés à partir de l'âge de 10 semaines ont été étudiés (Şekeroğlu et *al.*, 2012). Le protocole comporte 6 groupes de rats : 3 groupes par catégorie d'âge (immature vs mature), 2 groupes de rats exposés pendant 45 jours (DAS = 0,37 W/Kg pour les rats immatures, DAS = 0,49 W/kg pour les rats adultes) et 2 groupes de rats exposés et testés après un délai de 15 jours post exposition. En effet, la possibilité d'une récupération au cours des 15 jours suivant la fin de l'exposition a été évaluée. Immédiatement après exposition, les résultats montrent une augmentation significative de la fréquence des aberrations chromosomiques, et des micronoyaux chez les rats exposés, juvéniles ou matures, avec une fréquence plus élevée chez les animaux jeunes. Le type de lésion d'ADN le plus retrouvé est la fragmentation des brins. Chez les rats juvéniles, la période de récupération diminue la formation d'aberrations chromosomiques et de micronoyaux. L'index mitotique et le rapport des érythrocytes polychromatiques sont significativement diminués chez les rats exposés (matures et immatures) et restent bas même après la période de récupération. Les auteurs concluent sur la nécessité d'études complémentaires pour comprendre les effets des RF sur l'ADN et les mécanismes de réparation, et d'adapter les limites d'exposition dans l'environnement, en particulier des enfants.

1.5.3. Synthèse et niveau de preuve concernant l'effet cancérigène des radiofréquences

Parmi les 4 études les plus récentes concernant des effets liés à une exposition aux émetteurs FM, 2 ne montrent pas d'effet (Merzernich et *al.*, 2008 ; Elliott et *al.*, 2010), et 2 montrent des résultats non concordants (Ha et *al.*, 2007 ; Hauri et *al.*, 2014). En effet, l'étude de Hauri et *al.*, (2014) ne montre pas de relation entre l'exposition aux RF dans la bande FM et les leucémies de l'enfant, alors que les tumeurs du cerveau sont augmentées chez les plus exposés. L'étude de Ha et *al.*, (2007) montre l'inverse.

Les analyses de tendances temporelles ne soutiennent pas l'hypothèse d'une association entre l'exposition aux RF et la survenue de tumeurs cérébrales chez les enfants et adolescents. Cependant, elles ne permettent pas non plus de l'exclure.

Les études cas-témoins ne permettent pas de conclure à une relation entre une exposition aux CEM RF et les cancers de l'enfant. Il faut attendre les conclusions de l'étude Mobi-Kids pour répondre aux interrogations.

Les éléments de preuve disponibles ne permettent pas de conclure à l'existence ou non d'un effet cancérigène des RF chez l'enfant.

Chez l'animal, trois études ont examiné l'apparition de tumeurs après une exposition aux RF. Les deux études publiées sur l'effet co-cancérigène des RF rapportent des effets non concordants (Shirai et *al.*, 2005 ; 2007 ; Tillmann et *al.*, 2010). En effet, les études de Shirai n'ont pas montré d'effet co-cancérigène des RF, tandis que l'étude de Tillmann et *al.*, rapporte une augmentation de l'incidence des tumeurs broncho-alvéolaires et hépatiques. Cependant, les doses d'ENU administrées ne sont pas comparables (Tillmann et *al.*, ont administré 40 mg/kg d'ENU, tandis que Shirai et *al.*, ont administré 4 mg/ml/kg d'ENU, sans préciser le volume injecté).

Deux études ont examiné les effets d'une exposition aux RF sur la cytotoxicité et la génotoxicité de cellules sanguines matures ou non (Ziemann et *al.*, 2009 ; Şekeroğlu et *al.*, 2012). Tandis que la première étude ne montre pas d'effet, la seconde rapporte une augmentation significative de la fréquence des aberrations chromosomiques et des micronoyaux chez les rats exposés, juvéniles ou matures, avec une fréquence plus élevée chez les animaux jeunes.

L'étude de Saran (Saran et *al.*, 2007) n'a exposé des souris transgéniques présentant une sensibilité accrue au développement de tumeurs que pendant 5 jours. Il serait nécessaire de conforter ces données avec d'autres études, présentant notamment un début d'exposition prénatale.

Par conséquent, les éléments de preuve disponibles ne permettent pas de conclure à l'existence ou non d'un effet cancérigène ou co-cancérigène chez l'animal

En conclusion, les données disponibles ne permettent pas de conclure à l'existence ou non d'un effet cancérigène des RF chez l'enfant.

De plus, le rapport publié par l'ANSES en 2013 sur les effets des RF sur la santé mentionne un effet possible des RF sur l'apparition des gliomes pour les utilisateurs « intensifs » de téléphone mobile, c'est-à-dire ayant cumulé plus de 1640 heures d'exposition. Dans la mesure où les tumeurs de l'enfant ne sont pas comparables aux tumeurs de l'adulte, les conclusions de ce rapport sont difficilement extrapolables à l'enfant. Cependant, il ne permet pas d'exclure que les enfants exposés ne développeront pas de tumeurs ultérieurement. Les résultats de l'étude Mobi-kids sont, dans ce contexte, particulièrement attendus.

1.6. Conclusion générale

Les données disponibles montrent une généralisation des nouvelles technologies utilisant les RF chez les enfants et les adolescents. En effet, en plus des nombreux jouets connectés sur le marché, les enfants possèdent leur propre téléphone mobile de plus en plus précocement.

Grâce aux modélisations numériques de l'exposition de la tête, il a été démontré que, pour des raisons anatomiques ou liées aux propriétés diélectriques des tissus jeunes ou immatures, les enfants

peuvent être davantage exposés que les adultes, en particulier au niveau des aires cérébrales les plus proches de la boîte crânienne.

Concernant les études sur les effets sanitaires des RF sur les enfants, les données actuelles ne permettent pas de conclure à l'existence ou non d'un effet sur :

- Le comportement ;
- Les effets tératogènes et le développement ;
- Les effets cancérogènes.

Cependant, les données actuelles permettent de conclure à un effet possible des RF chez l'enfant sur les fonctions cognitives.

2. Recherche des mécanismes de neurotoxicité

2.1. La réponse cellulaire dans le cerveau

Dans le contexte des RF, les chercheurs se sont intéressés à la mort cellulaire cérébrale, en particulier neuronale, lors d'un effet de type stress oxydant, d'une altération des taux intracellulaires de calcium, d'une réponse inflammatoire et/ou d'un effet sur la perméabilité de la BHE. Ces mécanismes pourraient s'accompagner une dégénérescence neuronale et/ou d'une mort par apoptose.

2.1.1. Nombre, morphologie des neurones et mort cellulaire

En 2009, le rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) ne met pas en évidence d'effet délétère des RF sur le nombre et la morphologie des neurones et la mort cellulaire neuronale. Des travaux complètent et confirment ces résultats sur l'apoptose *in vitro* (Terro et *al.*, 2012).

Les études menées sur la maturation et la morphologie des neurones montrent un effet transitoire sur le nombre de neurites *in vitro* (Del Vecchio et *al.*, 2009). Toutefois, cet effet n'a pas eu d'impact sur leur croissance ou leur nombre final.

Différentes recherches ont porté sur les effets *in vitro* d'une exposition à un signal RF sur divers types de cellules cérébrales tels que des astrocytes ou des cellules de gliome. Une exposition jusqu'à 24 heures n'affecte aucun des paramètres de viabilité, d'intégrité cellulaire ou encore d'apoptose et ceci à un DAS élevé ($> 5 \text{ W/kg}$) (Liu YX et *al.*, 2012 ; Zeni et *al.*, 2012). Cependant, lorsque l'exposition est prolongée à 48 heures, les résultats montrent une altération de la croissance, de la prolifération et de la morphologie des astrocytes ainsi qu'une mort cellulaire de type apoptotique. Le DAS élevé ne permet pas d'exclure des effets thermiques.

Des études se sont intéressées au nombre de neurones. Deux études suggèrent qu'une exposition sub-chronique à un signal continu à 900 MHz pourrait affecter le nombre total de neurones et induire une dégénérescence dans le cervelet et l'hippocampe chez la rate adulte (Bas et *al.*, 2009 ; Somnez et *al.*, 2010). Concernant l'apoptose, les études actuelles présentent des résultats divergents. L'une montre une diminution du nombre de neurones apoptotiques après une exposition à un signal GSM 900 MHz pendant 10 mois alors que l'autre plutôt une augmentation après une exposition à un signal de type CDMA

pendant 3 mois (Dasdag et *al.*, 2009 ; Maskey et *al.*, 2010). De plus, ces résultats ne sont pas soutenus par les résultats *in vitro* obtenus avec des DAS inférieurs à 4 W/kg.

En l'absence de travaux complémentaires, il est difficile de conclure sur l'existence, ou non, d'un effet biologique des RF sur la mort cellulaire des neurones.

2.1.2. Calcium et plasticité cellulaire

Sous sa forme ionique, le calcium est un élément fondamental. Il contrôle de nombreuses fonctions cérébrales par son implication dans la signalisation intracellulaire. En effet, par ses flux transmembranaires, il agit notamment dans le transport mitochondrial, la libération de neurotransmetteurs, la génération des potentiels d'action, l'intégrité de la membrane cellulaire et leur perméabilité en impliquant l'activité d'enzymes. Son action s'effectue par l'intermédiaire de protéines liant le calcium telles que la calbindin D28-k ou la calrétinine. Par ailleurs, le calcium est un régulateur important de la dégénérescence et de la survie neuronale. Il est fortement impliqué dans l'activité synaptique, en particulier dans les mécanismes d'apprentissage et de mémoire.

Tous les mécanismes impliqués dans la plasticité cérébrale sont très dépendants d'un maintien de l'homéostasie calcique. La plasticité cérébrale regroupe l'ensemble des mécanismes par lesquels le cerveau se modifie par l'expérience et les apprentissages et qui conduit à des changements morphologiques et structuraux au sein de réseaux de neurones concernés. Ainsi, elle donne au cerveau la capacité de créer, défaire ou réorganiser les réseaux neuronaux et leurs connexions. Présente tout au long de la vie, elle est maximale pendant le développement.

Au niveau cellulaire, il existe deux formes de plasticité synaptique en réponse à une stimulation neuronale :

- La LTP pour Long Term Potentiation (augmentation) ;
- La LTD pour Long Term Depression (diminution).

Celles-ci rendent compte des modifications de l'efficacité de la transmission synaptique suite à une stimulation. La LTP et la LTD sont considérées comme des modèles cellulaires responsables du traitement de l'information par un réseau neuronal et mettent en jeu des voies de signalisations intracellulaires impliquant, notamment au niveau du neurone post-synaptique, les récepteurs au glutamate de type NMDA et les flux de calcium qui y sont associés, ainsi que des kinases, dont bon nombre sont calcium-dépendantes.

Il a été supposé mais non démontré que les RF pourraient avoir un impact sur la plasticité cérébrale, sur les voies de signalisation intracellulaires au travers de changements de la distribution ionique, la fluidité membranaire ou la perméabilité des membranes cellulaires aux ions Ca^{2+} . De même, il a été suggéré des effets possibles des radiofréquences sur la plasticité à long terme dans l'hippocampe pouvant rendre compte de déficits d'apprentissage et de mémorisation et plus généralement de déficits cognitifs. Cependant, aucune étude sur ce sujet n'a été réalisée.

Deux études *in vivo* chez la souris ont montré un effet des RF sur les protéines liant le calcium. La première étude montre soit une augmentation, soit une diminution, soit une absence de modification de l'intensité du marquage en fonction de la sous-région de l'hippocampe considérée, de la protéine étudiée, de la durée d'exposition et de l'intensité du signal. L'hétérogénéité de ces résultats qui ne permet pas de

conclure sur l'impact de l'exposition aux RF (Maskey et *al.*, 2010a). La seconde étude montre plus clairement une baisse du marquage de la calbindine D28-K dans l'hippocampe après une exposition chronique (Maskey et *al.*, 2010b). En revanche, les conséquences physiologiques de cette diminution n'ont pas été étudiées. L'étude des effets des RF sur la plasticité cérébrale au niveau cellulaire montre que l'effet majeur observé est un effet lié au stress de contention dans le système d'exposition et qu'une exposition aiguë à un DAS de 2 W/kg n'affecte pas la plasticité cérébrale. Ce n'est que pour des valeurs de DAS de 10 W/Kg qu'un effet est observé (Prochnow et *al.*, 2011). Ces données mettent en avant le rôle important du stress dans ce type d'expériences qui, le plus souvent, n'est pas pris en considération.

2.2. Stress oxydant dans le cerveau

Le cerveau est particulièrement sensible au stress oxydant. En effet, il consomme beaucoup d'oxygène et l'activité des enzymes anti-oxydantes cérébrales est faible par rapport à celle des autres organes. Un dérèglement des systèmes de protection ou une augmentation de la production radicalaire conduisent à un stress oxydant pouvant être délétère. Il est donc important de vérifier si les RF peuvent ou non modifier la quantité d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules ou les organismes vivants exposés.

Des chercheurs ont exposé des neurones primaires de rats nouveau-nés à des RF de type GSM 1 800 MHz pendant 24 h, avec cycles alternant 5 min « on » et 10 min « off » (Xu et *al.*, 2010). Le DAS était de 2 W/kg. La température a été mesurée et maintenue à 37°C dans un incubateur. Les analyses ont porté sur les niveaux d'oxydation de l'ADN en recherchant la présence d'une forme oxydée de la guanine (la 8-hydroxyguanine (8-OHdG)). Ils se sont intéressés à l'ADN mitochondrial et ont montré, après exposition :

- Une augmentation significative de la production de ROS ;
- Une augmentation significative de la 8-hydroxyguanine (un marqueur d'oxydation de l'ADN) ;
- La présence de 8-OHdG co-localisée avec un marqueur spécifique aux mitochondries ce qui laisse supposer que seul le génome mitochondrial est touché, mais pas l'ADN nucléaire ;
- Une modification dans la transcription des gènes codés par le génome mitochondrial, liée sans doute à une baisse du nombre de copies de cet ADN auxiliaire
- Qu'un prétraitement à la mélatonine, 4 heures avant l'exposition, empêche les effets délétères de l'exposition.

L'ADN mitochondrial est particulièrement sensible au stress oxydant en raison d'un défaut de protéines protectrices de type histones, d'une capacité de réparation réduite et de la proximité de la chaîne respiratoire dans la membrane interne de la mitochondrie.

Une étude *in vivo* montre qu'une exposition chronique allant de 1 à 7 mois chez des souris âgées avec un DAS inférieur ou égal à 1,05 W/kg peut avoir un effet bénéfique sur divers marqueurs de stress oxydant (Arendash et *al.*, 2010). Cet effet est en lien avec l'amélioration des performances cognitives. Des résultats similaires sont retrouvés dans une étude qui montre une augmentation des capacités antioxydantes du cerveau de souris et une baisse des marqueurs d'apoptose après une exposition chronique de 10 mois chez le rat (Dasdag et *al.*, 2009). En revanche, chez le lapin, les résultats mettent en évidence une augmentation de l'oxydation de l'ADN dans le cerveau des femelles exposées et non des nouveaux-nés exposés *in utero* (Guler et *al.*, 2010).

Il est possible que les effets observés puissent s'expliquer par la sensibilité des modèles biologiques utilisés. En effet, il est connu que les capacités anti-oxydantes des neurones sont plus limitées

que celles d'autres types cellulaires et que le cerveau immature possède des mécanismes de défense réduits contre le stress oxydant. De même, le modèle expérimental utilisant le lapin pourrait représenter une sensibilité particulière aux effets des RF, par rapport aux modèles rongeurs rat et souris et qui devra être confirmée.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une exposition aux RF pourrait favoriser l'oxydation de l'ADN et en particulier celle de l'ADN mitochondrial. D'autres données *in vivo* et *in vitro* suggèrent cependant une absence d'effet de type stress oxydant, voire même un effet inverse améliorant certains paramètres caractérisant le stress oxydant. Ceci pourrait être particulièrement vrai dans des conditions dans lesquels le niveau de stress oxydant cérébral est élevé (vieillesse, pathologies neurodégénératives).

2.3. Expression des protéines de choc thermiques et autophagie impliquant des protéines chaperonnes

Les molécules chaperonnes sont une catégorie de molécules participant aux systèmes de défense des cellules. Parmi celles-ci, on retrouve les protéines de choc thermique heat shock protein (HSP) ou heat shock cognate proteins (HSC), appelées également protéines de stress.

Les protéines de choc thermique sont des protéines constitutives de la régulation des fonctions physiologiques normales, mais qui peuvent être induites en réponse à un stress cellulaire. Elles interviennent dans de nombreux mécanismes :

- La facilitation de la synthèse protéique ;
- Le repliement des protéines prévenant ainsi leur agrégation ;
- Le transport des protéines ;
- La transmission synaptique ;
- La mort cellulaire ;
- L'autophagie ;
- La synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

De plus, elles auraient également un rôle protecteur/thérapeutique dans diverses pathologies neurologiques, notamment par leur faculté à réduire l'agrégation de certaines protéines pathologiques et à promouvoir le repliement des protéines anormalement conformées.

Ces protéines très nombreuses appartiennent à différentes familles et sous-familles en lien avec leur poids moléculaire et leur fonction. Ainsi, les plus étudiées dans le SNC sont les HSP70, 40 et 90 dont l'expression est ubiquitaire, l'HSP60 localisée plutôt dans les mitochondries et les HSP27 et 25 exprimées principalement dans la glie.

L'autophagie est un processus de dégradation des cellules eucaryotes utilisant les lysosomes, un organites cellulaires présents dans le cytosol. De ce fait, elle dégrade les constituants cytoplasmiques incluant les macromolécules et les organelles. Il existe trois voies principales d'autophagie, à savoir la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie impliquant des molécules chaperonnes ou chaperone-mediated autophagy (CMA). Cette dernière implique la formation de complexes avec des protéines chaperonnes, notamment l'HSC70 ou les HSP40 et 90.

Les données disponibles ne montrent pas d'effet des RF sur l'expression *in vitro* de différentes protéines de stress en l'absence d'élévation de la température (Terro et *al.*, 2012). Les résultats d'une étude chez le rat à divers âges du développement postnatal arrivent à la même conclusion (Watilliaux et *al.*, 2011).

2.4. Expression de gènes à réponse précoce

Les gènes à réponse précoce, également appelés proto-oncogènes, appartiennent à une famille de gènes activés transitoirement et rapidement en réponse à une grande variété de stimuli cellulaires, avant toute synthèse de nouvelles protéines. Ils se différencient des gènes tardifs qui seront activés ultérieurement, après la synthèse des produits des gènes précoces.

Il existe une quarantaine de gènes précoces dont les plus connus et caractérisés sont c-fos, c-myc et cjun. Ils correspondent à des gènes homologues aux oncogènes rétroviraux impliqués dans la croissance ou la différenciation cellulaire, ainsi que dans de nombreux autres processus cellulaires. L'expression de certains de ces gènes, en particulier c-fos, est utilisée comme marqueur de l'activation cellulaire. De plus, l'immunohistochimie des protéines correspondantes est une technique qui permet de réaliser une cartographie anatomo-fonctionnelle de l'implication des différentes régions ou sous-régions cérébrales en réponse à un stimulus.

In vitro, les résultats ne montrent aucune augmentation de gènes précoces (c-fos et c-jun)(Del Vecchio et *al.*, 2009). Si des augmentations de l'expression du gène c-fos ont été observées *in vivo*, il n'est pas possible de les attribuer avec certitude aux effets des RF seules, l'impact d'effets autres comme les conditions expérimentales liées au système d'exposition pourraient y avoir largement contribué (Jorge-Mora et *al.*, 2011; Mori et Arendash, 2011).

A ce jour, aucune donnée expérimentale ne permet de conclure qu'une exposition aiguë ou chronique aux RF affecte de manière significative l'expression de gènes précoces.

2.5. La réponse neuro-inflammatoire

La réponse neuro-inflammatoire implique les astrocytes et la microglie, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines IL-1 et IL-6, et le TNF α (tumor necrosis factor alpha), ainsi que d'autres médiateurs comme les prostaglandines ou les neurotrophines.

La réponse inflammatoire cérébrale peut être caractérisée par :

- Une astrocytose réactionnelle marquée par une hypertrophie et une hyperplasie des astrocytes et une surexpression de la GFAP
- Une microgliose caractérisée par une activation des cellules de la microglie, entraînant des modifications de leur morphologie, ainsi que la libération de divers radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'autres médiateurs comme les prostaglandines ou les neurotrophines.

L'ensemble des données obtenues permettent de conclure qu'une exposition aiguë ne semble pas affecter divers marqueurs d'activation gliale ou la production de cytokines pro-inflammatoire (Finnie et Cai et *al.*, 2010 ; Watilliaux et *al.*, 2011; Bouji et *al.*, 2012). Lors d'une exposition subchronique ou chronique (2 à 3 mois), les résultats montrent une augmentation de la GFAP pouvant signifier une astrogliose (Ammari et *al.*, 2010 ; Maskey et *al.*, 2010b). Cependant, l'astrogliose ne semble être que

transitoire pour un DAS aux alentours de 1,5 W/kg que tel que l'avaient précédemment observé Brillaud et *al.* (2007) après une exposition aiguë à un DAS de 6 W/kg.

Une exposition *in vitro* de cellules microgliales à un DAS élevé de 6 W/kg semble également pouvoir déclencher une réponse inflammatoire mais pas pour un DAS inférieur à 2 W/kg (Yang 2010 ; Hirose et *al.*, 2010). De plus, à 6 W/kg des effets thermiques ne peuvent être exclus.

Partie 2 : Matériels et Méthodes

1. Modèle in vitro de culture primaire de cellules souches neurales

Un modèle de culture de cellules souches neurales (NSCs) de souris en monocouche a été utilisé pour les différentes études réalisées. Le protocole utilisé correspond au protocole modifié de Delgehyr et collaborateurs (Delgehyr et al., 2015).

1.1. Modèle animal, éthique et stabulation

Les souris utilisées sont de fond génétique C57BL/6Jrj provenant de l'élevage Janvier® (Le Genest St Isle, France). Toutes les expérimentations réalisées sont en accord avec la réglementation de l'Union Européenne sur la protection des animaux expérimentaux (Directive européenne 2010/63/UE) et suivent les lignes directrices de la règle des 3R sur le bien-être animal. Les souris sont hébergées dans une unité animale conventionnelle où les paramètres physiques sont contrôlés (température, photopériode, hygrométrie). Elles reçoivent de la nourriture et de l'eau *ad libitum*.

1.2. Préalable à la culture

La culture primaire de NSCs est obtenue à partir de cerveaux de souriceaux âgés de 1 à 5 jours. A cet âge, le cerveau contient un pool important de NSCs à croissance rapide et à meilleure capacité de différenciation. La mise en culture des NSCs est ajustée au nombre d'animaux obtenus. Les NSCs se différencient majoritairement par défaut en épendymocytes (à 70-80%), au bout de 15 jours de culture dans un milieu dépourvu de sérum de veau fœtal (SVF, GE Healthcare HyClone™). Dans un milieu contenant 10% de SVF, les NSCs se différencient en neuroblastes, en oligodendrocytes, et en astrocytes. Le milieu de culture utilisé est le milieu Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) contenant 4500 mg de glucose (DMEM GLutamax-I, SIGMA D5671) Il est enrichi extemporanément par un mélange d'antibiotiques contenant de la pénicilline G, et de la streptomycine (1% du volume final à 1000 unités/mL, GIBCO 15070-063), de la L-Glutamine (1 % du volume final, 2mM, GIBCO 25030-024) et de 10% de SVF. Le SVF, stérile et décomplémenté, apporte des facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF), des facteurs d'adhésion (fibrinectone, etc.) et des inhibiteurs (α 1-antitrypsine, etc.).

L'incubateur permet le suivi des différents paramètres physico-chimiques nécessaires à la croissance cellulaire : température (37°C) et hygrométrie (85% d'humidité). De plus, le pH est maintenu à 7,4 grâce au système tampon du milieu et à une atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

Préalablement à la culture et pour faciliter l'attachement des NSCs à leur support de culture, un nombre adéquat de flasques (1 flasque par cerveau) et de boîtes de Pétri est couvert d'une solution de tampon borate pH9 contenant de la poly-L-lysine 1X (PLL, 5µg/mL, BD Biosciences). Les flasques et les boîtes de Pétri sont incubées pendant 1 heure à 37°C puis rincées 3 fois avec de l'eau stérile. Elles sont ensuite laissées à sécher sous hotte au minimum 2 heures.

1.3. Dissection et mise en culture

Après décapitation du nouveau-né, la peau et la boîte crânienne sont retirées. La découpe de la boîte crânienne est effectuée à partir du point lambda le long de la suture sagittale, puis au niveau des sutures coronale et lambdoïde afin de faciliter l'accès au cerveau (Figure 36A). Le cerveau est extrait de la boîte crânienne en sectionnant les nerfs. Il est ensuite déposé dans un milieu de Hank's modifié (HBSS, SIGMA H6648 + 1% Hepes 1M, SIGMA H3537 + 1% bicarbonate de sodium + 1% d'antibiotiques P/S).

La microdissection du cerveau débute par le retrait des BO, du cervelet et du bulbe rachidien (Figure 36B). Le septum inter-hémisphérique est retiré. Dans chaque hémisphère, diverses structures sont enlevées, à savoir le télencéphale (hippocampes), le diencéphale (thalamus, hypothalamus) et le plexus choroïde, pour ne conserver que le cortex et les zones ventriculaires (Figure 36C). Pour terminer, les méninges sont retirées.

Les hémisphères coupés en morceaux sont placés dans un tube Falcon de 15 mL additionné de 2 mL de milieu de dissection (1 tube/animal). Après une centrifugation de 1 minute à 110 g et à 4°C, le surnageant est retiré puis 1mL d'une solution enzymatique, dite de digestion, est ajouté par tube (3% de papaïne, 39.2mg/mL, Worthington 3126 + 2.4% de L-Cystéine, 12mg/mL, SIGMA C7352 + 3% de DNase-I, 10mg/mL, SIGMA DN-25 dans du DMEM. Une incubation à 37°C de 30 à 45 minutes est réalisée, puis les tubes sont centrifugés pendant 1 minute à 110 g et à 4°C puis 1 mL d'une solution dite STOP est ajouté (2% de DNase-I dans du milieu Leibowitz L-15, SIGMA L552). Une brève centrifugation de 1 minute à 110 g et à 4°C est réalisée, puis le surnageant est retiré. Le culot obtenu est rincé avec 1mL de milieu Leibowitz L-15 (Liebowitzs L-15 medium, SIGMA L5520), puis centrifugé pendant 5 minutes à 110 g et à 4°C. Après retrait du surnageant, le culot est doucement dissocié mécaniquement avec 1 mL de milieu DMEM complet. La suspension cellulaire est transférée dans une flasque de 25 cm² préalablement recouverte de PLL et contenant 5 mL de milieu DMEM complet (Figure 36D). Le milieu est changé le lendemain pour enlever les débris cellulaires.

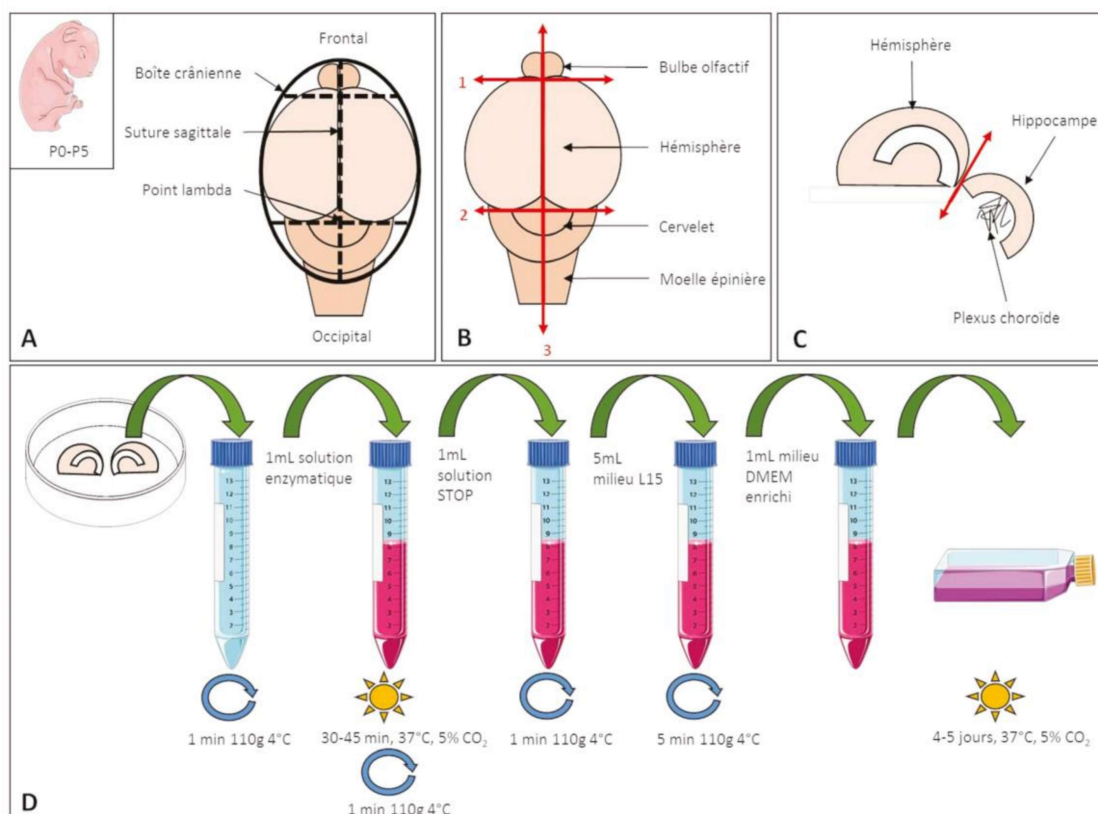


Figure 36 : Dissection et mise en culture (d'après la thèse de Justyne Feat, 2018).

- (A) *Dissection de la boîte crânienne : découpe à partir du point lambda le long de la suture sagittale*
 (B) *Microdissection du cerveau : 1 – Retrait des bulbes olfactifs ; 2 – Retrait du cervelet ; 3 – Séparation des hémisphères*
 (C) *Microdissection du cerveau : retrait de l'hippocampe, du télencéphale, du diencephale, du plexus choroïde et des méninges*
 (D) *Mise en culture*

1.4. Repiquage et différenciation

Lorsque les cellules sont à confluence, à 4-5 jours après la mise en culture, les flasques sont fortement secouées par agitation rotative à 250 rpm, toute une nuit à température ambiante. Cette étape permet de détacher les cellules déjà différenciées (oligodendrocytes, astrocytes, neuroblastes) et de récupérer uniquement les NSCs encore attachées au fond de la flasque. Cette récupération se fait après 3 rinçages des flasques, avec du tampon Dulbecco's phosphate-Buffered salin (DPBS, SIGMA D8537). Pour chaque flasque, 1 mL de 0.05% Trypsine-EDTA (1X, GIBCO 25300-054) est ajouté et une incubation de 20 minutes est faite à 37°C. Une fois toutes les cellules décollées, 1mL de DMEM complet est ajouté afin d'inhiber l'action de la trypsine par la présence du SVF. Après numération cellulaire, la suspension cellulaire est centrifugée 7 minutes à 110 g et à 4°C. Jusqu'à 6 suspensions cellulaires peuvent être regroupées pour une homogénéisation des cultures à venir. Cette étape permet de s'affranchir de la composante individuelle, chaque boîte de Pétri contenant le même mélange cellulaire. Le culot est donc re-suspendu dans un volume de milieu DMEM complet pour obtenir le nombre de cellules désiré par boîte. Le jour suivant, le milieu de culture est changé avec du milieu DMEM complet. Un minimum de 7

jours est nécessaire pour une différenciation neurogliale. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours.

2. Exposition aux radiofréquences

Des expositions à un signal RF le plus proche possible d'une exposition du téléphone portable chez l'Homme ont été réalisées avec un signal de téléphonie mobile de type 2G. Les niveaux ont été transposés à partir des niveaux *in vivo* des fœtus de l'étude de Petitdant et *al.* 2018. Le DAS de 83 mW/kg est environnemental parce que ce niveau est attendu dans les cellules souches du cerveau chez le fœtus lorsque la mère porte un téléphone ou un ordinateur portable connecté proche du ventre. Le DAS de 2 W/kg sur cellules souches est supérieur aux niveaux attendus dans les cellules souches du cerveau chez le fœtus de femme enceinte exposée dans les limites de l'ICNIRP pour le corps entier ou les expositions locales.

2.1. Installation

L'exposition est réalisée dans un système d'exposition *in vitro* par Wire Patch Cell (WPC). Ce concept basé sur une antenne filaire à 900 MHz a été développé par XLIM en accord avec la publication de Laval et *al.* (2000). Une antenne de 15 x 15 x 2,9 cm a été conçue pour fonctionner avec huit échantillons biologiques placés à l'intérieur du système (Figure 37).

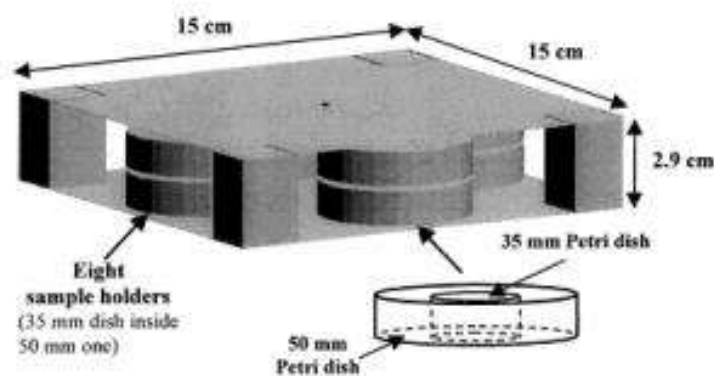


Figure 37 : Système d'exposition par Wire Patch Cell (d'après Laval et al., 2000).

Les avantages d'un tel système sont multiples :

- Il permet l'exposition simultanée de 8 échantillons ;
- Il est constitué de matériaux neutres par rapport aux RF. Ces matériaux ont un impact négligeable sur la dosimétrie ;
- Les performances métriques du système ont été optimisées, que ce soit pour l'homogénéité du champ électrique, son isotropie, ainsi que l'uniformité du DAS et son efficacité.

Ainsi, le signal RF provenant d'un générateur (*GSM Simulator*), est amplifié (*RF Amplifier*) et enfin introduit dans le système par le biais d'une antenne. Le système s'intègre dans un incubateur à CO₂ et comprend un système ON pour exposer les cellules et un système OFF pour le groupe sham (intégré dans le même incubateur).

Le signal est un signal GSM de type 2G à la fréquence de 900 MHz avec un DAS = 0,083 W/kg ou 2,155 W/Kg pour les groupes exposés ou 0 W/kg pour le groupe sham.

2.2. Dosimétrie

Elle a été réalisée par XLIM et sera brièvement décrite. La puissance du champ électrique a été déterminée à partir d'une dosimétrie numérique et expérimentale (estimation du DAS).

La dosimétrie numérique a été réalisée avec la méthode FDTD (finite difference time domain) qui se base sur la découpe de l'espace en cubes et sur la résolution d'équations de Maxwell dans ce maillage. Ces équations, au nombre de quatre, modélisent mathématiquement les interactions entre charges électriques, courants électriques, champs électriques et champs magnétiques. Ainsi, un DAS est calculé au centre de chaque cellule d'1 mm de côté (représentant un des paramètres cités au-dessus).

La dosimétrie expérimentale a été réalisée pour valider le DAS dans des modèles cellulaires. Pour cela, le DAS est mesuré sur un cas simplifié. Dans notre cas, la modélisation numérique a été validée en utilisant 8 boîtes de Petri de 35 mm contenant chacune 3 mL de milieu. Après la fin de chaque essai, les valeurs de DAS expérimentales au centre des boîtes de Pétri sont calculées. Les résultats de l'évaluation expérimentale montrent une excellente correspondance pour trois des quatre boîtes de Pétri (Figure 38A). L'explication la plus évidente pour la déviation est une non-symétrie de la configuration, en plus de l'incertitude de mesure, estimée jusqu'à 30%. Par conséquent, la qualité de l'exposition est fortement dépendante de la symétrie. La moyenne des quatre mesures conduit à une valeur de DAS expérimental d'environ 460 mW/kg. Les résultats numériques et expérimentaux sont ensuite comparés. En dépit d'une incertitude de mesure élevée (30%), les résultats montrent un bon accord avec les valeurs numériques (Figure 38B).

35 mm dishes	A dish	B dish	C dish	D dish
SAR values at the bottom center of the dish	360 mW/kg	495 mW/kg	490 mW/kg	497 mW/kg

A

A 35 mm dish	Numerical results (FDTD code)	Experimental results
SAR values at the center of the dish	510 mW/kg	460 mW/kg
Maximum deviation	± 67 mW/kg (13%)	± 61 mW/kg (13%)

B

Figure 38 : Dosimétrie expérimentale et expérimentale (d'après Laval et al., 2000).

- (A) Comparaison des valeurs expérimentales du DAS effectuées au bas de chaque boîte de Pétri à l'étage supérieur. Les valeurs de DAS sont normalisées à 1 W de puissance d'entrée.
- (B) Comparaison entre l'expérimentation et la simulation effectuée en son centre pour 3 mL de milieu. Les valeurs de DAS sont normalisées à une puissance d'entrée de 1 W. L'écart maximal est calculé à partir de la valeur de DAS moyenne évaluée à partir des mesures effectuées à différentes positions horizontales.

L'amplificateur doit fournir une puissance de 31,6 W pour détecter une augmentation de 1°C de la température.

La différence entre la dosimétrie numérique et expérimentale est évaluée à 11% et est jugée acceptable. Les différents écarts entre les différents résultats expérimentaux et numériques peuvent être expliqués par les difficultés expérimentales. Tout d'abord, l'une des raisons essentielles est le faible

rapport signal/bruit. L'augmentation induite par la température est dans la gamme du bruit thermique inhérent au système de mesure (sonde Luxtron). En outre, malgré une résolution spatiale suffisante de la sonde, la répartition spatiale du DAS est extrêmement non homogène en fonction de la position verticale. Enfin, les effets thermiques (conduction et convection) du milieu ne sont pas pris en compte dans le code numérique.

2.3. Protocole d'exposition

Les cellules sont exposées 3 ou 7 jours à un DAS de 0,083 W/kg ou 2,155 W/kg pour les groupes exposés et 0 W/kg pour le groupe sham. L'exposition est arrêtée tous les 2 jours pour renouveler le milieu. A la fin de cette d'exposition, une partie des cellules est immédiatement fixée pour réaliser des tests biologiques. L'autre partie est maintenue jusqu'au jour 10 pour permettre aux cellules de se différencier. Seuls les tests biologiques sont réalisés à l'aveugle (Figure 39).

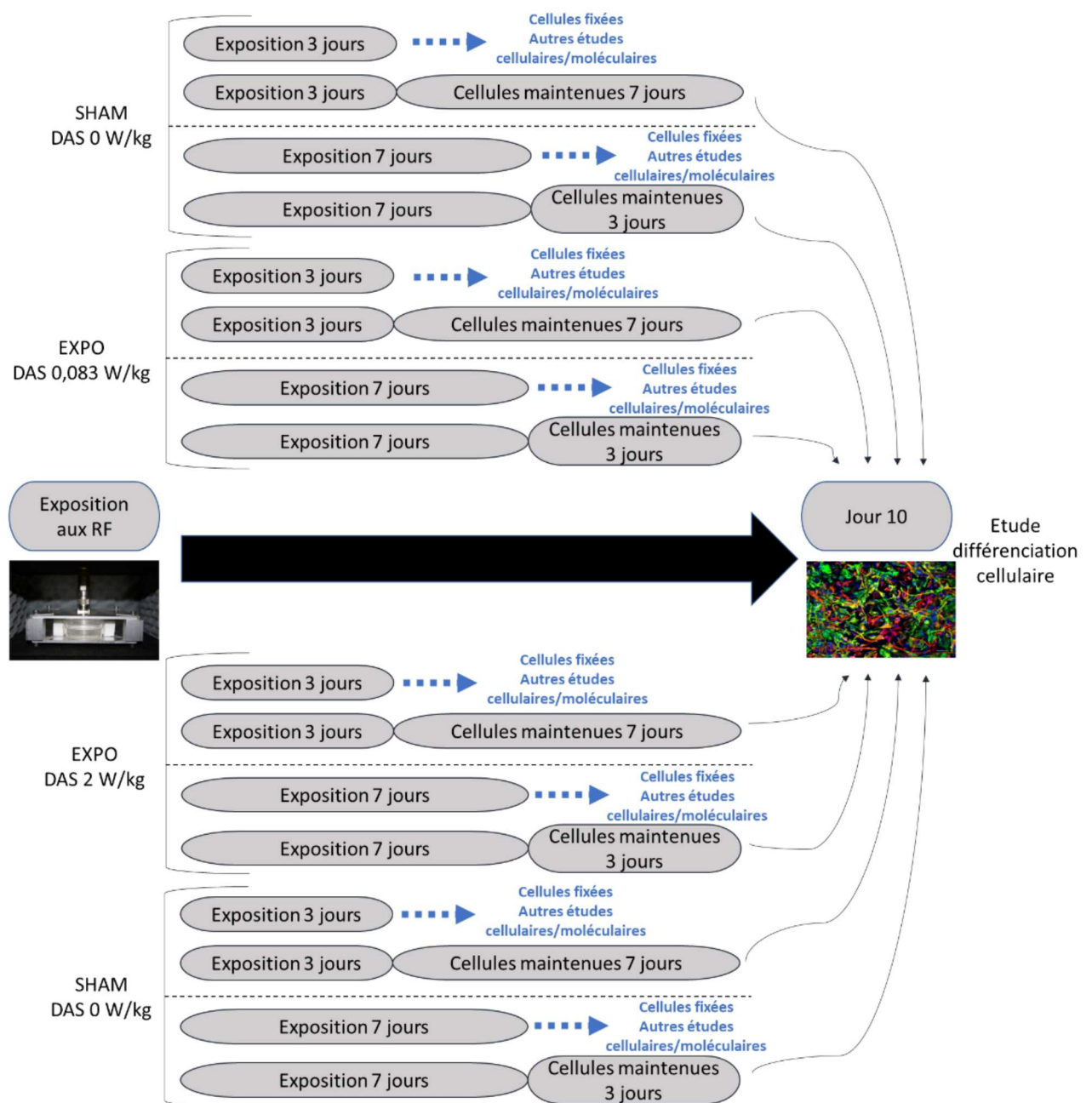


Figure 39 : Protocole d'exposition

3. Choix du DAS

Ces niveaux de DAS ont été choisis pour plusieurs raisons :

- Les deux valeurs se rapportent aux limites imposées par le décret Français selon les recommandations de l'Union Européenne. Au niveau de la tête, la limite de DAS est de 2 W/kg (calculée en se rapportant à 10 grammes de tissus superficiels). Pour l'exposition de l'intégralité du corps humain, le seuil est de 0,08 W/kg, dont la moyenne se rapporte à l'organisme entier.
- Nous avons posé l'hypothèse selon laquelle un DAS « élevé » augmenterait la probabilité d'obtenir une réponse biologique et permettrait d'identifier si les ondes RF interféraient avec le tissu vivant.
- Ces deux valeurs sont retrouvées dans notre environnement.
- Ces valeurs sont dans la transposition des travaux *in vivo* réalisés dans les travaux *in vivo* réalisés dans le laboratoire (Petitdant et al., 2018). Lors de cette étude, les niveaux moyens pour les fœtus étaient de 1,5 et 6 W/kg. A ces niveaux d'exposition durant toute la gestation, la descendance présentait des modifications comportementales significatives mesurables à l'adolescence.
- Ces deux valeurs permettent de comparer nos résultats avec les résultats *in vitro* obtenus précédemment dans la littérature (Eghlidospour et al., 2015 ; Chen et al., 2014 ; Delvecchio et al., 2009).

4. Immunocytochimie

4.1. Principe

La technique d'immuno-cytochimie permet la mise en évidence de certains antigènes cellulaires, qu'ils soient membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires, spécifiques d'un type ou d'une fonction cellulaire. Cette technique est basée sur une réaction antigène-anticorps où le complexe antigène-anticorps formé est rendu visible et localisable par un fluorochrome. L'immuno-marquage utilisé lors de cette étude est indirect. L'antigène est reconnu par un anticorps primaire lui-même reconnu par un anticorps secondaire, d'espèce différente, conjugué à un fluorochrome.

4.2. Protocole

Au préalable, le repiquage (2.10^5 cellules/20 μ L par lamelle) avait été réalisé en boîte de Pétri 35 mm contenant chacune 4 lamelles « coatées » avec de la PLL. Les cellules ont été repiquées à haute densité, ce qui est indispensable à l'obtention d'une population de cellules différenciées. Au lendemain du repiquage, le milieu de culture DMEM enrichi a été remplacé par du milieu DMEM enrichi de SVF. Au terme du temps d'exposition ou de l'expérience dans son ensemble, l'immunocytologie a été réalisée comme suit. Les lamelles ont été rincées trois fois avec du tampon Tris-Buffer Saline 1X (TBS, pH 7,6, Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM). Les cellules ont été ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 10 minutes à température ambiante. Après des étapes de rinçages au TBS1X, les lamelles ont été incubées avec une solution de TBS1X contenant 10% de SVF, 0,20% de TritonX-100 (Euromedex, ref 2000-A) et 2% d'albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin, BSA Fraction V, ICN Biomedicals, ref 9048-46-8) pendant 15 minutes à température ambiante. Cette étape de perméabilisation/saturation permet la perforation des membranes cellulaires par le Triton et donc l'entrée des anticorps, ainsi que la saturation des sites non spécifiques par la BSA. Les lamelles ont ensuite été incubées toute une nuit à température ambiante dans une chambre noire humide, avec différents anticorps primaires utilisés pour mettre en

évidence des marqueurs spécifiques de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Tableau 3). Les lamelles ont été rincées trois fois avec du TBS1X et incubées avec des anticorps secondaires appropriés (anti-lapin, anti-souris ou anti-rat Alexa-488 ou TRITC-conjugué) pendant 45 minutes à température ambiante, dans une chambre noire humide, dans une solution de TBS1X contenant 2% de BSA et 10% de SVF. Les lamelles sont rincées avec du TBS1X puis les noyaux des cellules sont contre-colorés avec un intercalant de l'ADN, le 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Les lamelles ont été montées sur lames de microscope à l'aide du milieu de montage Fluoromount-G® (Southern Biotech). Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence Leica DM6000B et elles sont photographiées à l'aide du logiciel Metamorph® au grossissement 20x, 40x à immersion (Figure 40).

Une analyse quantitative de chaque condition a été effectuée sur 4 lamelles minimum pour chaque combinaison d'anticorps primaires. Les images de 5-6 champs par lamelles ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ®. Ces analyses ont été réalisées en aveugle sur images anonymées. Pour chaque condition et chaque expérience, une moyenne de 200 cellules a été analysée par image. La moyenne des valeurs a été calculée sur l'ensemble des champs pour obtenir une valeur unique pour chaque condition. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du groupe sham.

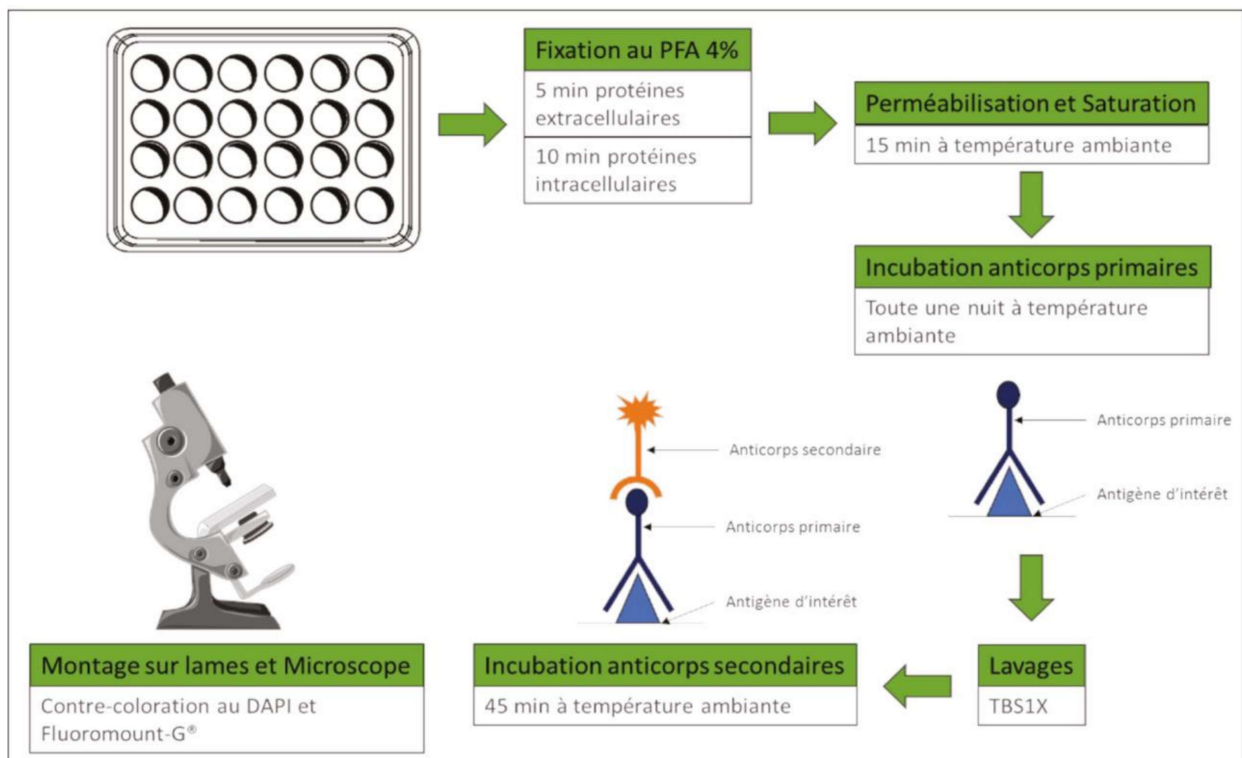


Figure 40 : Protocole de l'immunocytochimie (d'après la thèse de Justyne Feat, 2018).

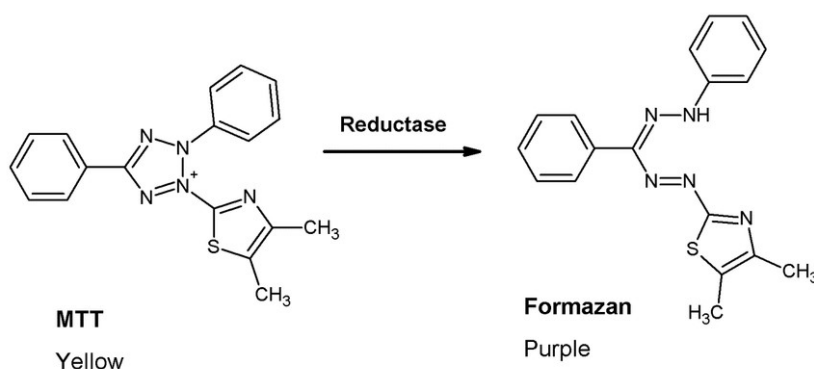
Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés en immunocytochimie et concentration d'utilisation.

Noms	Dilution	Isotype/Espèce	Fournisseur	Marquage
Anti-Ki67	1 :500	Polyclonal IgG lapin	ABCAM ab15580	Prolifération cellulaire
Anti-Nestin	1 :500	Monoclonal IgG1k souris	ABCAM ab11306	Cellule B1 et C Différenciation cellulaire
Anti-GFAP	1 :500	Polyclonal IgG lapin	DAKO	Cellule B1 et astrocyte Différenciation cellulaire
Anti- Doublecortin	1 :500	Polyclonal IgG lapin	ABCAM ab77450	Cellule A Différenciation cellulaire
Anti-Olig2	1 :500	Polyclonal IgG lapin	Millipore AB9610	Oligodendrocytes Precursor Cells (OPC) Différenciation cellulaire
Anti-gH2Ax	1 :1000	Polyclonal IgG souris	ABCAM ab26350	Cassure double brin Génotoxicité

5. Test de viabilité cellulaire

5.1. Principe

La viabilité cellulaire correspond au nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives. Elle a été mesurée avec le test MTT selon les instructions données dans le kit Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Le bromure de 3-(4,8-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT est un sel de tétrazolium pouvant être réduit par les enzymes mitochondriales en un composé insoluble bleu, le formazan. Ainsi, seules les cellules métaboliquement actives vont former des cristaux de formazan. L'intensité de bleu du précipité formé est directement proportionnelle à la quantité de cellules viables (Figure 41).

**Figure 41 : Principe du test MTT de viabilité cellulaire.**

5.2. Protocole

Les cellules ont été repiquées (1.10^6 cellules/mL) en boîtes de Pétri 33 mm préalablement « coatées » avec de la PLL. A la suite de l'exposition, les boîtes ont été rincées avec du milieu de Hank's puis 1mL de DMEM enrichi contenant 100 μ L de MTT (12mM) a été ajouté. Après une incubation de 4 heures à 37°C, le milieu a été retiré et 1 mL d'une solution de solubilisation (SDS-HCl) a été ajouté par boîte. Une étape d'homogénéisation du mix est nécessaire pour mettre en suspension les cristaux de formazan formés. Les boîtes ont été incubées 4 heures à 37 °C. La mesure de la DO à 562 nm a été réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (CLARIOstar, BMG LABTECH). Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

6. Mesure de l'apoptose

L'apoptose est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ce processus :

- Une cellule saine a constamment besoin que le corps lui confirme son utilité, aux moyens de facteurs de croissance. La perte de ces signaux peut déclencher un processus apoptotique.
- Des signaux émis à la suite des dommages subis par l'ADN (par exemple à la suite d'une irradiation aux rayons UV ou aux rayons X) sont capables de déclencher l'apoptose : en effet c'est alors soit une cellule potentiellement cancéreuse, soit une cellule totalement dysfonctionnelle. Dans les deux cas, cette cellule doit être éliminée sans dommage pour le reste du tissu adjacent.
- Des signaux hormonaux, notamment par les glucocorticoïdes, peuvent déclencher l'apoptose. C'est un mécanisme important, de régulation du système immunitaire.
- Pression sur le réticulum endoplasmique : lorsqu'une cellule a un problème dans la conformation d'une protéine, qui aboutit à une accumulation de cette protéine dans le réticulum endoplasmique, elle peut entrer en apoptose.
- La perte des contacts entre certaines cellules, ou bien entre ces cellules et leur matrice extracellulaire environnante induit de façon extrêmement rapide un processus apoptotique appelé anoïkose.
- La dégradation des télomères des chromosomes.

6.1. Principe de la technique TUNEL

La technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) est basée sur l'ajout, par l'enzyme Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt), de dUTP couplés à la fluorescéine au niveau des groupement 3'-OH libres générés lors de la dégradation de l'ADN pendant l'apoptose. Cette technique permet la visualisation de la fragmentation de l'ADN. Seuls les noyaux apoptotiques sont mis en évidence. Ici le kit de détection utilisé (Apoptag® Red in situ apoptosis detection kit) est fourni par Millipore (Millipore, S7165)(Figure 42).

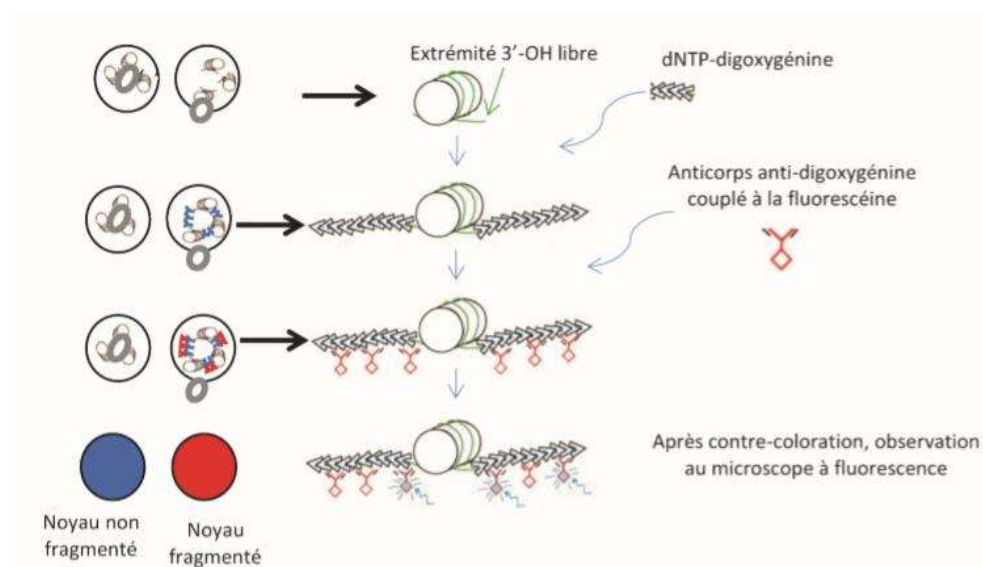


Figure 42 : Principe de la technique TUNEL

6.2. Protocole d'utilisation du kit Apoptag®

L'apoptose a été mesurée avec la technique TUNEL selon les instructions données dans le kit. Les NSCs ont été repiquées à haute densité (20 μL /lamelle) sur lamelles. Après exposition et fin de l'expérience dans son ensemble, les lamelles ont été rincées dans TBS1X puis elles ont été fixées avec du PFA 4% 10 minutes à température ambiante. Une étape de perméabilisation post-fixation éthanol-acide acétique (2 :1) a été réalisée pendant 5 minutes à -20°C. Après plusieurs rinçages au TBS1X, les lamelles ont été incubées 10 secondes à températures ambiante avec la solution Equilibration Buffer (13 $\mu\text{L}/\text{cm}^2 = 13 \mu\text{L}/\text{lamelle}$). Une quantité de 11 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de la solution Working Strenght Tdt enzyme (77 μL reaction buffer + 33 μL Tdt) a été déposée sur chaque lamelle qui est incubée 1 heure dans une chambre noire humide à 37°C. Cette incubation est essentielle à l'incorporation des nucléotides dUTP couplés à la fluorescéine aux extrémités 3'-OH libres. Les lamelles ont ensuite été rincées 15 secondes dans la solution de rinçage Working Streght Stop/Wash Buffer puis dans différents bains de TBS1X. Ces bains successifs permettent d'enlever l'excès de nucléotides marqués et d'enzymes. A l'obscurité, 13 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ d'Anti-Digoxigenin conjugate (68 μL blocking solution + 62 μL anti-digoxigenin conjugate) ont été ajoutés sur chaque lamelle ensuite incubée 30 minutes à température ambiante. Après rinçage au TBS1X, chaque lamelle a été recouverte de DAPI puis montée sur lame avec du milieu de montage (Fluoromount-G®). Les lames ont été conservées à 4°C avant leur observation au microscope à fluorescence.

Afin de valider la technique, différents contrôles sont nécessaires : un contrôle négatif (cellules sans enzyme, Reaction buffer seul) et un contrôle positif (cellules traitées à la DNase-I ; SIGMA DN-25). Pour chaque traitement, 4 lamelles ont été observées avec un minimum de 1000 noyaux analysés par condition testée.

7. Test de génotoxicité

7.1. Principe

Les cassures double brin de l'ADN, induites notamment par des rayons infra-rouges, des UV ou des espèces réactives de l'oxygène, sont les dommages de l'ADN les plus dangereux car elles peuvent entraîner la mort cellulaire ou initier des processus de cancérisation. Ces cassures peuvent être réparées par la mise en place rapide de deux mécanismes de réparation de l'ADN, la recombinaison homologue mettant en jeu le complexe MRN (MRE11, NBS1, RAD50) ou la voie des jonctions des extrémités non homologues (NHEJ) faisant intervenir l'hétérodimère KU70-KU80. L'une des étapes initiant ces mécanismes de réparation est la phosphorylation de l'histone H2AX en Ser139. La forme phosphorylée, γH2AX , s'accumule rapidement au site de cassure et peut être visualisée en immunocytochimie par la présence de foyers nucléaires ou foci de H2AX. Ces foci permettent le recrutement de facteurs de réparation de l'ADN au site de cassure tels que MDC1, 53BP1 ou le complexe MRN. La phosphorylation de H2AX met en jeu des protéines de la famille de PIKK (ATM, ATR, DNA-PKs). ATM est la protéine kinase majoritairement impliquée dans la phosphorylation de H2AX. De plus, le recrutement et l'activation d'ATM requiert γH2AX . Ainsi un stress génotoxique peut être mesuré par la détermination du nombre de cellules γH2AX positives (cellules présentant des foci nucléaires) par microscopie à fluorescence, associé à la mesure du nombre de foci γH2AX par noyau (Figure 43).

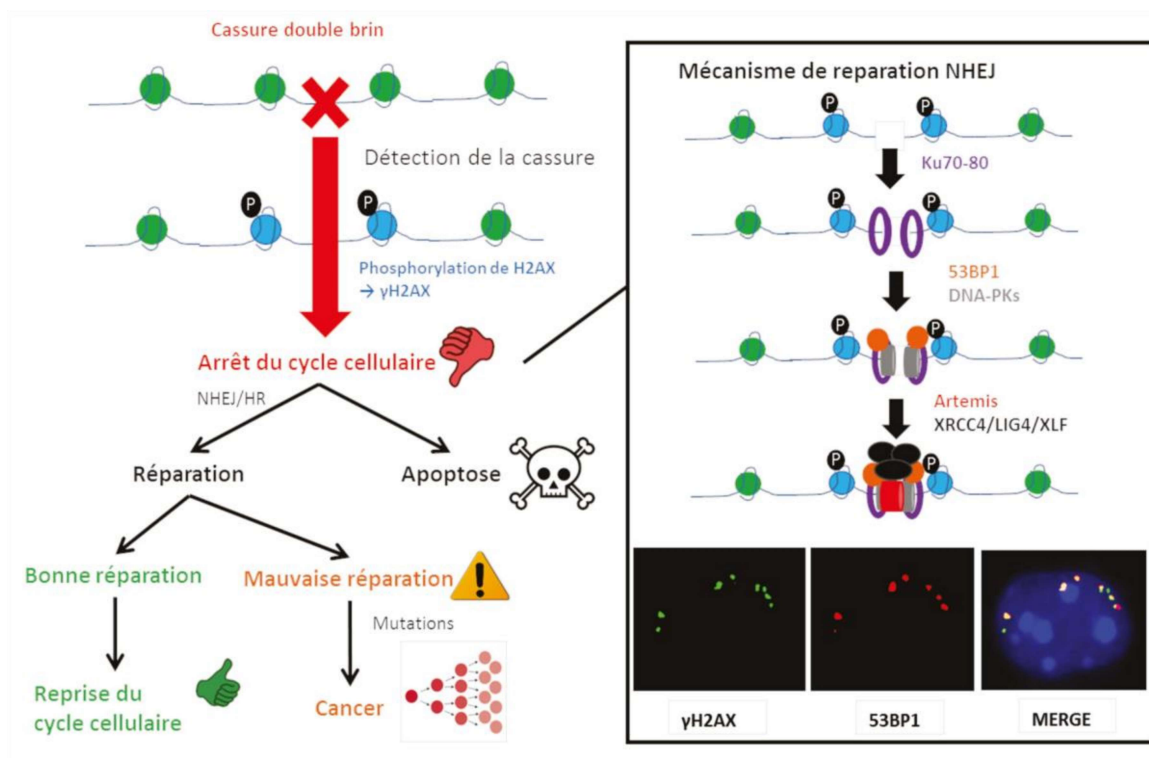


Figure 43 : Détection d'une cassure double brin de l'ADN et mécanisme de réparation de la lésion.

7.2. Protocole

Les NSCs ont été repiquées sur les lamelles prétraitées à la poly-L-lysine. A la fin de l'exposition, les cellules ont été fixées au PFA 4% pendant 10 minutes. Après plusieurs rinçages successifs au TBS1X, une étape de saturation (PBS + 0.52% Triton X-100 + 2% BSA (Bovine Serum Albumin, BSA Fraction V, ICN Biomedicals, ref 9048-46-8) + 10% SVF) a été réalisée pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps primaire anti-γ2AX Ser139 (1:1000, polyclonal IgG souris, ABCAM ab26350) dilué dans la solution de saturation, a été ajouté sur chaque lamelle et incubé une nuit à température ambiante en chambre noire humide. Le lendemain, les lamelles ont été rincées avec du TBS1X. L'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (1:100, chèvre anti-lapin, SIGMA T6778) dilué dans une solution de TBS1X + 2% BSA + 10% SVT a été incubé en chambre noire humide 1 heure à température ambiante. Après rinçage au TBS1X, le DAPI a été ajouté sur chaque lamelle puis ces dernières ont été montées sur lame. Les lames ont ensuite été conservées à 4°C avant observation au microscope à fluorescence. Pour chaque condition, 4 lamelles minimum ont été observées au grossissement à huile 40x, avec une moyenne de 100 noyaux analysés par condition testée.

8. Analyse du transcriptome

8.1. Préparation des ARN totaux

Le repiquage des NSCs a été réalisé en boîte de Pétri 33mm préalablement coatées avec de la PLL (1.10^6 cellules/mL). Les tapis cellulaires ont été lavés avec du DPBS stérile.

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide du TRIzol (Sigma T3411). Sur chaque tapis cellulaire, 300 μL de TRIzol ont été ajoutés puis chaque échantillon a été homogénéisé jusqu'à dissolution complète du culot. Les tubes ont été laissés 5 minutes à température ambiante, puis ils ont été centrifugés

pendant 10 minutes à 12 000 g à 4°C. Les surnageants ont été transférés dans un nouveau tube et 30 µL de 1-bromo-3-chloropropane (BCP) ont été ajoutés à chaque échantillon. Après homogénéisation et incubation de 10 minutes à température ambiante, une centrifugation a été réalisée (12 000 g, 10 minutes, 4°C). La phase aqueuse a été récupérée puis 150 µL d'isopropanol ont été ajoutés. Après homogénéisation, les échantillons ont été laissés à température ambiante pendant 10 minutes. Une seconde centrifugation a été effectuée (12 000 g, 8 minutes, 4°C). Le surnageant a été enlevé et le culot a été lavé avec 300 µL d'éthanol 75%. Les tubes ont été centrifugés à nouveau (7 500 g, 8 minutes, 4°C). Cette dernière étape de lavage a été répétée deux fois. Les culots ont été séchés puis remis en suspension dans 20 µL d'eau RNase free.

La concentration des ARN totaux obtenus a été mesurée à l'aide du spectromètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) et du logiciel ND-1000 V3.3.0. Le spectre d'absorption a été réalisé et la densité optique (DO) des échantillons a été relevée à 230 nm (longueur d'onde d'absorption des contaminants), à 260 nm (longueur d'onde d'absorption des bases de l'ADN) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines). La pureté de l'échantillon a été évaluée par le rapport DO_{260}/DO_{280} (supérieur à 1,8). La contamination par le solvant a été évaluée par le rapport DO_{230}/DO_{280} . Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C.

8.2. Séquençage d'ARN ou RNA-seq

Le séquençage est réalisé pour la plateforme GenomEast à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch-Graffenstaden (Alsace, France).

8.2.1. *Préparation des librairies*

Des banques d'ARN-Seq ($n = 4/\text{groupe}$) sont générées à partir de 400 ng du kit de préparation d'échantillons d'ARN totaux Illumina® TruSeq®. Brièvement, après purification avec des billes magnétiques attachées à un oligo poly-T, l'ARNm est fragmenté en utilisant des cations divalents à 94°C pendant 2 min. Les fragments d'ARN clivés sont copiés en un premier brin d'ADNc en utilisant la transcriptase inverse et des amorces aléatoires. La synthèse du second brin d'ADNc suit, en utilisant l'ADN polymérase I et la RNase H. Après addition d'une base simple et ligature subséquente de l'adaptateur sur des fragments d'ADNc double brin, les produits sont purifiés et enrichis par PCR (30 secondes à 98°C; [10 sec à 98°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C] x 12 cycles; 5 min à 72°C) pour créer la bibliothèque d'ADNc. Les amorces de PCR excédentaires sont éliminées par purification en utilisant des billes AMPure XP (Beckman Coulter) et les banques d'ADNc finales sont vérifiées pour la qualité et quantifiées en utilisant une électrophorèse capillaire. Le séquençage est effectué sur le génome de l'Illumina HiSeq2500 lorsque 50 bases de lecture simple suivent les instructions d'Illumina.

8.2.2. Analyses du séquençage et statistiques

Les « reads » sont cartographiés sur l'assemblage mm10 du génome de souris en utilisant STAR v2.5.3a (Dobin et al., 2013). L'expression génique est quantifiée à partir des « reads » alignés de manière unique en utilisant HTSeq v0.6.1p1 et des annotations de gènes de la version Ensembl 100. Le comptage des « reads » est normalisé dans les bibliothèques avec la méthode proposée par Anders et Huber (Anders et Huber, 2010).

L'analyse statistique est réalisée avec la méthode proposée par Love et *al.* (2014) ajustés dans la bibliothèque DESeq2 Bioconductor (v1.16.1). Les "p-value" résultantes sont ajustées pour des tests multiples en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg (1995). Les analyses des ontologies géniques (GO) pour les enrichissements fonctionnels sont réalisées à l'aide des outils DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8, <https://david.ncifcrf.gov>, Huang et al, 2009) et STRING (Protein-Protein Interaction Networks, © STRING Consortium 2018, <https://string-db.org>, De Souza et *al.*, 2018). Le génome entier de souris (*mus musculus*) est utilisé comme arrière-plan. Les termes les plus enrichis (Fold Change ou FC, établis grâce à la comparaison du niveau d'expression de chaque gène entre deux conditions) sont présentés (les valeurs de $p < 0,05$ ont été prises en compte) et exprimées généralement en logarithme de base 2 (Log2).

9. Statistiques

Dans chaque expérience, jusqu'à 9 suspensions cellulaires ont été poolées pour obtenir un ensemble de cellules homogène nous permettant de nous affranchir de la composante individu lors des analyses. Un test de Kruskal-Wallis, aussi appelé ANOVA unidirectionnelle sur rangs, a été effectué à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Chaque moyenne a été comparée à la moyenne de sham. Toutes les données présentées dans les graphiques sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. Les écart-moyens à la moyenne (SEM) permettent d'évaluer la moyenne estimée des groupes de mesure entre les différents groupes expérimentaux contrairement à l'écart-type (SD) décrivant la variabilité au sein d'un même groupe expérimental. Le seuil de significativité utilisé est de 0,05 pour l'ensemble des analyses statistiques.

Partie 3 : Résultats

1. Approche cellulaire

1.1. Contexte de l'étude

Composée d'une population hétérogène de cellules progénitrices avec des capacités de prolifération et de différenciation différentes, la V-SVZ est l'une des deux principales niches neurogéniques chez la souris. Elle est formée de deux zones distinctes, à savoir la SVZ et la VZ. La SVZ est constituée de cellules B1, de progéniteurs intermédiaires (cellules C) et de progéniteurs immatures engagés dans une voie de différenciation tels que les neuroblastes (cellule A) ou alors les OPC. La VZ est composée d'épendymocytes (cellule E) et du pôle apical des cellules B1 de la SVZ, localisées juste en-dessous. Les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules B1 sont issues à un micro-environnement neurogénique maintenu par les cellules E et le LCR.

Dans cette approche, les possibles effets neurotoxiques des RF sur l'homéostasie de la niche V-SVZ ont été évalués. Pour étudier les potentiels effets délétères des RF sur le processus de neuroglionèse des NSCs issue de la SVZ, les capacités de différenciation des cultures primaires des NSCs murines ont été analysées. Ce modèle a permis d'évaluer différents processus cellulaires tels que la croissance, la survie, la prolifération, la mort et la différenciation cellulaire.

1.2. Résultats

1.2.1. Effets cytotoxiques des RF sur la culture primaire de NSCs issues de la V-SVZ

Avant de démarrer toutes expériences, la toxicité des RF sur les cultures primaires de NSCs issues de V-SVZ de souris a été testée. L'intérêt a été porté sur la croissance, la viabilité, la mort et la prolifération cellulaire (Figure 44).

Comme le montre la figure 44A, les expositions aux RF ont un effet délétère sur la croissance cellulaire dès la fin des temps d'exposition. La différence du nombre total de cellules par rapport au SHAM va de -9,32 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 0,083 W/kg jusqu'à -24,52 % lorsque les cellules sont exposées 7 jours à un DAS de 2,155 W/kg (Tableau 4). Ces résultats peuvent s'expliquer par un phénomène de mort cellulaire et/ou un défaut de prolifération.

Tableau 4 : Impact des RF sur la croissance cellulaire

Nombre de jour exposé et DAS utilisé	Jours 3 et 7		Jour 10		
	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)	Différence entre le jour 10 et la fin d'exposition
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	90,68 ± 1,91	- 9,32 %	89,21 ± 1,29	- 10,79 %	- 1,47 %
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	75,65 ± 1,80	- 24,35 %	75,02 ± 1,98	- 24,98 %	- 0,63 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	77,30 ± 2,65	- 22,70 %	85,17 ± 2,44	- 14,83 %	+ 7,87 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	75,48 ± 3,99	- 24,52 %	82,20 ± 3,98	- 17,8 %	+ 6,72 %

Cet effet persiste au jour 10, cependant deux effets sont retrouvés en fonction du temps d'exposition. Lorsque les cellules sont exposées 3 jours, le nombre total de cellules continue à diminuer (- 1,47 % pour le DAS de 0,083 W/kg et - 0,63% pour le DAS de 2,155 W/kg). Tandis que lorsque les cellules sont exposées 7 jours, le nombre de cellules total est toujours inférieur au SHAM mais la diminution est moins importante qu'à la fin des temps d'exposition (+ 7,87 % pour le DAS de 0,083 W/kg et + 6,72 % pour le DAS de 2,155 W/kg). Ces résultats supposent qu'un ou plusieurs mécanismes se mettent en place lorsque les cellules sont exposées plus longtemps. En effet, les cellules exposées peuvent s'adapter et réduire le phénomène de mort cellulaire et/ou de défaut de prolifération, et/ou sous l'effet des RF les capacités de prolifération deviennent excessives compensant alors le nombre total de cellules.

L'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et la croissance cellulaire (Figure 44B). En effet, quel que soit la durée d'exposition, l'augmentation du DAS entraîne une diminution de la croissance cellulaire qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg.

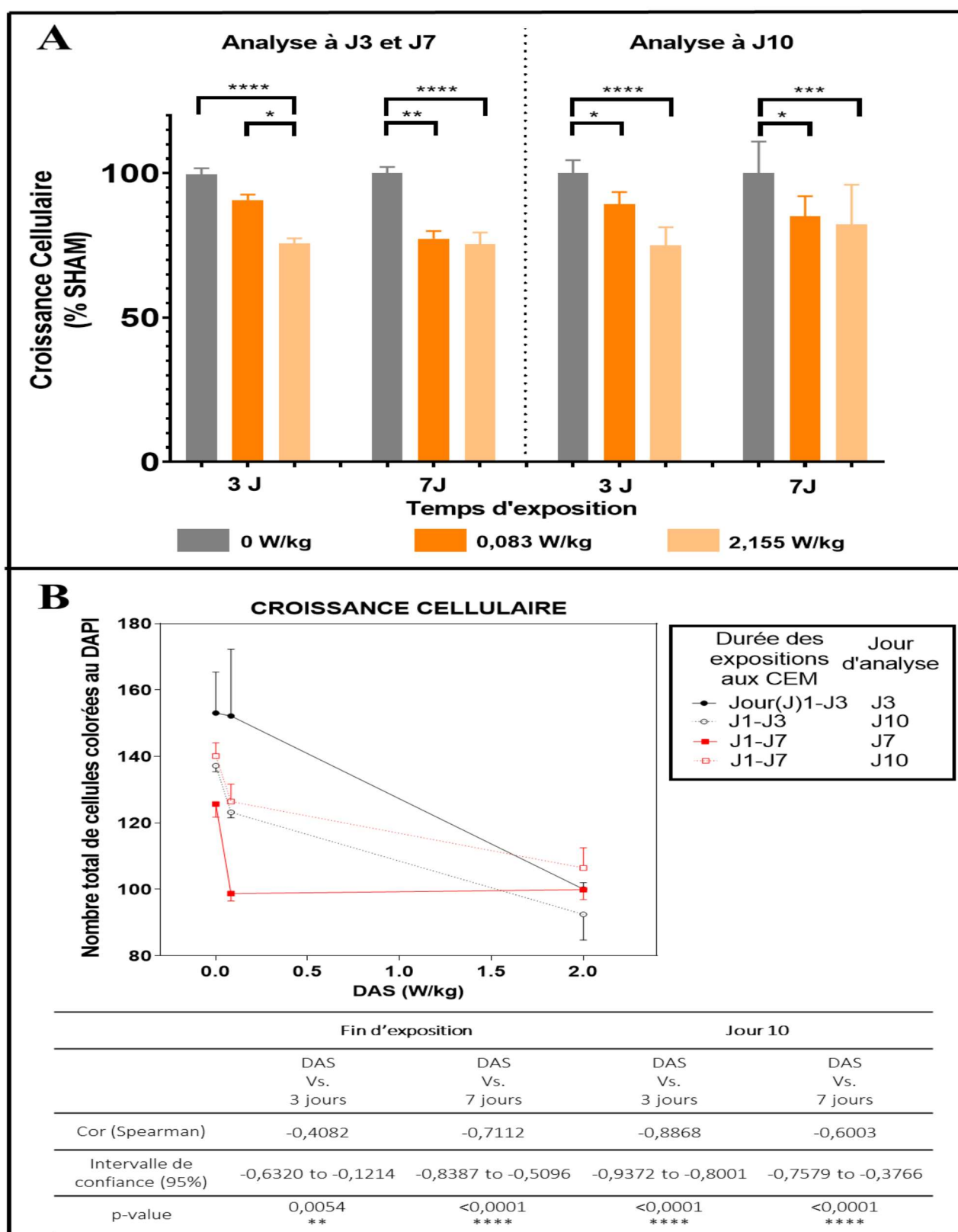


Figure 44 : Effets d'une exposition aux RF sur la croissance cellulaire de cellules souches cérébrales *in vitro*.

(A) La croissance cellulaire est mesurée par le comptage de cellules présentant un noyau contre-coloré au DAPI au terme des temps d'exposition et du jour 10 ($n = 9$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$).

(B) Corrélations par le DAS.

Pour déterminer les capacités de prolifération des cellules souches cérébrales en culture, une immunocytochimie dirigée contre la protéine Ki67 a été réalisée à la fin des temps d'exposition et au jour 10. La figure 45 montrent une augmentation du nombre de cellules Ki67-positives quel que soit le temps d'exposition et la dose, juste après les phases d'exposition. La différence du nombre total de cellules en prolifération par rapport au SHAM va de + 35,90% lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 0,083 W/kg jusqu'à + 111,80 % lorsque les cellules sont exposées 7 jours à un DAS de 2,155 W/kg (Tableau 5).

Tableau 5 : Impact des RF sur la prolifération cellulaire

	Jours 3 et 7		Jour 10		
	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)	Différence entre le jour 10 et la fin d'exposition
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	135,90 ± 8,77	+ 35,90 %	117,40 ± 6,27	+ 17,40 %	- 18,80 %
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	189,30 ± 13,24	+89,30 %	188,50 ± 13,77	+ 88,50 %	- 0,80 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	164,20 ± 14,95	+64,20 %	138,10 ± 17,01	+ 32,10 %	- 32,1 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	211,80 ± 16,15	+ 111,80 %	225,30 ± 13,20	+ 125,30 %	+ 13,5 %

Cette augmentation persiste au jour 10 mais n'est significative seulement pour le DAS de 2,155 W/kg (+ 32,10 % lors de l'exposition de 3 jours et + 125,30 % lors de l'exposition de 7 jours). L'augmentation du DAS semble augmenter le phénomène de prolifération.

L'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et la prolifération cellulaire (Figure 45B). En effet, quel que soit la durée d'exposition, l'augmentation du DAS entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg.

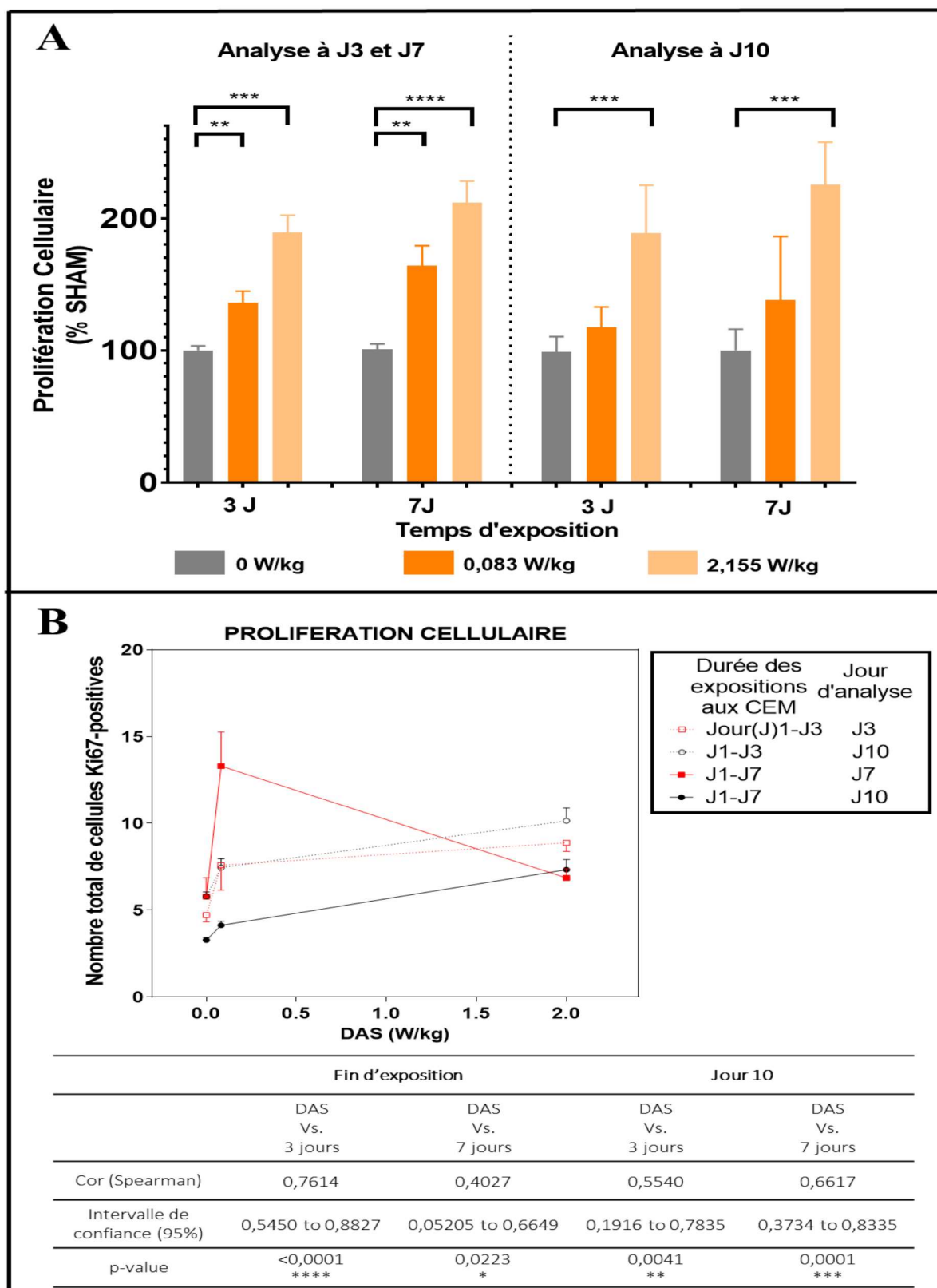


Figure 45 : Effets d'une exposition aux RF sur la prolifération cellulaire de cellules souches cérébrales *in vitro*.

(A) La prolifération cellulaire est quantifiée par une immunocytochimie Ki67 au terme des temps d'exposition et au jour 10 ($n = 9$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$).

(B) Corrélations par le DAS.

Il était nécessaire de savoir si cette augmentation de prolifération était associée à une augmentation de la mort cellulaire, ou non, afin de mieux comprendre les conséquences éventuelles de ce défaut. Ainsi, la viabilité cellulaire a été quantifiée avec un test MTT. Les données démontrent un effet néfaste des RF à la fin des temps d'exposition (Figure 46). La différence de mort cellulaire par rapport au SHAM va de - 6,70 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 0,083 W/kg jusqu'à - 28,12 % lorsque les cellules sont exposées 7 jours à un DAS de 0,0083 W/kg (Tableau 6). Ces résultats permettent de valider l'une des hypothèses selon laquelle la diminution de la croissance cellulaire est associée à un mécanisme de mort cellulaire.

Tableau 6 : Impact des RF sur la viabilité cellulaire

Jours 3 et 7		
	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	93,30 ± 2,83	- 6,70 %
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	78,73 ± 2,88	- 21,27 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	71,88 ± 2,08	- 28,12 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	79,74 ± 3,38	- 20,26 %

L'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et la viabilité cellulaire (Figure 46B). En effet, quel que soit la durée d'exposition, l'augmentation du DAS entraîne une diminution de la viabilité cellulaire qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg.

En conclusion, il apparaît que dans ces conditions expérimentales, les résultats indiquent que les RF affectent les paramètres de croissance, de viabilité, de prolifération cellulaire des cultures primaires de NSCs murines.

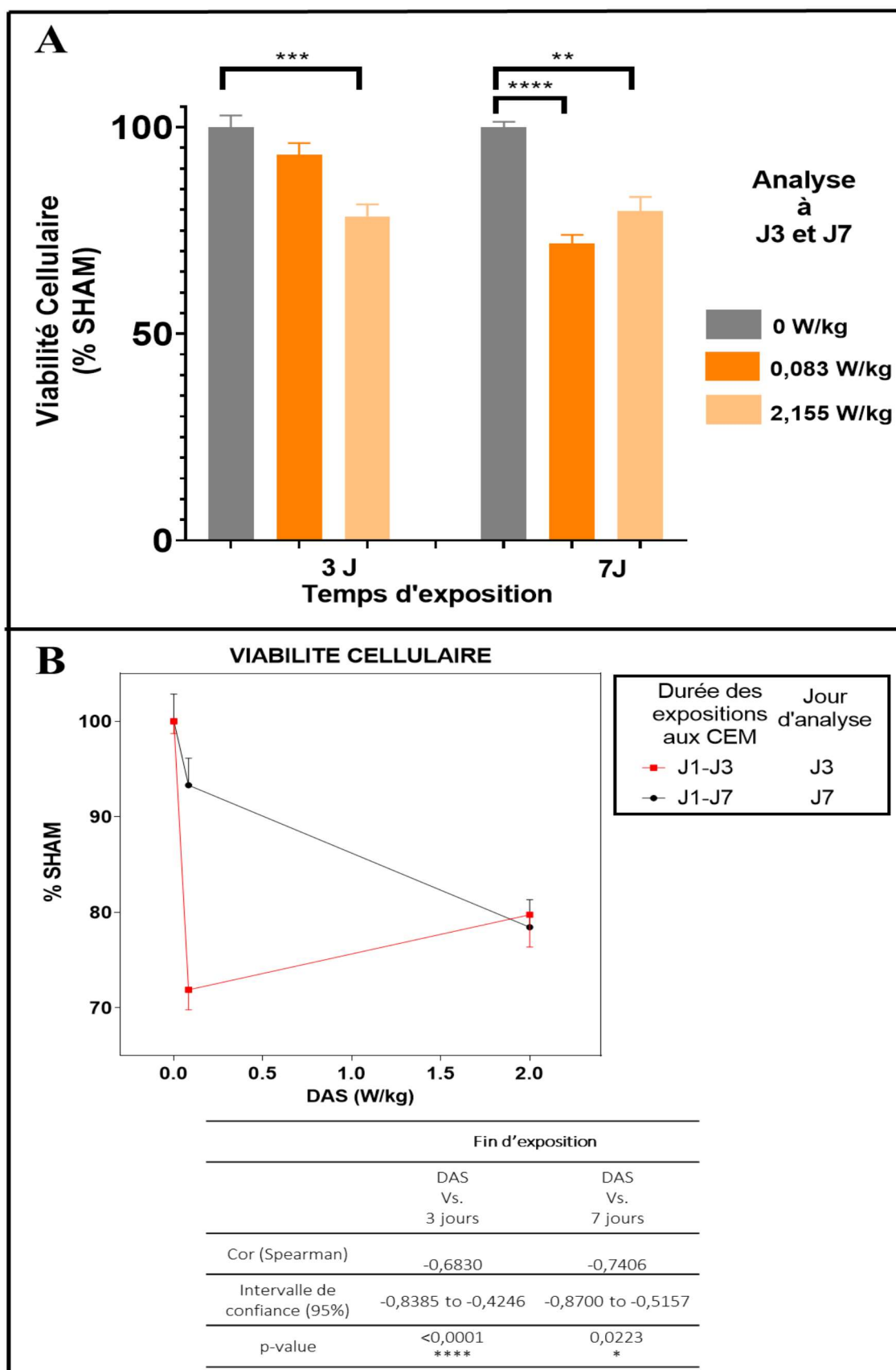


Figure 46 : Effets d'une exposition aux RF sur la viabilité cellulaire de cellules souches cérébrales *in vitro*.

(A) Le test MTT a été réalisé à la fin des temps d'exposition ($n = 4$; $**p < 0,01$; $***p < 0,005$; $****p < 0,001$).

(B) Corrélations par le DAS.

1.2.2. Effets génotoxiques des RF

Les RF induisent un effet cytotoxique important sur les cultures primaires de NSCs murines. En exposant les NSCs aux RF, d'autres aspects cellulaires ont pu être étudiées. Ainsi la génotoxicité a été mesurée par le marqueur γ H2AX. Après chaque fin d'exposition, un comptage du nombre de cellules présentant des cassures double-brin de l'ADN a été réalisé. Les résultats ont montré que les RF induisent une augmentation du nombre de cellules comportant des cassures double-brin de l'ADN et ce quel que soit le temps et la dose (Figure 47). Le nombre de cellules présentant des cassures double-brin de l'ADN par rapport au SHAM va de + 55,30 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 2,155 W/kg jusqu'à +169,60 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 0,083 W/kg (Tableau 7). Les données de l'exposition à un DAS de 0,083 W/kg pendant 3 jours ont une très grande variabilité et semblent sur-estimer le nombre réel.

Tableau 7 : Effets génotoxiques des RF

Jours 3 et 7		
	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	269,60 ± 33,13	+ 169,60 %
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	155,30 ± 7,92	+ 55,30 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	228,90 ± 11,81	+ 128,90 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	253,80 ± 7,16	+153,80 %

L'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et le nombre de cellules comportant des cassures double-brin de l'ADN (Figure 47B). En effet, quel que soit la durée d'exposition, l'augmentation du DAS entraîne une augmentation du nombre de cellules comportant des cassures double-brin de l'ADN qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg.

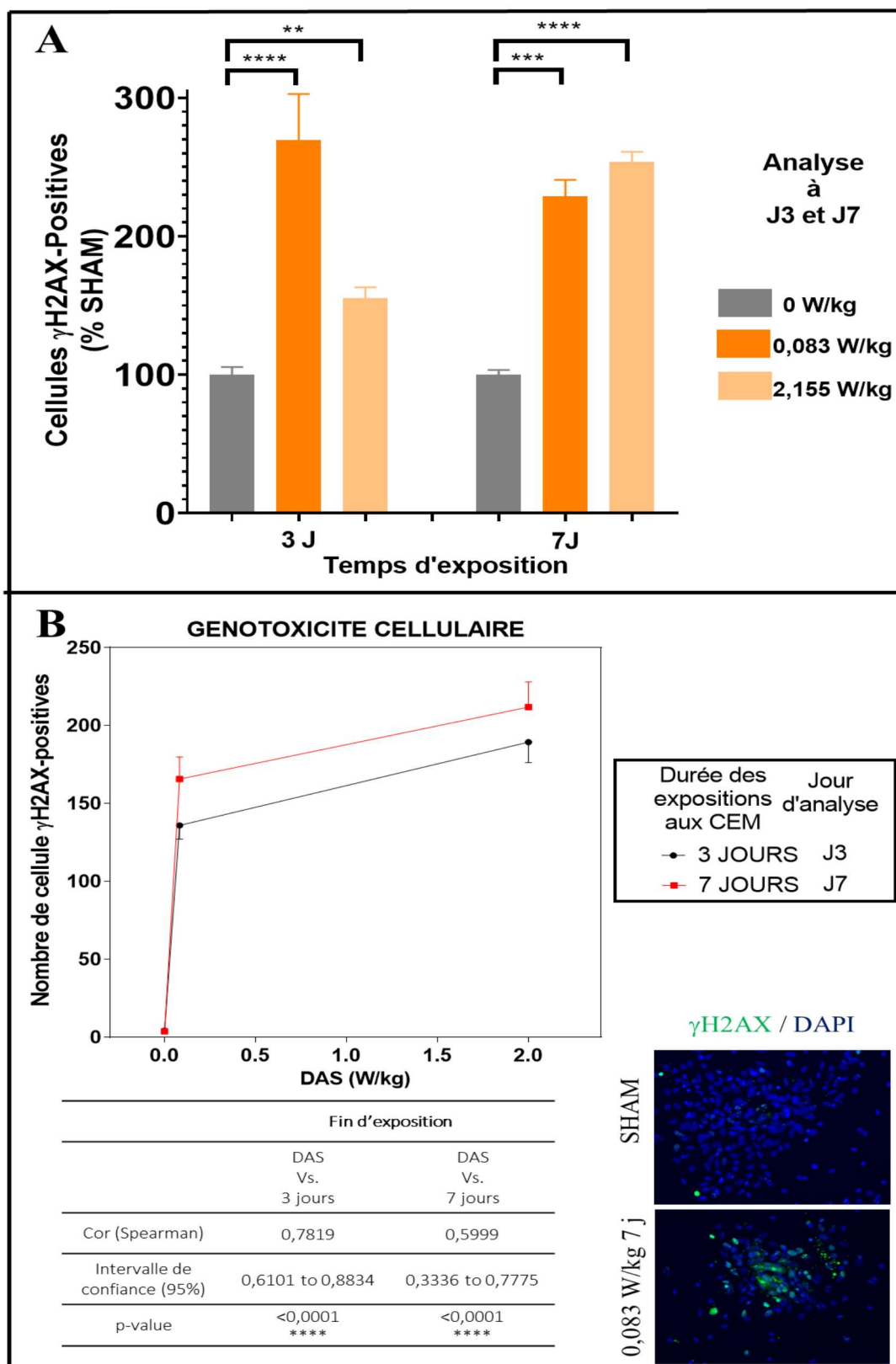


Figure 47 : Effets d'une exposition aux RF sur le stress génotoxique de cellules souches cérébrales *in vitro*.

(A) Graphique représentant le nombre de cellules avec des foci γ H2AX après une exposition aux RF ($n = 9$; $**p < 0,01$; $****p < 0,001$).

(B) Corrélation par le DAS et observations microscopiques des foci γ H2AX (points verts dans les noyaux) en condition SHAM et exposées à 0,083 W/kg pendant 7 jours.

Une quantification de l'apoptose cellulaire a été réalisée par l'utilisation du kit Apoptag basé sur la technique TUNEL. En effet, les cassures double-brin de l'ADN sont l'une des lésions de l'ADN les plus dangereuses pour la survie et la préservation de l'intégrité génomique des cellules. Les résultats obtenus montrent que les RF ont conduit à l'augmentation du nombre de noyau présentant des fragmentations de l'ADN allant de + 8,90 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 0,083 W/kg à + 24,50 % lorsque les cellules sont exposées 7 jours à un DAS de 2,155 W/kg (Figure 48) (Tableau 8). De plus, l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose est du même ordre que la diminution de la croissance cellulaire et de la viabilité. Les données sont donc cohérentes et le phénomène d'apoptose permet d'expliquer une partie de la mort cellulaire.

Tableau 8 : Effets des RF sur l'apoptose cellulaire

Jours 3 et 7				
	Moyenne (%) ± SEM	Différence de la MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE par rapport au SHAM (0 W/kg)	Différence de la MORT CELLULAIRE par rapport au SHAM (0 W/kg)	Différence de la VIABILITE CELLULAIRE par rapport au SHAM (0 W/kg)
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	108,90 ± 2,88	+ 8,90 %	- 10,79 %	- 6,70 %
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	121,00 ± 5,48	+ 21,00 %	- 24,98 %	- 21,27 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	118,50 ± 6,38	+ 18,50 %	- 14,83 %	- 28,12 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	124,50 ± 4,94	+ 24,50 %	- 17,8 %	- 20,26 %

L'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et le nombre de cellules en apoptose cellulaire (Figure 48B). En effet, quel que soit la durée d'exposition, l'augmentation du DAS entraîne une augmentation du nombre de cellules en apoptose qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg.

Pour conclure, ces résultats démontrent que les RF induisent des cassures double brin de l'ADN. Ceci a pour conséquence la phosphorylation de l'histone H2AX permettant la détection de gammaH2AX. Ce stress génotoxique ne semble pas être contrecarré par les mécanismes de réparations actifs car les RF conduisent à l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

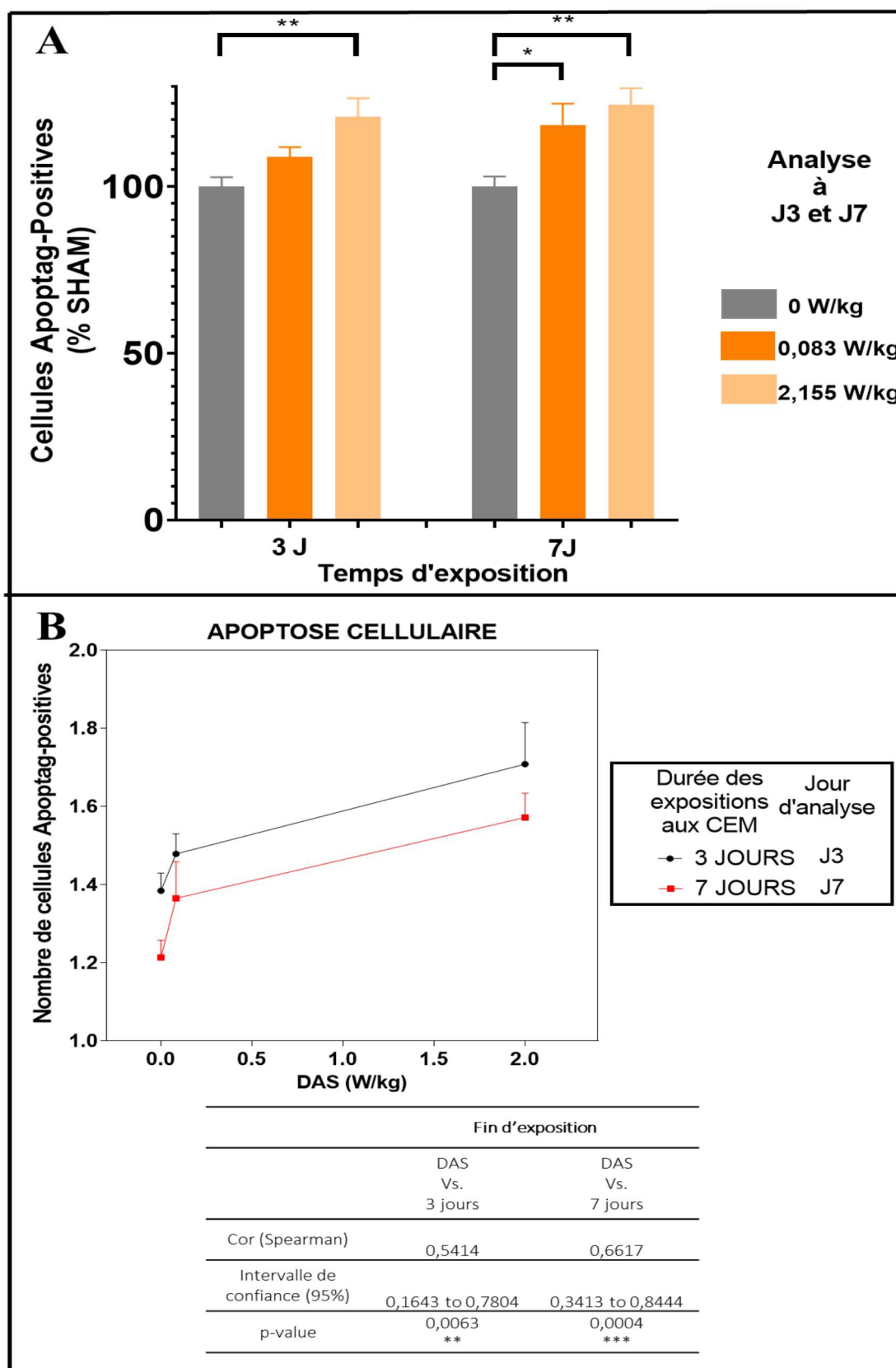


Figure 48 : Effets d'une exposition aux RF sur l'apoptose cellulaire de cellules souches cérébrales *in vitro*.

(A) Graphique représentant le nombre de noyaux apoptotiques après une exposition aux RF ($n = 9$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$).

(B) Corrélation par le DAS

1.2.3. Études des RF sur la différenciation neurogliale des NSCs

In vivo, les cellules B1 sont localisées en-dessous de la VZ et jouent le rôle de progéniteurs primaires générant des neurones, des astrocytes ou des oligodendrocytes dans la SVZ post-natale. Des perturbations au niveau de la VZ sont susceptibles d'induire des modifications au niveau des cellules B1 et de conduire des altérations de l'homéostasie de la niche neurogénique. En effet, les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules B1 sont liées au maintien d'un microenvironnement neurogénique par les cellules E.

Pour étudier une possible modification de la différenciation des cellules B1 dans le modèle *in vitro* de SVZ utilisé, un marquage et une quantification des différentes populations de précurseurs cellulaires ont été réalisés. La combinaison d'anticorps spécifiques a permis la quantification des différentes population cellulaire (figure 49A). Les cellules B1 expriment les filaments intermédiaires GFAP et la protéine Nestin. Les cellules C sont quant à elles GFAP-négatives mais sont Nestin-positives. Les astrocytes matures sont identifiés par la seule présence du marquage de la protéines GFAP. Par ailleurs, le facteur de transcription Olig2 est un marqueur de la lignée oligodendrogliale et notamment des OPC de la V-SVZ (Figure 49B). Le marqueur DCX est un des marqueurs spécifiques des cellules A. Enfin, le co-marquage CD11b et CD45 permet d'identifier les cellules microgliales.

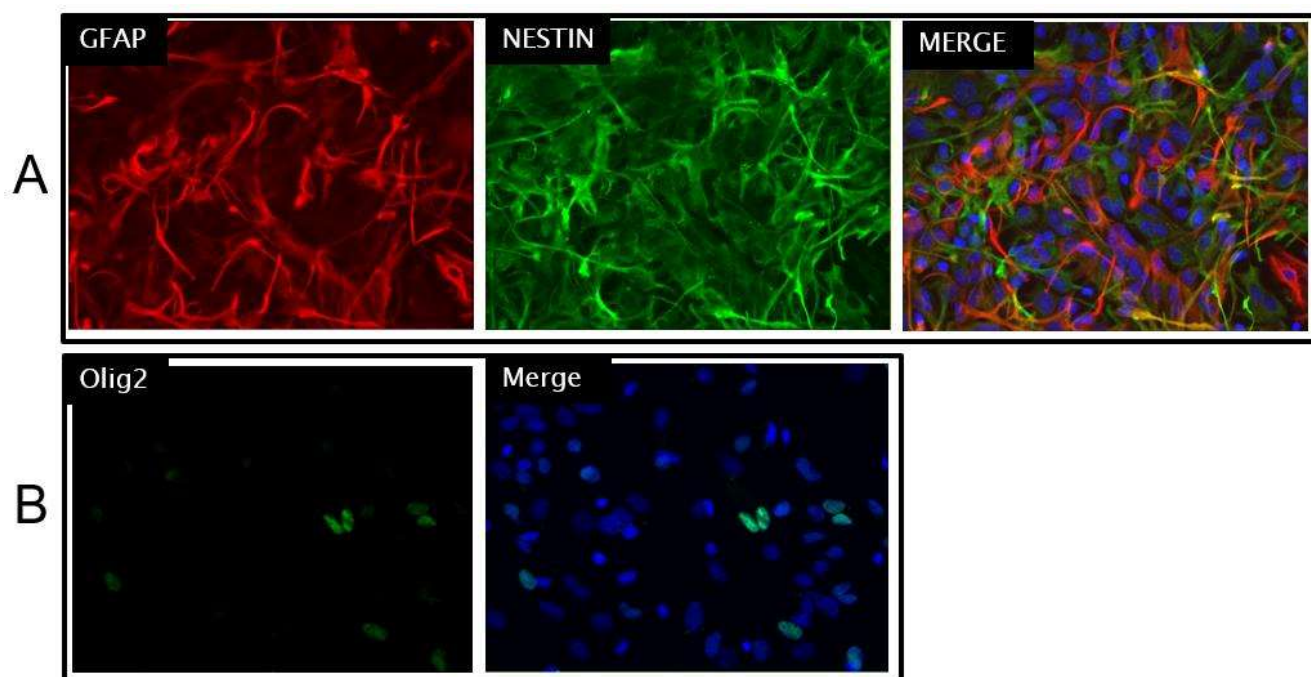


Figure 49 : Marqueurs spécifiques pour les différentes populations de précurseurs présentes dans les cultures primaires de NSCs *in vitro* par immunocytochimie

- (A) Les cellules B1 (orange) co-expriment les filaments intermédiaires Nestin (vert) et GFAP (Rouge) tandis que les cellules C expriment uniquement la protéines Nestin (vert). Les astrocytes matures expriment GFAP (rouge).
- (B) Les OPC (vert) expriment le facteur de transcription Olig 2.

La figure 50 regroupe l'ensemble des résultats concernant les effets des RF sur la différenciation neurogliale des cellules B1 et des cellules C. Les résultats montrent qu'une exposition aux RF ne modifie pas de manière significative le nombre de cellules B1 et de cellules C.

Tableau 9 : Effets des RF sur la différenciation cellulaire des cellules B1 et des cellules C.

	Cellules B1		Cellules C	
	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	97,66 ± 6,12	- 2,34 %	100,70 ± 2,13	+ 0,70 %
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	100,3 ± 3,23	+ 0,3 %	99,34 ± 0,96	- 0,66 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	97,99 ± 4,75	- 2,01 %	105,10 ± 3,01	+ 5,10 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	106,20 ± 6,34	+ 6,20 %	101,30 ± 2,21	+ 1,30 %

L'analyse des coefficients de Spearman ne met pas en évidence une corrélation entre le DAS et le nombre de cellules B1 et C (Figure 50B).

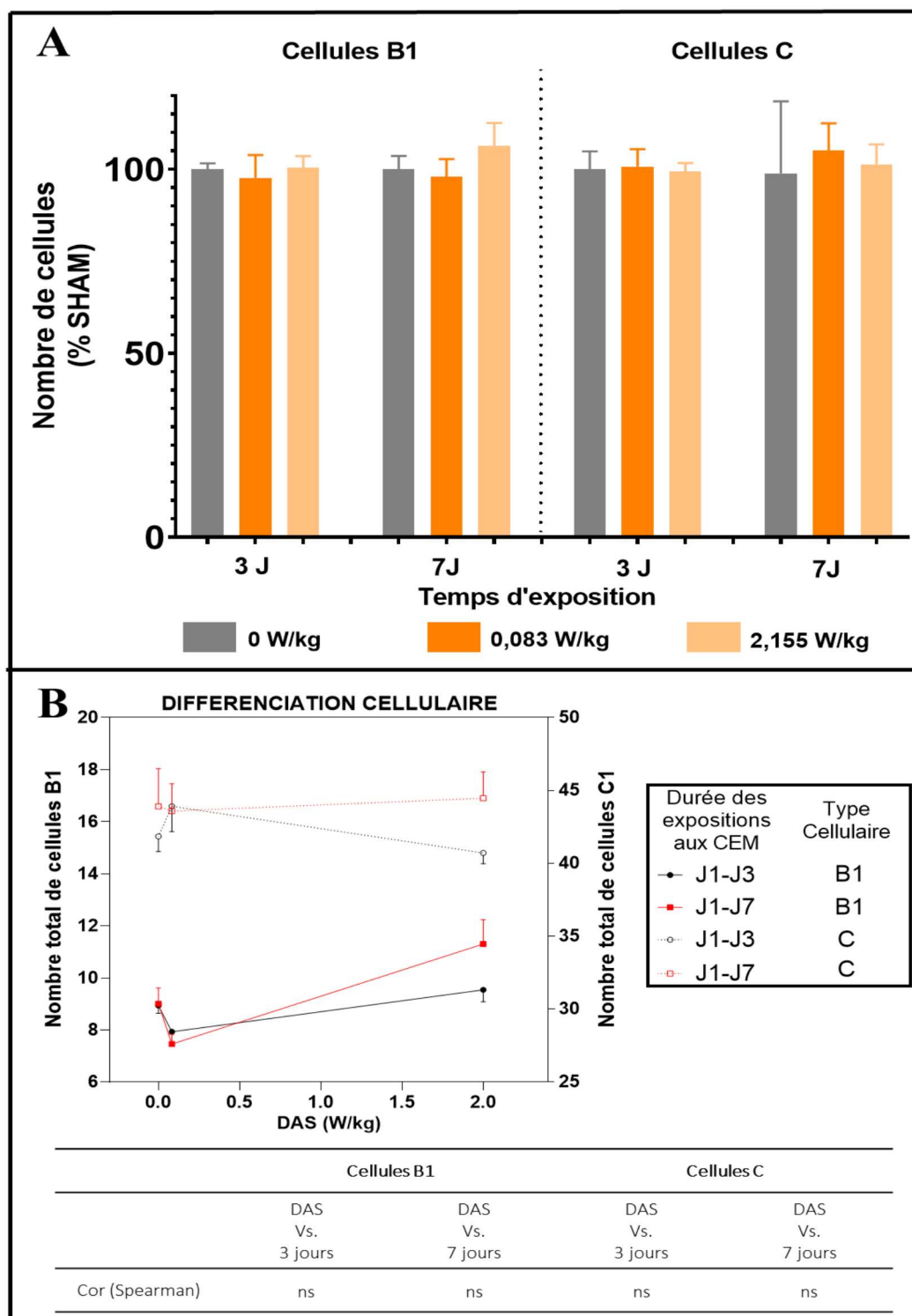


Figure 50 : Effets d'une exposition aux RF sur la différenciation cellulaire de cellules souches cérébrales *in vitro* en cellules B1 et cellules C.

Pourcentage des NSCs différenciées et identifiées par immunocytochimie à l'aide de marqueurs spécifiques

(A) Les RF ne semblent pas conduire à une altération du « pool » de cellules B1 (Nestin+/GFAP+)($n = 9$; environ 200 cellules analysées par réplique ; $ns p > 0,05$). Le nombre de cellules C (Nestin+/GFAP-) n'est pas modifié à la suite d'une exposition aux RF ($n = 9$; environ 200 cellules analysées par réplique ; $ns p > 0,05$).

(B) Corrélations par le DAS.

De façon intéressante, cette approche a permis de mettre en évidence que les RF augmentent le nombre de cellules Olig2-positives et diminuent le nombre de cellule astrocytaire, et ceci de manière significative (Figure 51). Les résultats obtenus montrent que les RF ont conduit à l'augmentation du nombre de précurseurs d'oligodendrocytes allant de + 27,80 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 2,155 W/kg à + 69,40 % lorsque les cellules sont exposées 7 jours à un DAS de 2,155 W/kg (Tableau 8). Une diminution significative du nombre de cellules astrocytaire est obtenue lorsque les cellules sont exposées à la dose de 2,155 W/kg. Cette diminution est de - 9,36 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours et - 15,39 % lorsque les cellules sont exposées 7 jours. Elle peut s'expliquer par un défaut de prolifération ou une augmentation de la mort cellulaire.

Tableau 10 : Effets des RF sur la différenciation cellulaire des OPC et des astrocytes.

	OPC		Astrocytes	
	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	142,80 ± 7,23	+ 42,80 %	98,84 ± 2,72	- 1,16 %
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	127,80 ± 12,47	+ 27,80 %	90,64 ± 1,82	- 9,36 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	126,90 ± 10,46	+ 26,90 %	95,29 ± 2,37	- 4,71 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	169,40 ± 10,81	+ 69,40 %	84,61 ± 3,09	- 15,39 %

L'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et le nombre d'OPC (Figure 51B). En effet, quel que soit la durée d'exposition, l'augmentation du DAS entraîne une augmentation du nombre d'OPC qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg. De même, l'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et le nombre d'astrocyte. En effet, lorsque les cellules sont exposées 7 jours, l'augmentation du DAS entraîne une diminution du nombre d'astrocytes qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg.

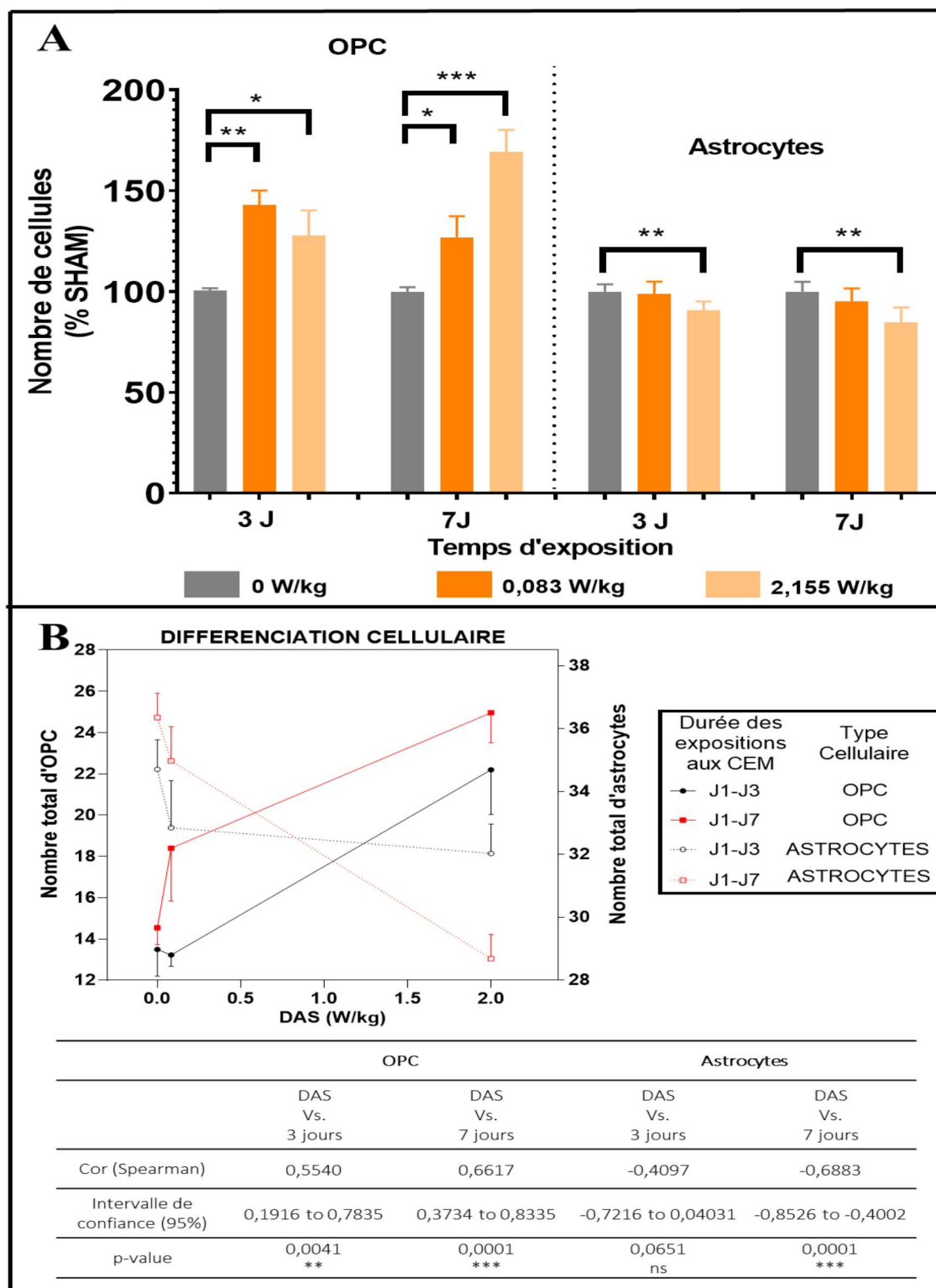


Figure 51 : Effets d'une exposition aux RF sur la différenciation cellulaire de cellules souches cérébrales *in vitro* en OPC et astrocytes.

- (A) Le nombre d'OPC (Olig2+) est significativement augmenté après une exposition aux RF ($n = 9$; environ 200 cellules analysées par réplica ; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$). Le pool d'astrocyte (GFAP+) est significativement diminué à la suite d'une exposition aux RF ($n = 9$; environ 200 cellules analysées par réplica ; $**p < 0,01$)
- (B) Corrélations par le DAS.

De plus, l'observation de l'augmentation du nombre de cellules de type A suggère que les RF, lorsque les cellules sont exposées 7 jours à un DAS de 2,155 W/kg, conduisent potentiellement à une réorientation de la différenciation cellulaire vers une différenciation neuronale, ou à une augmentation de leur prolifération ($9,84 \pm 0,47$; + 6,94 % par rapport au SHAM)(Figure 52B). Par ailleurs, une augmentation du nombre de cellules microgliales est observée ($13,39 \pm 0,37$; 8,01 % par rapport au SHAM)(Figure 52C).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats met en évidence, suite à une exposition aux RF, une modification des « pools » des types cellulaires de la population neurogliale obtenus à partir des cellules B1 issues de la SVZ. C'est la première fois que les effets néfastes des RF sur la neurogenèse sont démontrés.

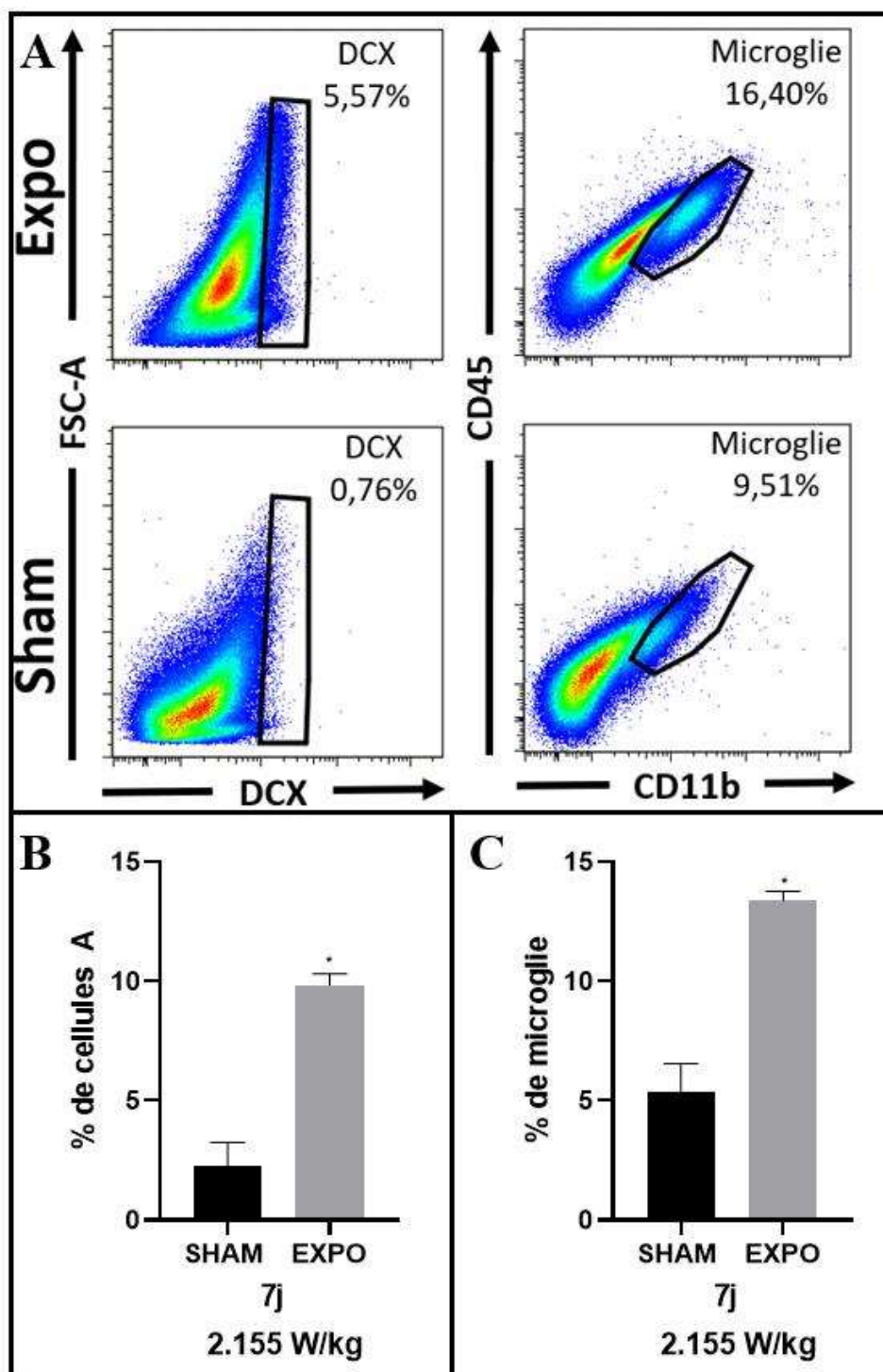


Figure 52 : Augmentation des populations de neuroblastes et de cellules microgliales suite à une exposition aux RF.

Pourcentages de NSCs différenciées et de cellules microgliales identifiées par des marqueurs spécifiques en FACS.

(A) « Gathering Strategies » pour analyser les suspensions cellulaires entière.

(B) Fréquence des cellules DCX+ (n = 4 ; un minimum de 300 000 événements analysés par réplica ; * p < 0,05).

(C) Fréquence des cellules CD11 + / CD45 + (n = 4 ; un minimum de 300 000 événements analysés par réplica ; * p < 0,05).

1.2.4. Recherche des mécanismes d'action

Les résultats précédents montrent qu'une exposition aux RF affecte la différenciation cellulaire des OPC et des astrocytes. Afin de déterminer l'origine de la modification de ces populations cellulaires, des doubles marquages par immunocytochimie et FACS ont été réalisés.

Dans un premier temps, un double marquage Olig2 / Ki67 a permis de vérifier si l'augmentation du nombre d'OPC était due à une prolifération excessive. Les résultats montrent que sous l'effet d'une exposition aux RF, le nombre d'OPC en prolifération est effectivement significativement augmenté (Figure 53). Cette augmentation va de + 83,70 % lorsque les cellules sont exposées 3 jours à un DAS de 0,083 W/kg à +291,20 % lorsque les cellules sont exposées 7 jours à un DAS de 2,155 W/kg (Tableau 11). Ainsi, l'augmentation de cette population cellulaire peut expliquer le phénomène d'augmentation de la croissance cellulaire entre la fin des expositions et le jour 10.

Tableau 11 : Effets des RF sur la prolifération cellulaire des OPC

OPC en prolifération		
	Moyenne (%) ± SEM	Différence par rapport au SHAM (0 W/kg)
Jour 3 DAS 0,083 W/kg	183,70 ± 21,00	+ 83,70%
Jour 3 DAS 2,155 W/kg	264,40 ± 16,76	+ 164,40 %
Jour 7 DAS 0,083 W/kg	187,70 ± 26,85	+ 87,70 %
Jour 7 DAS 2,155 W/kg	391,20 ± 64,09	+291,20 %

L'analyse des coefficients de Spearman met en évidence une corrélation entre le DAS et le nombre d'OPC en prolifération (Figure 52B). En effet, quel que soit la durée d'exposition, l'augmentation du DAS entraîne une augmentation du nombre d'OPC en prolifération qui est significative au niveau maximum de 2 W/kg.

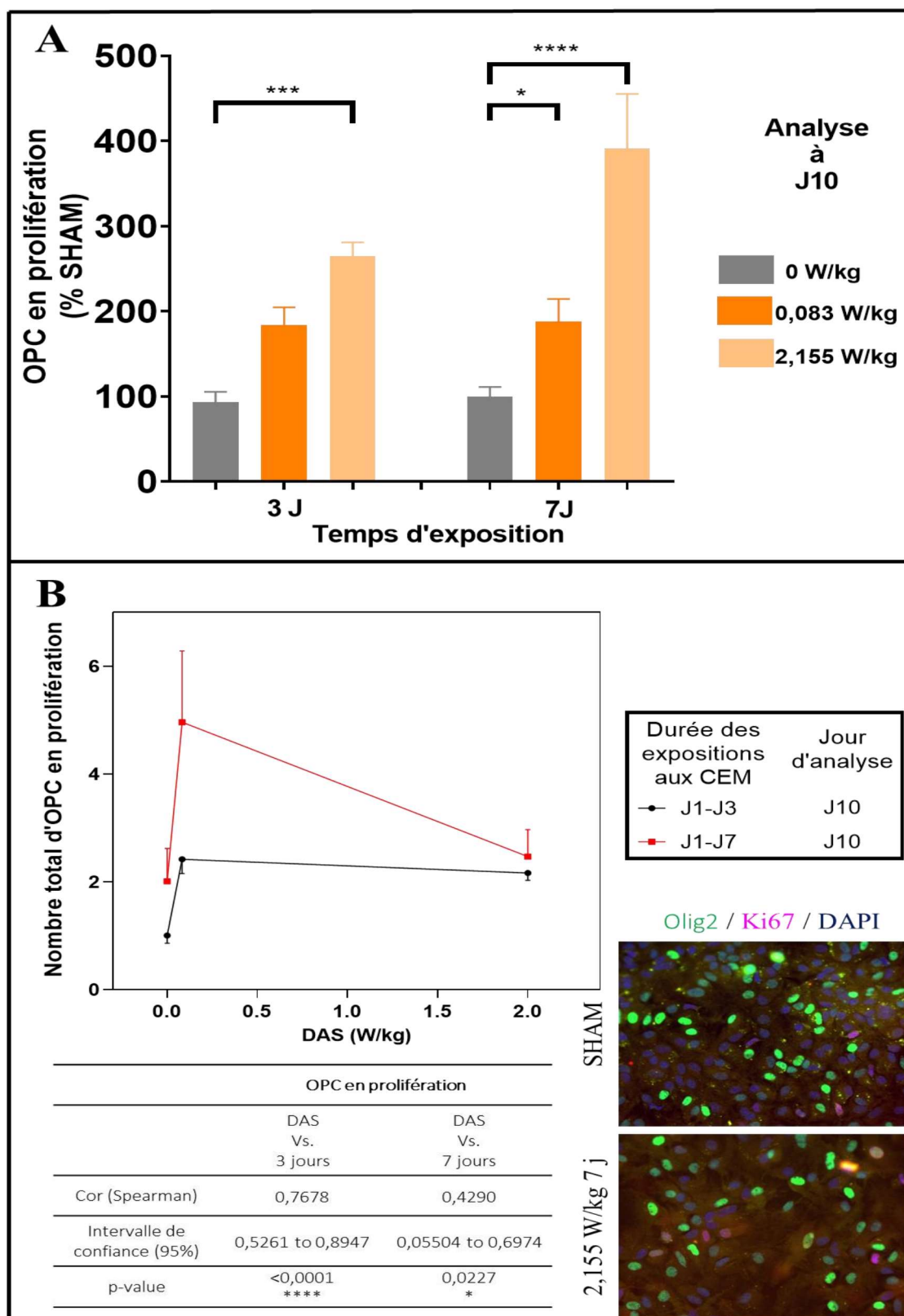


Figure 53 : Effets d'une exposition aux RF sur la prolifération cellulaire des OPC

- (A) L'exposition aux RF conduit à l'augmentation du nombre d'OPC en prolifération ($n = 9$; environ 200 cellules analysées par réplica ; $**p < 0,01$).
- (B) Corrélation par le DAS et observations microscopiques des OPC en prolifération en condition SHAM et exposées à 2,155 W/kg pendant 7 jours.

Dans un second temps, un double marquage ACSA2 / « Live Dead » a permis de vérifier si la diminution du nombre d'astrocytes (marqués par l'anticorps ACSA 2) est due à un phénomène de mort cellulaire par apoptose, le marquage « Live Dead » permet de discriminer les cellules apoptotiques. Suite à une exposition aux RF, le nombre d'astrocytes en phase apoptotiques semblent effectivement augmenter sans pour autant que cette augmentation apparaisse statistiquement significative (Figure 54A et B).

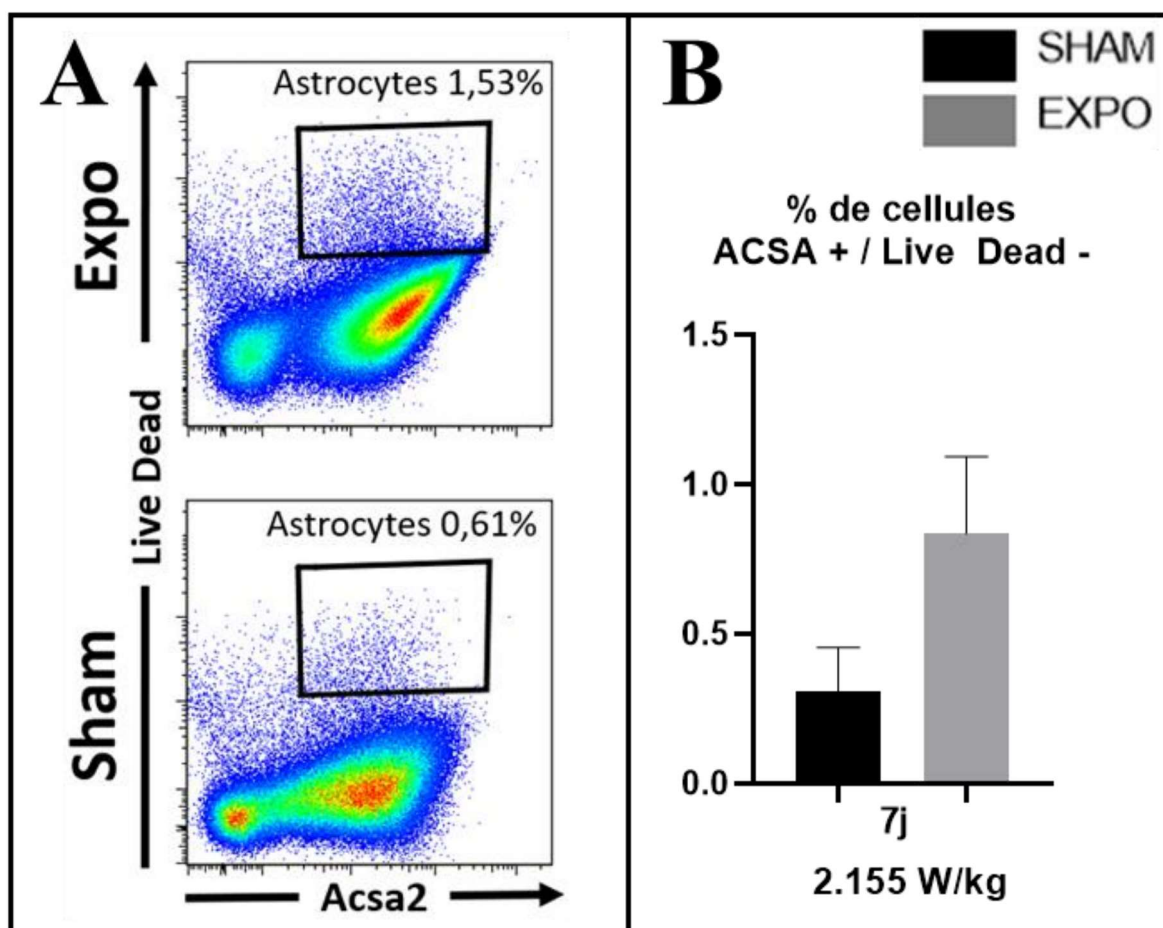


Figure 54 : Effets d'une exposition aux RF sur l'apoptose cellulaire des astrocytes.

(A) « Gathering Strategies » pour analyser les suspensions cellulaires entière.

(B) Fréquence des cellules ACSA + / Live Dead + ($n = 4$; un minimum de 300 000 événements analysés par réplica ; ns $p > 0,05$).

Ces données suggèrent que les RF induisent une prolifération excessive des OPC par rapport à la condition contrôle et qu'elles conduisent les astrocytes vers des processus d'apoptose.

1.3. Schéma bilan

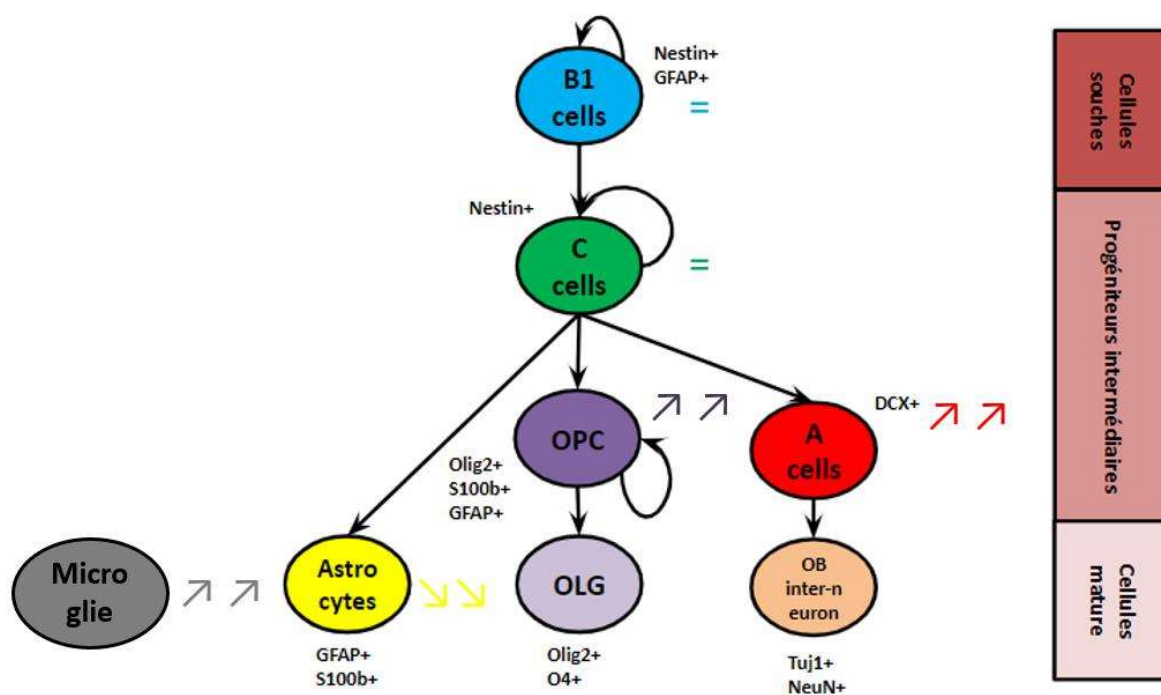


Figure 55 : Représentation schématique des effets des RF dans le modèle in vitro de V-SVZ.

2. Approche transcriptomique

2.1. Contexte de l'étude

L'analyse transcriptomique vise à analyser le niveau d'expression de tous les ARNs synthétisés par une cellule donnée ou un tissu donné à un instant spécifique et dans un état physiologique précis. Cette approche permet de mettre en évidence, par exemple, un ensemble de gènes dont l'expression sera dérégulée de façon caractéristique dans le cadre d'une pathologie donnée, en le comparant à l'état physiologique sain. A ce jour, il n'existe aucune étude transcriptomique visant à analyser les effets d'une exposition aux RF sur les cellules de la V-SVZ.

Dans cette approche, des NSCs issues de la SVZ ont été exposées à un signal GSM 900 MHz à 2,155 W/kg pendant 7 jours. L'analyse transcriptomique a été réalisée à la fin des 7 jours et au jour 10 afin de tester si les effets observés après 7 jours d'exposition étaient maintenus ou réversibles après 3 jours sans exposition. Ce modèle a permis d'évaluer les profils transcriptomiques et de chercher les potentiels processus moléculaires et voies majeures pouvant être impliquées dans les résultats obtenus avec les approches cellulaires précédentes.

2.2. Analyse qualitative des échantillons

La première analyse statistique a été réalisée par le bio-informaticien de la plateforme GenomEast. Pour rappel, pour chaque échantillon, les petits fragments nucléotidiques appelés « reads » séquencés à partir des banques d'ADNc, sont alignés sur la séquence du génome de souris afin de connaître le gène qui leur est associé. De ce fait, pour chaque gène, le nombre de « reads » alignés est obtenu, qui est ensuite normalisé par rapport à la taille du gène, ce qui rend compte de l'expression du gène. Ainsi, plus le nombre de reads alignés est grand, plus le gène est exprimé. Il est ainsi établi l'expression de tous les gènes dans chaque échantillon et plusieurs tests sont réalisés pour comparer les échantillons entre eux.

La figure 56 représente l'analyse de la « distance entre les échantillons ». Elle est basée sur l'expression de l'ensemble des gènes. Les échantillons sont regroupés entre eux (« clusterisation ») selon qu'ils présentent des profils d'expression similaires ou non. Ceci est également objectivé par l'intensité de la couleur bleue dans la comparaison des échantillons deux à deux. Le dendrogramme permet de voir que les échantillons d'une même condition (SHAM ou EXPO) sont très proches entre eux car ils se "clusterisent" ensemble. De plus, les groupes 7 jours et 10 jours apparaissent également « clusterisés » montrant une différence d'expression visible entre ces deux conditions expérimentales. Ceci laisse présager qu'il existe une grande homogénéité entre les échantillons d'une même condition et une grande hétérogénéité entre les conditions SHAM et EXPO.

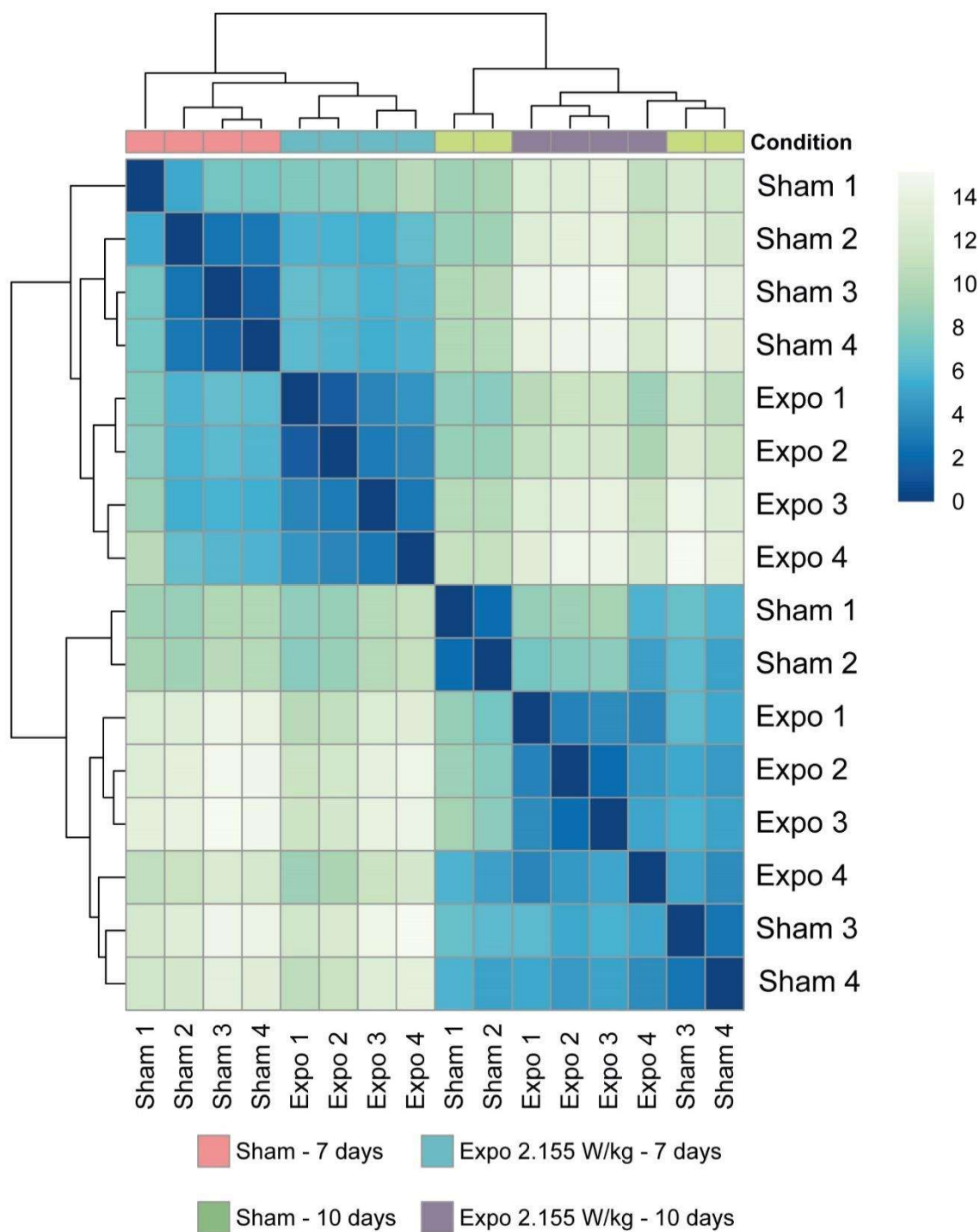


Figure 56 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons SHAM et EXPO de NSCs in vitro de la V-SVZ

Ce graphique permet de regrouper les échantillons selon leur profil d'expression et leur homogénéité. Plus les échantillons sont proches plus la couleur est intense.

L'analyse des "composantes principales" (PC ou « *Principal Component* ») se base sur la capacité de réduire le nombre de variables d'un jeu de données à uniquement deux composantes principales (Figure 57). Ainsi, le nombre de PC est toujours inférieur ou égal au nombre de variables d'origine. L'axe PC1 représente la direction la plus importante correspondant à celle offrant une plus grande dispersion des échantillons. L'axe PC2 représente la seconde direction la plus importante après PC1. Plus deux échantillons vont être différents selon les variables prises en compte lors de l'analyse bio-informatique, plus la distance entre eux sera grande sur les axes. Ici, l'analyse confirme les résultats précédents de la distance entre les échantillons. Les échantillons au sein d'une même condition sont bien « clustérisés » témoignant d'une grande homogénéité. Les conditions sont éloignées montrant une hétérogénéité dans les profils transcriptomiques entre elles.

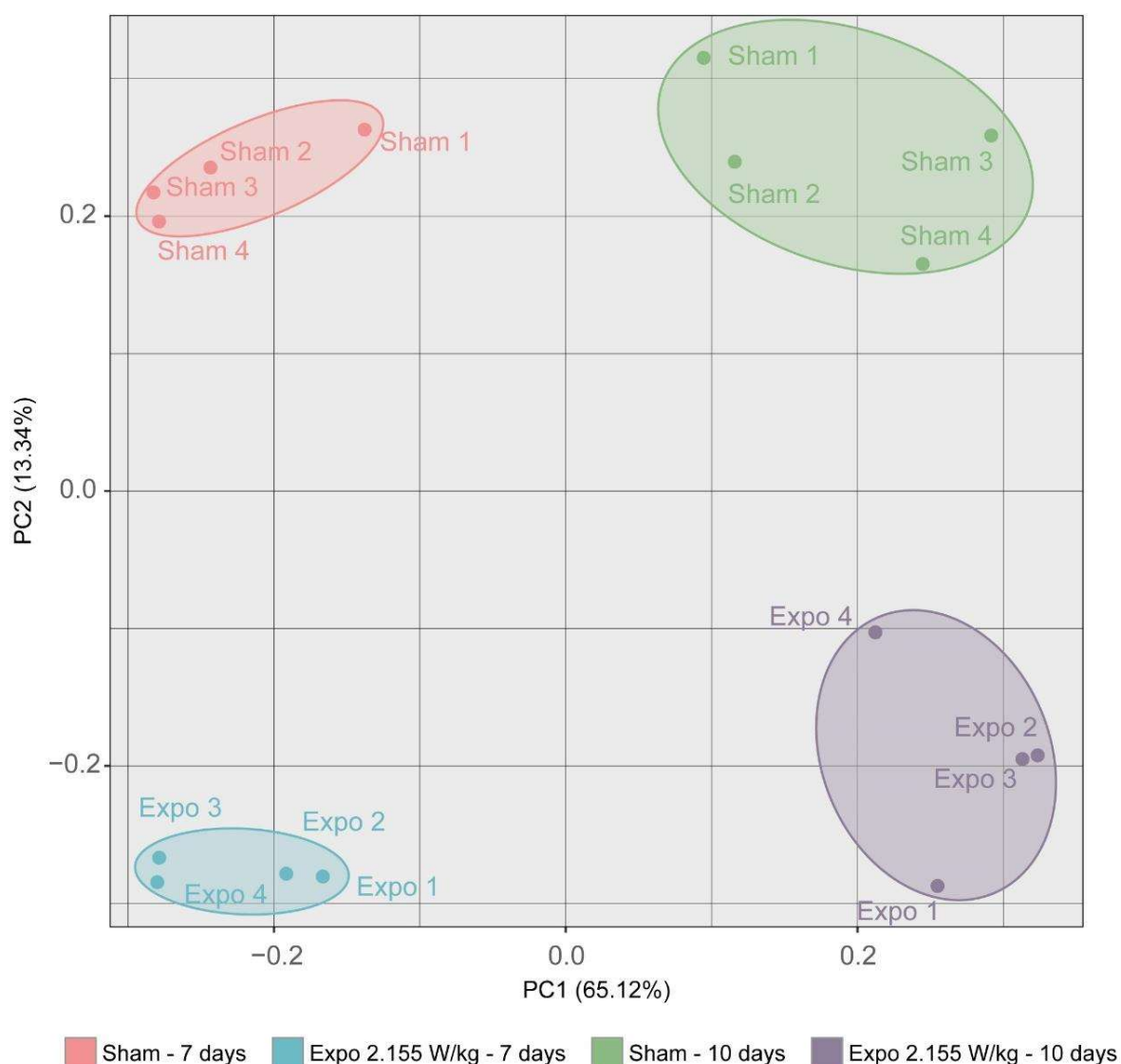


Figure 57 : Analyse des composantes principales (« Principal Component » ou PC)

Pris dans leur ensemble, ces analyses primaires montrent une grande homogénéité entre les échantillons d'une même condition et une grande hétérogénéité entre les conditions SHAM et EXPO.

Pour réaliser l'analyse différentielle, le niveau d'expression de chaque gène est comparé entre deux conditions afin d'établir le Fold Change (FC), généralement exprimé en logarithme de base 2 (Log2). Les tests statistiques sont appliqués pour connaître la "p-value" des comparaisons. Afin de comparer des listes contenant un grand nombre de gènes, on utilise une p-value ajustée. Ces résultats de séquençage des 16 échantillons montrent un nombre de gènes modulés très variables entre les différents groupes expérimentaux, mettant en évidence, ici aussi, une hétérogénéité dans les échantillons (Tableau 12). A la fin du temps d'exposition, 666 gènes sont significativement modulés dont 125 gènes surexprimés et 541 gènes sous-exprimés. Au bout des 10 jours, 576 gènes sont significativement modulés dont 141 gènes sur-exprimés et 435 gènes sous-exprimés. Enfin, l'analyse des gènes communs à la fin du temps d'exposition et du jour 10 met en évidence 271 gènes significativement modulés dont 22 gènes sur-exprimés et 248 gènes sous-exprimés.

Tableau 12 : Nombre de gènes significativement modulés sur 16 échantillons de NSCs de la V-SVA en condition SHAM ou EXPO (ancien « cut-off »)

Les 16 échantillons sont répartis en 4 échantillons par groupe exoérilental.

Les critères de significativité sont un $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1$ pour les gènes surexprimés et un $\text{Log}_2(\text{FC}) < 1$ pour les gènes sous-exprimés et p -ajustée $< 0,05$ comme seuil de significativité.

	Comparaison	Nombre de gènes significativement surexprimés	Nombre de gènes significativement sous-exprimés	Nombre de gènes significativement modulés
7 jours DAS de 2,155 W/kg Analyse à J7	EXPO vs SHAM	125	541	666
7 jours DAS de 2,155 W/kg Analyse à J10	EXPO VS SHAM	141	435	576
Gènes communs aux jours d'analyse 7 et 10	EXPO VS SHAM	22	248	271

Ces données sont retrouvées dans le rapport S20124 (Annexe 1).

Afin d'affiner les résultats, une seconde analyse a été réalisée. Les choix de sélection (« cut-off ») était très large. Ce dernier a été augmenté afin d'éliminer les gènes dont l'expression a été peu induite/réprimée ou alors de façon peu significative. Ainsi, le nouveau « cut-off » est le suivant : $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1$ et une p value ajustée $< 0,01$ (Tableau 13).

Tableau 13 : Nombre de gènes significativement modulés sur 16 échantillons de NSCs de la V-SVA en condition SHAM ou EXPO (nouveau « cut-off »).

	Comparaison	Nombre de gènes significativement surexprimés	Nombre de gènes significativement sous-exprimés	Nombre de gènes significativement modulés
7 jours DAS de 2,155 W/kg Analyse à J7	EXPO vs SHAM	76	413	489
7 jours DAS de 2,155 W/kg Analyse à J10	EXPO VS SHAM	69	328	397
Gènes communs aux jours d'analyse 7 et 10	EXPO VS SHAM	19	206	225

2.3. Analyse des résultats

2.3.1. Effets des RF après une exposition à 2,155 W/kg pendant 7 jours : analyse au jour 7

Dans cette condition, l'effet d'une exposition aux RF est recherché juste à la fin de l'exposition de 7 jours.

L'analyse statistique montre que 7 jours d'exposition à 2,155 W/kg induit la modulation au total de 489 gènes dont 76 sont surexprimés et 413 sous-exprimés (annexe 2). Une analyse fonctionnelle a été réalisée grâce à deux bases de données en ligne STRING et DAVID. Ces deux sites regroupent les protéines (issues de la traduction des gènes) en groupes fonctionnels ou clusters, selon des critères tels l'appartenance à une même famille, l'implication dans une même voie de signalisation, ou encore la présence d'interactions entre elles (De Souza et *al.*, 2018).

Selon les clusters fonctionnels de STRING et DAVID, les 413 gènes sous-exprimés après 7 jours d'expositions à 2,155 W/kg incluaient 176 gènes impliqués dans le processus développemental ($p = 5,03 \times 10^{-15}$) et plus particulièrement des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (126 gènes, $p = 1,07 \times 10^{-11}$) et la régulation cellulaire (67 gènes, $p = 1,78 \times 10^{-6}$) (Figure 58). Les types cellulaires dont la différenciation est dérégulée sont les neurones (43 gènes, $p = 1,74 \times 10^{-5}$), les cellules épithéliales (20 gènes, $p = 0,0258$), les cellules gliales (10 gènes, $p = 0,0224$), les oligodendrocytes (7 gènes, $p = 0,0089$) et les cellules épithéliales multi-ciliées (3 gènes, $p = 0,0170$).

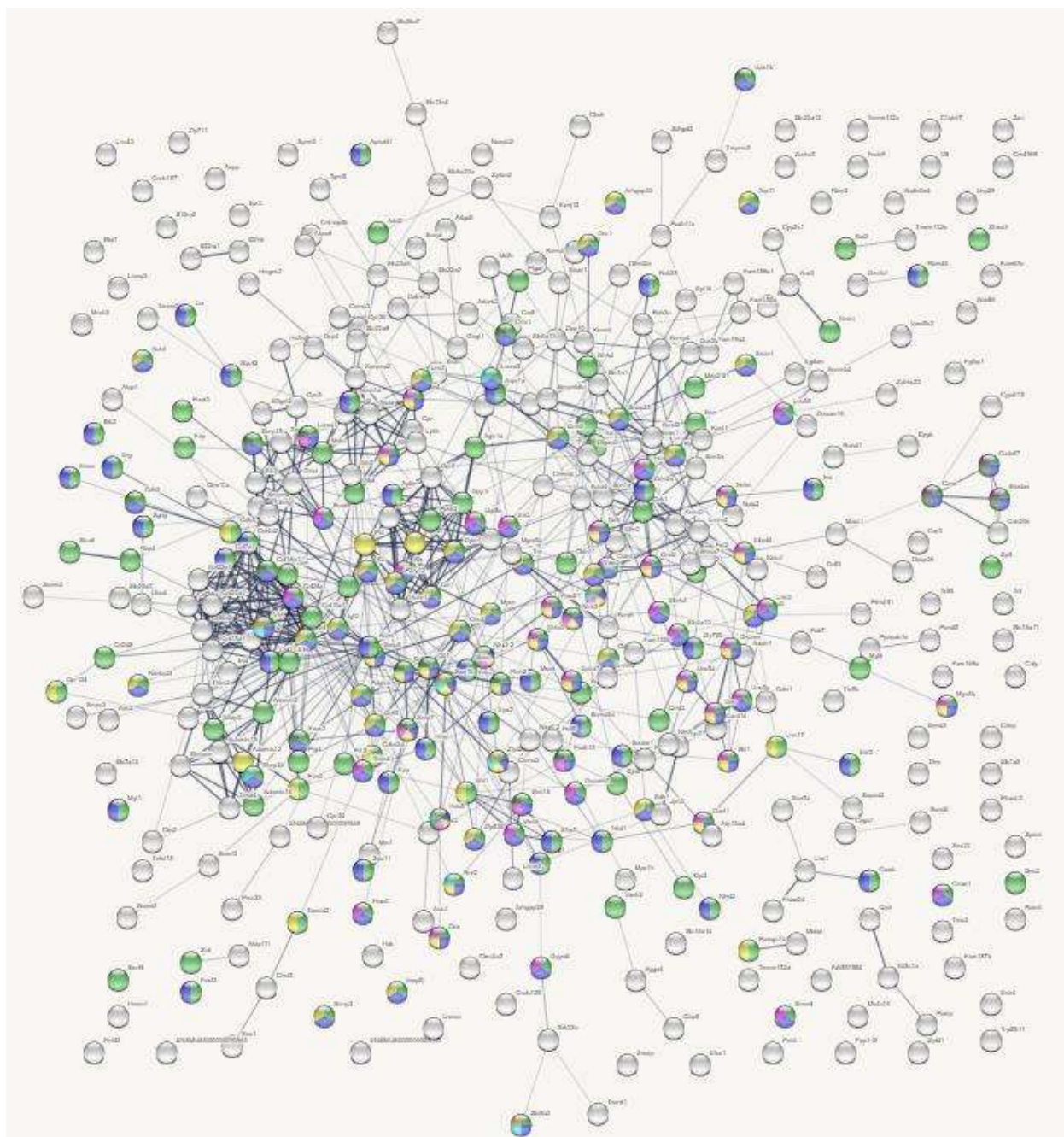


Figure 58 : Relation fonctionnelle entre les 176 gènes sous-exprimés impliqués dans les processus développementaux.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans les « processus développementaux » et plus particulièrement la « différenciation cellulaire » et la « régulation de la différenciation cellulaire ». Les types cellulaires touchés sont les neurones, les cellules épithéliales, les cellules gliales, les oligodendrocytes et les cellules épithéliales multi-ciliées.

Le second cluster identifié est en lien avec des gènes impliqués dans le « potentiel d'action » (8 gènes, $p = 0,0088$) et la « régulation du potentiel membranaire post-synaptique » (7 gènes, $p = 0,0014$) (Figure 59). Plus précisément les gènes sont impliqués dans le « potentiel d'action neuronal » (6 gènes, $p = 0,0014$) et la « modulation du potentiel postsynaptique excitateur » (5 gènes, $p = 0,0287$).

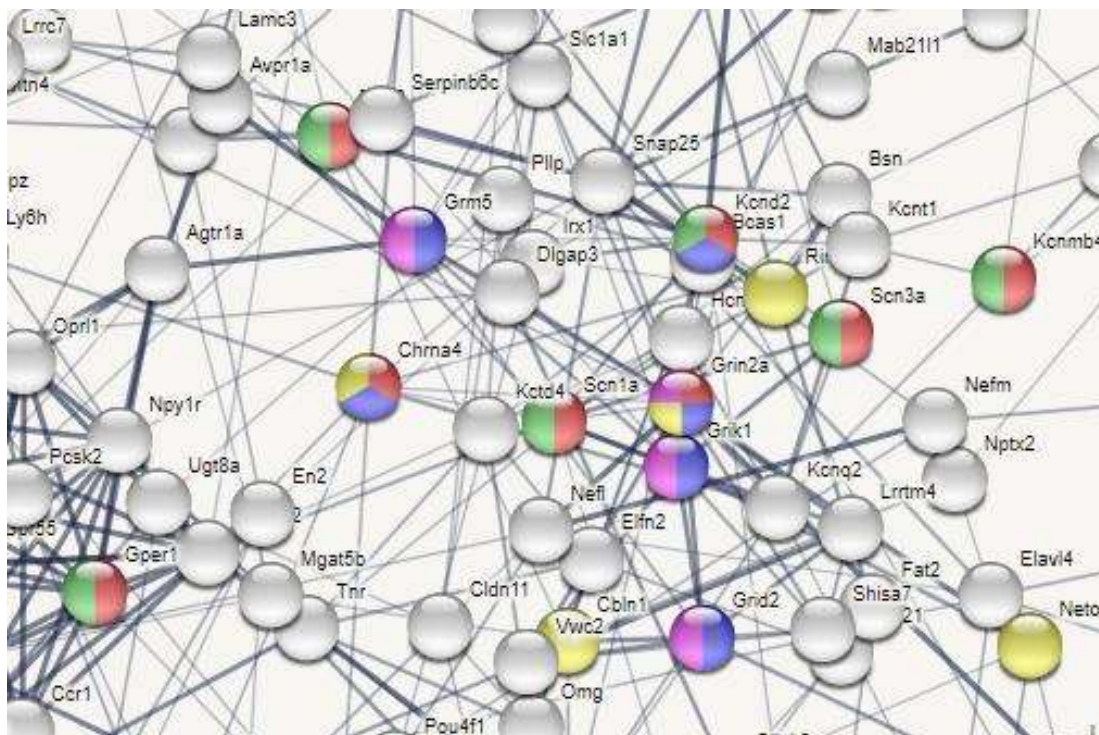


Figure 59 : Relation fonctionnelle entre les 14 gènes sous-exprimés impliqués dans le potentiel d'action et la régulation du potentiel membranaire post-synaptique.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans les « *potentiel d'action* » la « *régulation du potentiel membranaire post-synaptique* ». Plus en détail, les gènes sont impliqués dans le « *potentiel d'action neuronal* » et la « *modulation du potentiel postsynaptique excitateur* ».

Le troisième cluster est lié au transport des ions (53 gènes, $p = 3,03 \times 10^{-7}$), notamment du potassium (15 gènes, $p = 1,79 \times 10^{-8}$), du calcium (11 gènes, $p = 0,0446$) et du sodium (11 gènes, $p = 0,0093$), et au transport des neurotransmetteurs (11 gènes, $p = 0,0090$) est identifié (Figure 60).

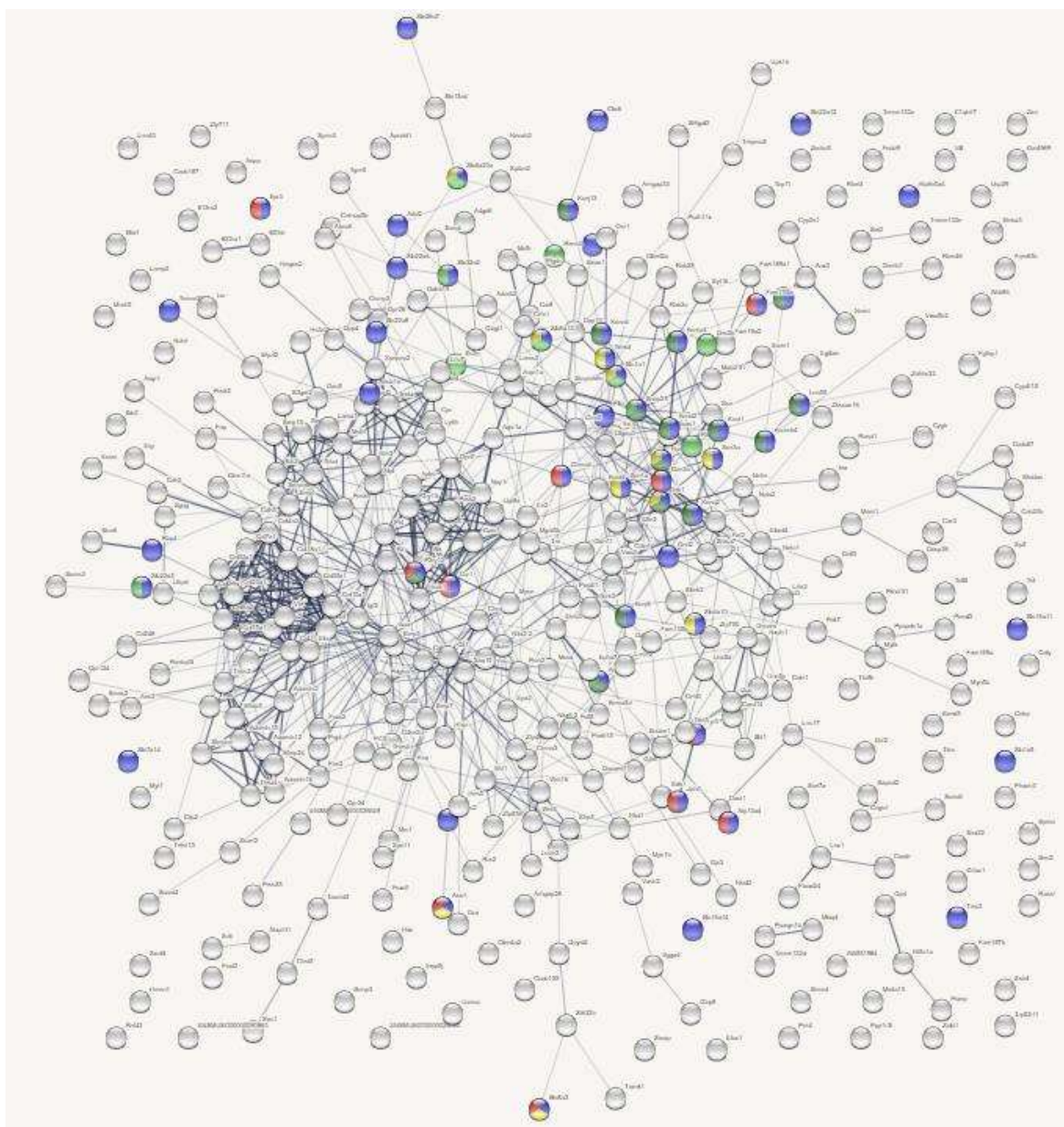


Figure 60 : Relation fonctionnelle entre les 64 gènes sous-exprimés impliqués dans le transport d'ion et de neurotransmetteurs.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans le « *transport d'ion* », notamment le *potassium*, le *calcium* et le *sodium*, et le « *transport de neurotransmetteur* ».

Enfin, le dernier cluster regroupe des gènes impliqués dans la « régulation de la voie Wnt » (13 gènes, $p = 0,0136$) et plus précisément sans sa régulation négative (11 gènes, $p = 0,0088$) ont été identifiés (Figure 61).

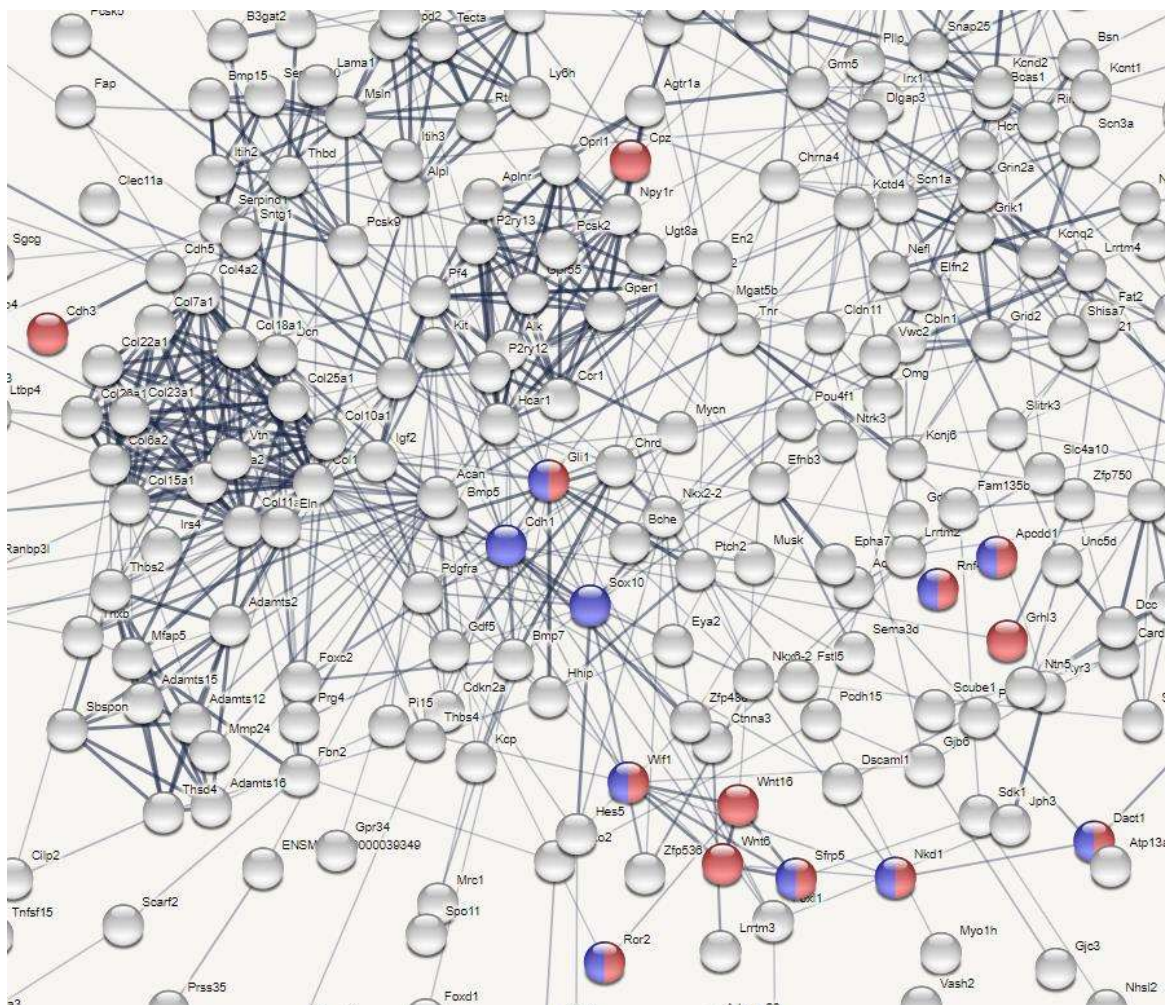


Figure 61 : Relation fonctionnelle entre les 15 gènes sous-exprimés impliqués dans la voie Wnt
Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans la « *voie Wnt* » et sa « *régulation négative* ».

Le second cluster regroupe 9 gènes impliqués dans la régulation positive de la cascade MAPK (mitogen-activated protein kinases) ($p = 0,0017$) et 7 gènes dans la régulation positive des cascades ERK1 et ERK2 ($p = 0,00035$) (Figure 63).

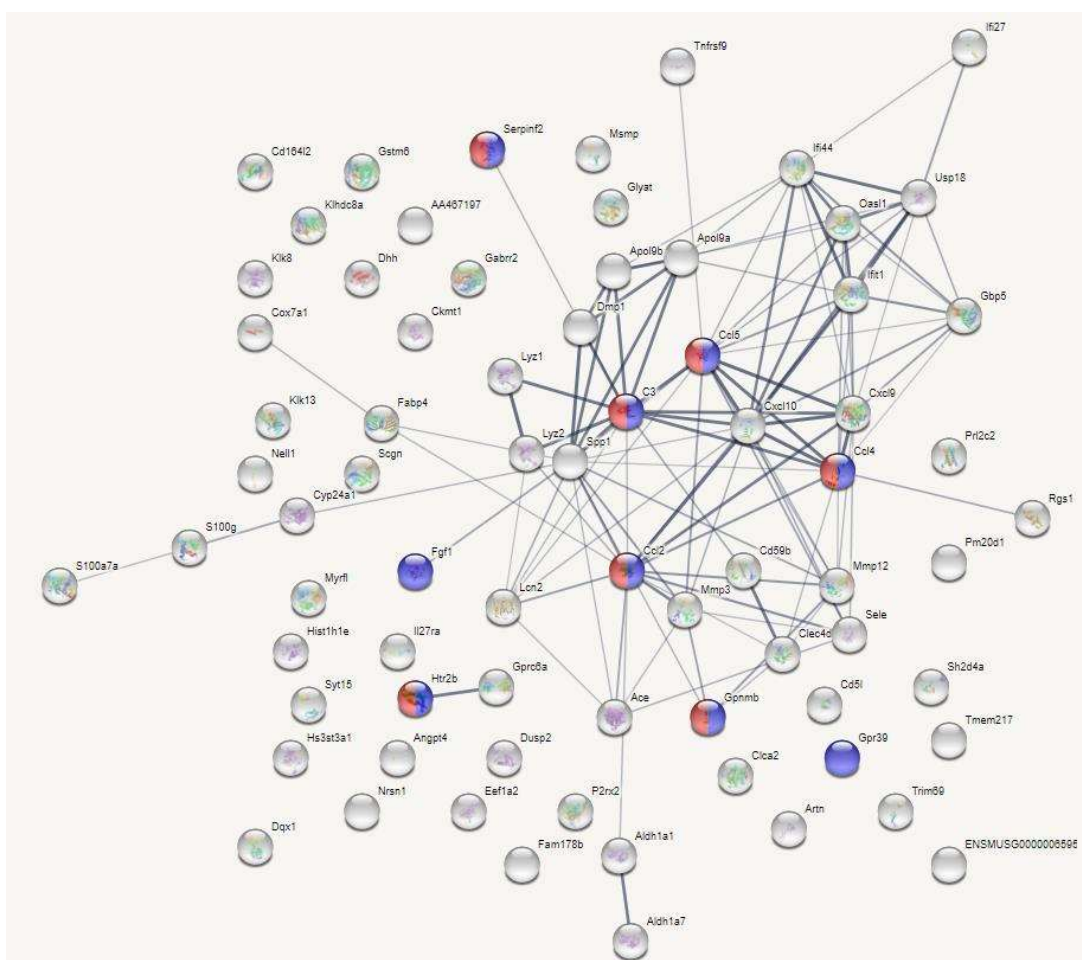


Figure 63 : Relation fonctionnelle entre les 9 gènes surexprimés impliqués dans la régulation positive de la cascade MAPK.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans la « *régulation positive de la cascade MAPK* » et plus particulièrement la « *régulation positive de la cascade ERK1 et ERK2* ».

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans l'« **homéostasie cellulaire du calcium** » et plus particulièrement la « **régulation de son transport** » et la « **régulation de sa concentration cytosolique** ».

L'étude des profils transcriptomiques juste après une exposition aux RF à 2,155 W/kg pendant 7 jours montre que les RF modulent 489 gènes dont 76 surexprimés et 413 sous-exprimés. L'analyse fonctionnelle montre une surexpression de gènes en lien avec la réponse à un stress et un état inflammatoire, l'homéostasie cellulaire du calcium et la régulation positive de la cascade MAPK. Les gènes sous-exprimés sont eux en lien avec les processus développementaux et notamment la différenciation cellulaire, le potentiel d'action neuronal, le transport d'ion et de neurotransmetteur et enfin la voie Wnt. Ceci suggère que l'exposition aux RF affecterait peut-être aussi des processus cellulaires de maturation et de plasticité cérébrale.

2.3.2. Effets des RF après une exposition à 2,155 W/kg pendant 7 jours : jour 10

Dans cette condition, l'effet d'une exposition aux RF est recherché au jour 10, soit 3 jours après la fin de l'exposition.

L'analyse statistique montre 397 gènes significativement modulés dont 69 surexprimés et 328 sous-exprimés (annexe 3).

En utilisant STRING et DAVID, les 397 gènes sous-exprimés ont été identifiés dans plusieurs clusters. Le cluster principal identifié est le « processus développemental » (124 gènes, $p = 6,16 \times 10^{-7}$) et plus particulièrement la « différenciation cellulaire » (80 gènes, $p = 0,0013$) au cours de la « neurogenèse » (53 gènes, $p = 1,61 \times 10^{-5}$) (Figure 65).

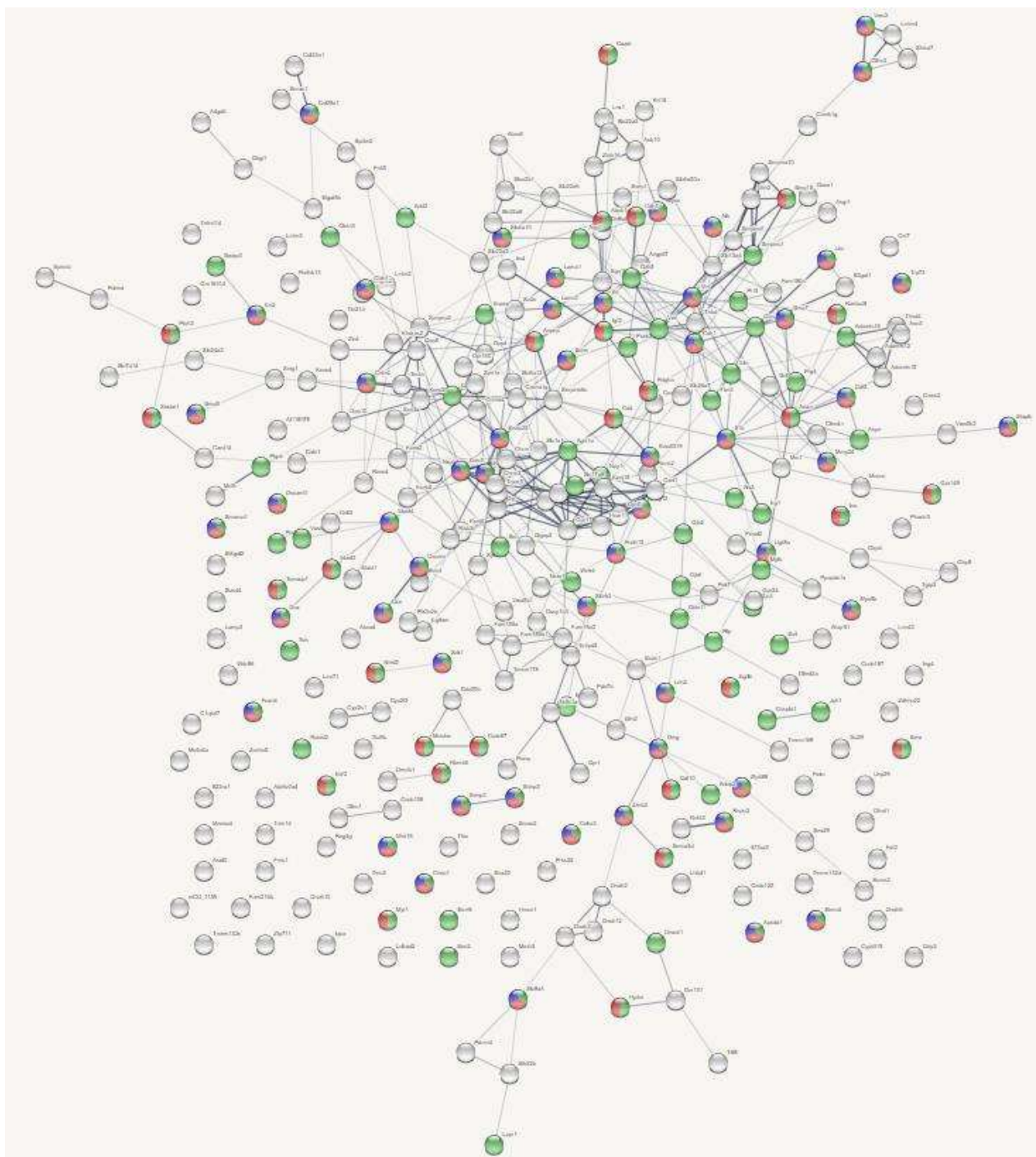


Figure 65 : Relation fonctionnelle entre les 124 gènes sous-exprimés impliqués dans les processus développementaux.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans les « processus développementaux » et plus particulièrement la « différenciation cellulaire » et la « neurogenèse ».

Le troisième cluster lié au transport des ions (38 gènes, $p = 0,00045$), notamment du potassium (11 gènes, $p = 0,0016$) et du sodium (11 gènes, $p = 0,0043$), et au transport des neurotransmetteurs (10 gènes, $p = 0,0130$) est identifié (Figure 67).

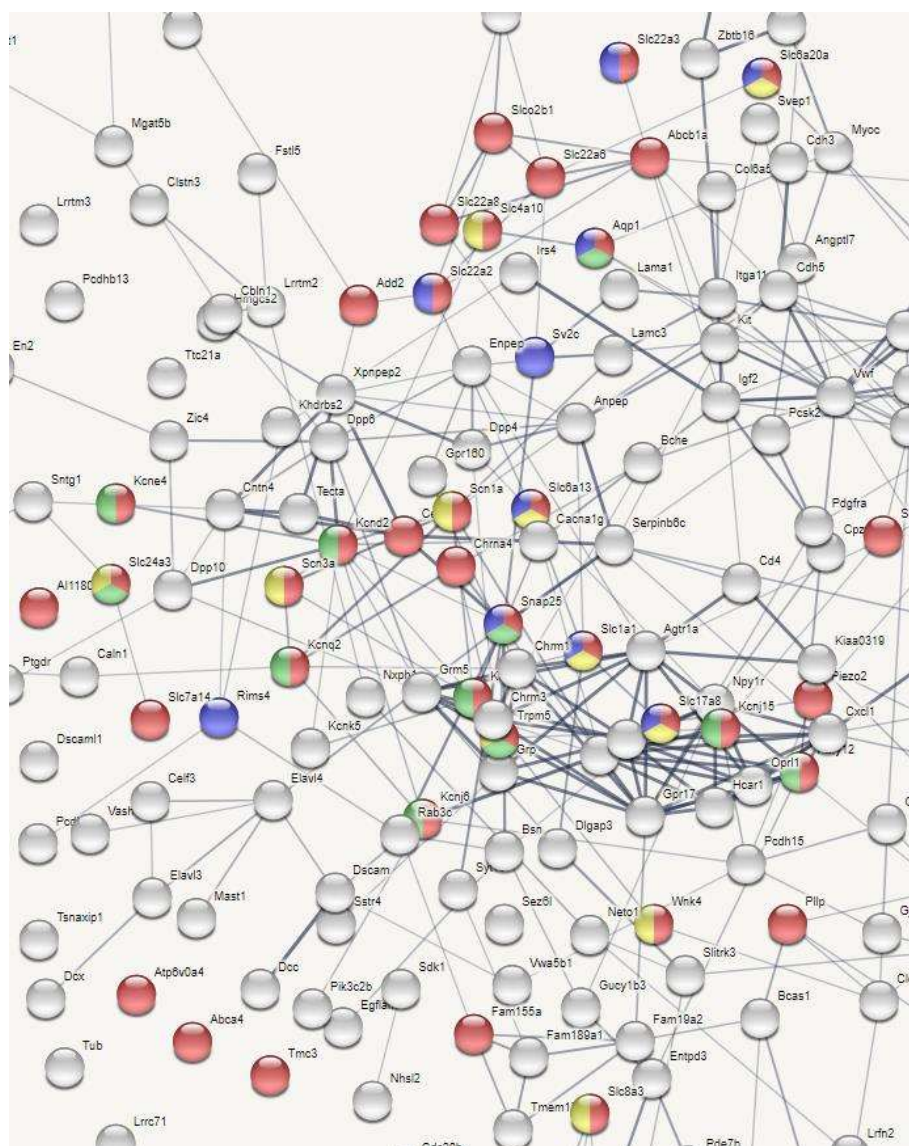


Figure 67 : Relation fonctionnelle entre les 64 gènes sous-exprimés impliqués dans le transport d'ion et de neurotransmetteurs.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans le « **transport d'ion** », notamment le **potassium** et le **sodium**, et le « **transport de neurotransmetteur** ».

Le quatrième cluster est lié à la « signalisation » (95 gènes, $p = 1,61 \times 10^{-5}$) et particulièrement « transduction du signal » (78 gènes, $p = 0,0080$) (Figure 68).

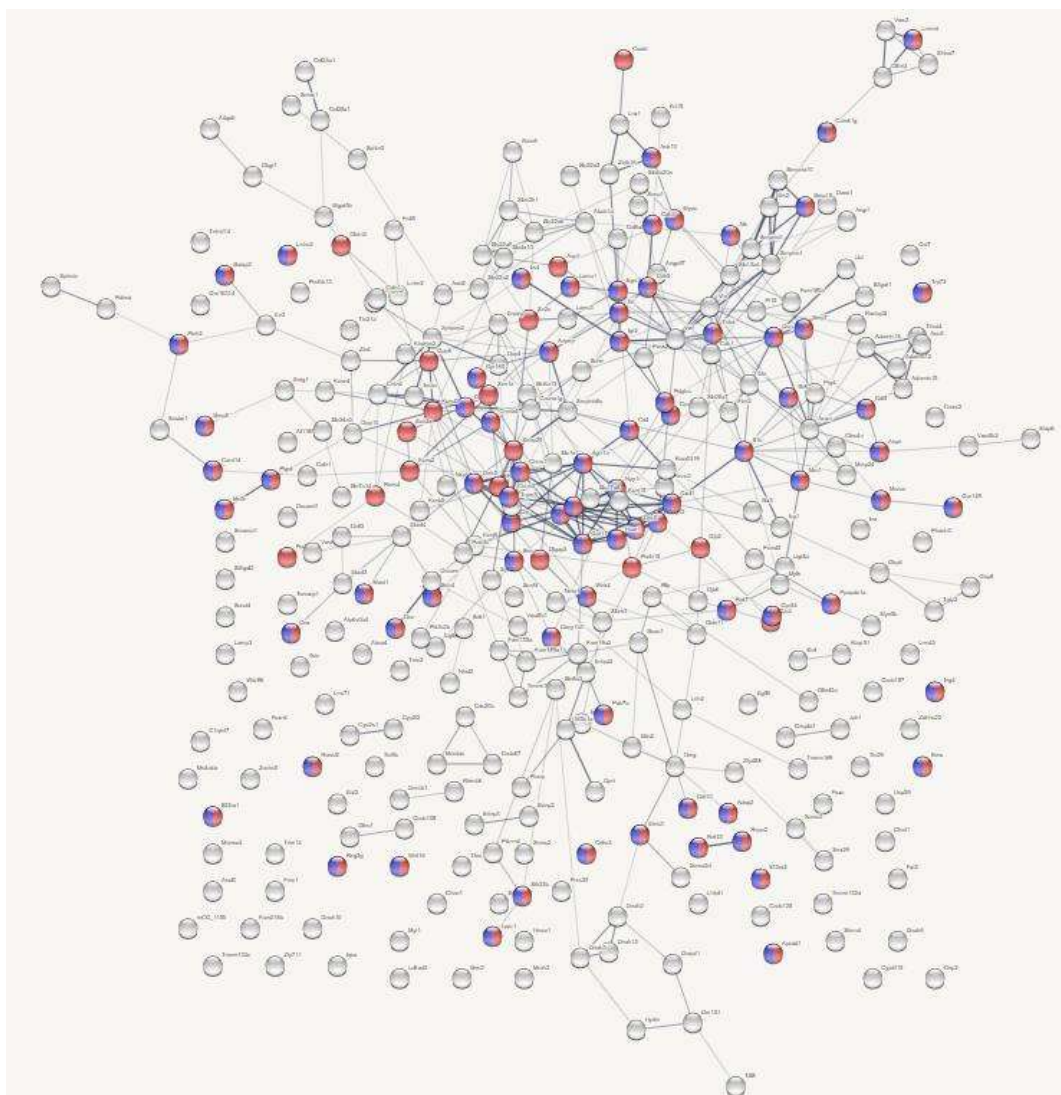


Figure 68 : Relation fonctionnelle entre les 95 gènes sous-exprimés impliqués dans la signalisation.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans la « *signalisation* », notamment la « *transduction du signal* ».

Enfin, le dernier cluster regroupe des gènes impliqués dans l' « adhésion cellulaire » (40 gènes, $p = 1,09 \times 10^{-9}$) (Figure 69).

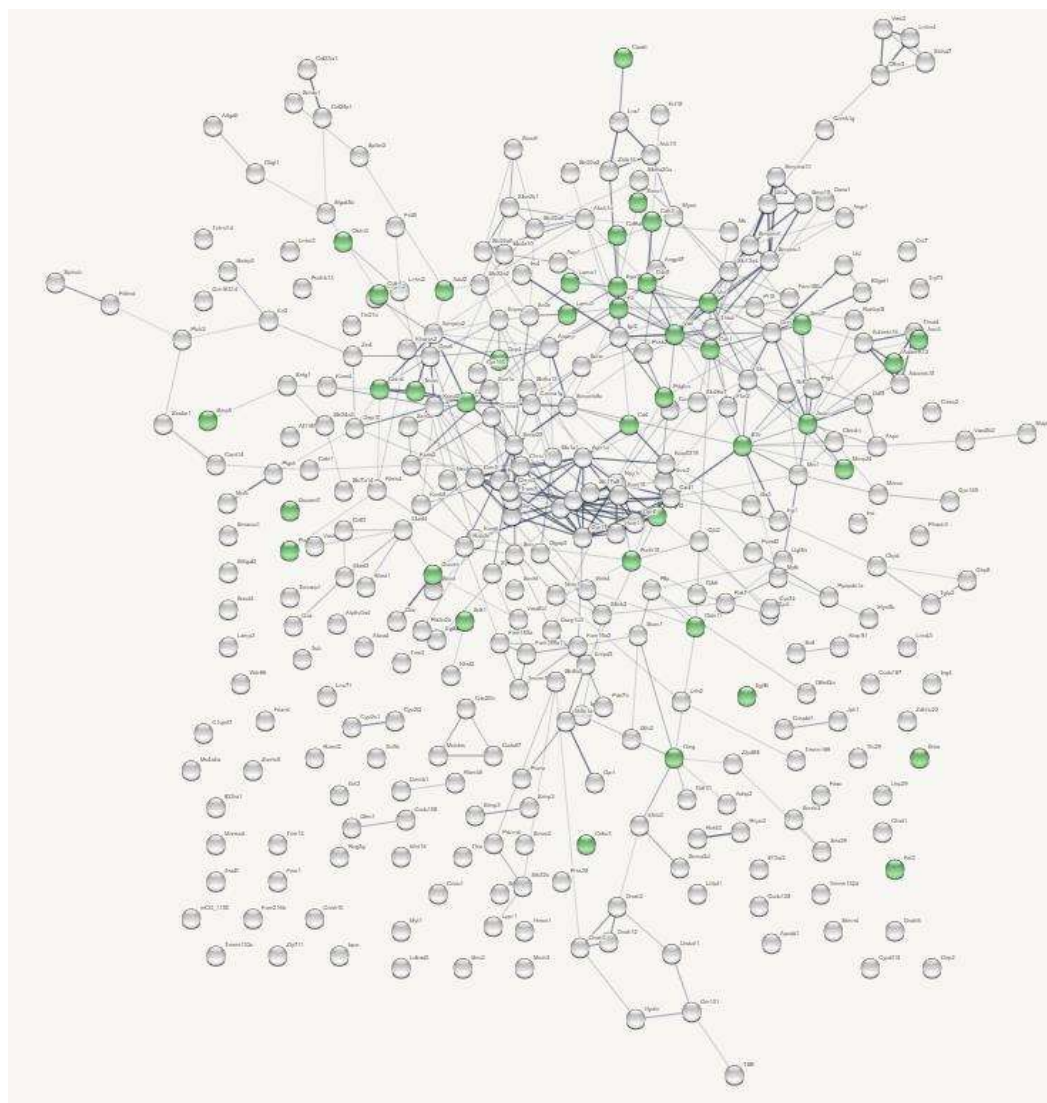


Figure 69 : Relation fonctionnelle entre les 40 gènes sous-exprimés impliqués dans l'adhésion cellulaire.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans l' « adhésion cellulaire ».

Concernant les **69 gènes surexprimés**, ils regroupés dans un seul cluster fonctionnel. Ce cluster est impliqué dans la réponse à un stimulus (38 gènes, $p = 0,0022$) et plus particulièrement à un stress (20 gènes, $p = 0,0262$) (Figure 70). Ce stress correspond à un stress oxydatif (8 gènes, $p = 0,0038$) et à la réponse à des espèces réactives de l'oxygène (7 gènes, $p = 0,00085$).

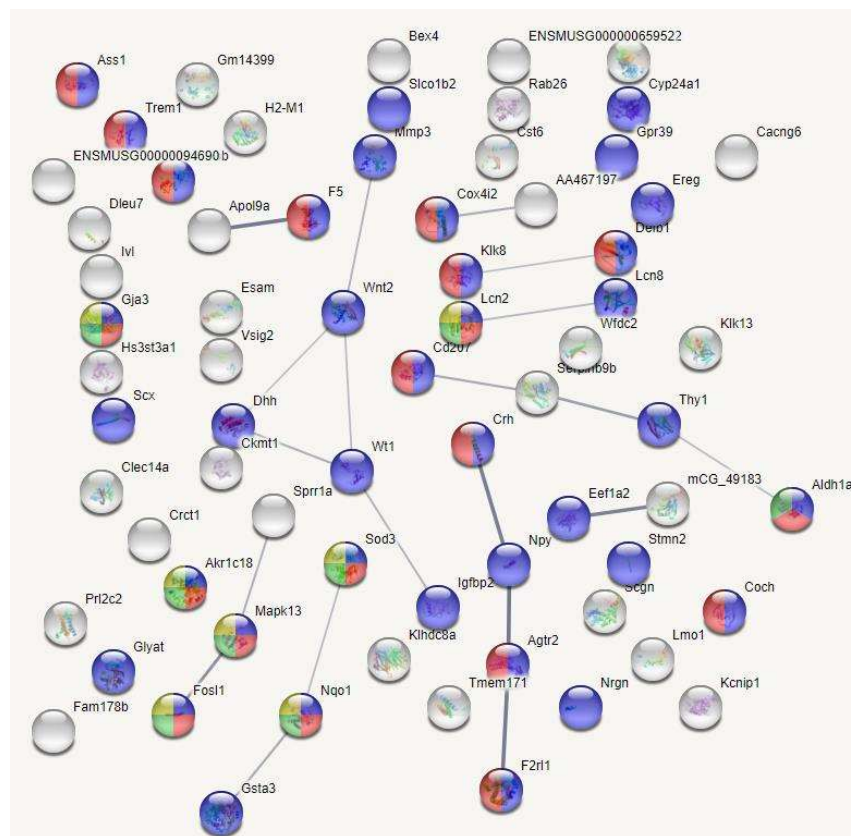


Figure 70 : Relation fonctionnelle entre les 38 gènes surexprimés impliqués dans la réponse à un stimulus

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans la « *réponse à un stimulus* » et plus particulièrement à la « *réponse à un stress* ». Plus en détail, les gènes sont impliqués dans la « *réponse à un stress oxydatif* » et la « *réponse à des espèces réactives de l'oxygène* ».

L'étude des profils transcriptomique au jour 10 après une exposition aux RF à 2,155 W/kg pendant 7 jours montre un effet significatif avec **397 gènes modulés** dont **69 surexprimés** et **328 sous-exprimés**. L'analyse fonctionnelle montre une surexpression de gènes en lien avec la réponse à un stress oxydatif et plus particulièrement la réponse aux ROS. Les gènes sous-exprimés sont eux en lien avec les processus développementaux et notamment la différenciation cellulaire lors de la neurogenèse, le transport d'ion et de neurotransmetteur, le comportement, la transduction du signal et enfin l'adhésion cellulaire.

2.3.3. Effets des RF après une exposition à 2,155 W/kg pendant 7 jours : analyse des effets immédiats maintenus, réversibles ou tardifs

L'objectif est d'analyser les gènes communs au jour 7 et 10 afin de compléter les différents clusters déjà identifiés. Il sera alors possible d'identifier les effets maintenus ou réversibles de la fin de l'exposition au jour 10 et les effets tardifs uniquement visiblement au jour 10.

L'analyse statistique montre que 225 gènes sont communément dérégulés dans les deux conditions expérimentales dont 19 surexprimés et 206 sous-exprimés (annexe 4).

Concernant les 413 gènes communs sous-exprimés, le cluster principal identifié est le « processus développemental » (84 gènes, $p = 4,54 \times 10^{-6}$) et plus particulièrement le « développement du système » (75 gènes, $p = 3,35 \times 10^{-7}$) (Figure 71). De façon détaillée, les gènes sont impliqués dans la « différenciation cellulaire » (59 gènes, $p = 0,00015$) et la « neurogenèse » (40 gènes, $p = 4,54 \times 10^{-6}$). Le type cellulaire dont la différenciation est dérégulée est les neurones (23 gènes, $p = 0,0023$).

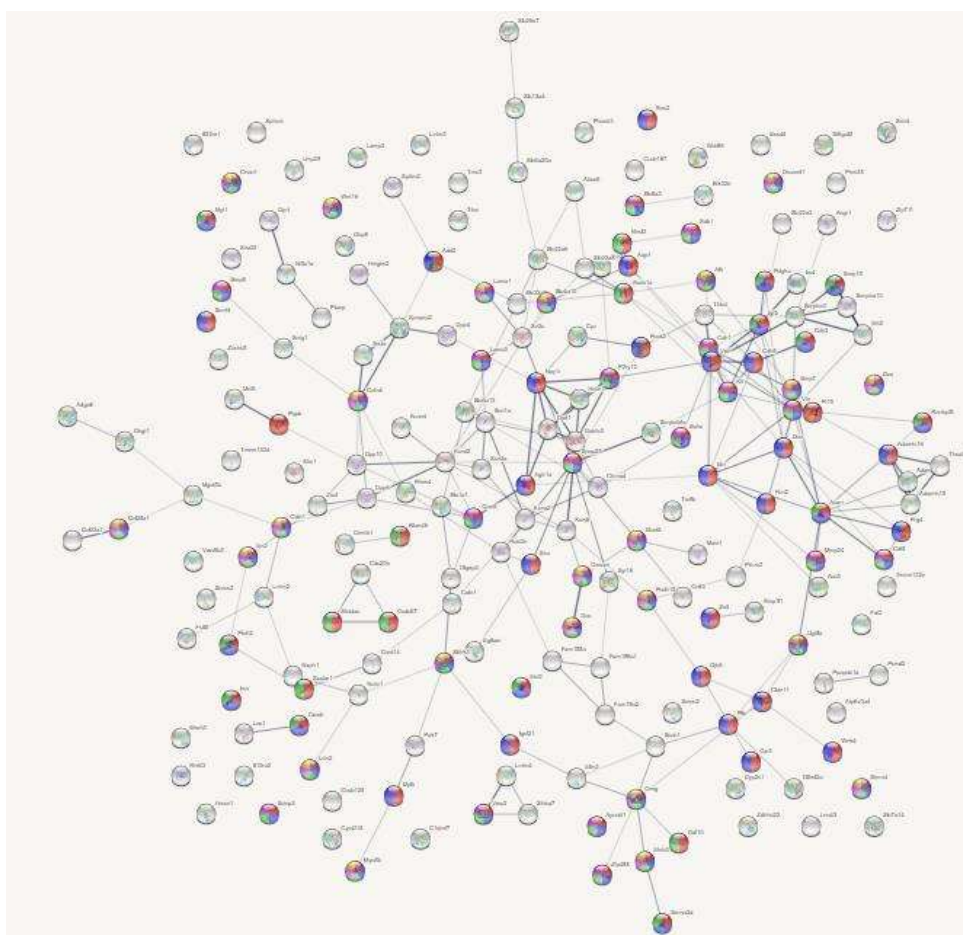


Figure 71 : Relation fonctionnelle entre les 84 gènes communs sous-exprimés impliqués dans les processus développementaux.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans les « processus développementaux » et plus particulièrement le « développement du système nerveux ». Les gènes dérégulés sont impliqués dans la « différenciation cellulaire » et la « neurogenèse ». Le type cellulaire concerné est le neurone.

Le second cluster commun est lié au transport des ions (29 gènes, $p = 0,00015$), notamment du potassium (7 gènes, $p = 0,0148$) et du sodium (8 gènes, $p = 0,0093$), et au transport des neurotransmetteurs (9 gènes, $p = 0,0022$) (Figure 72).

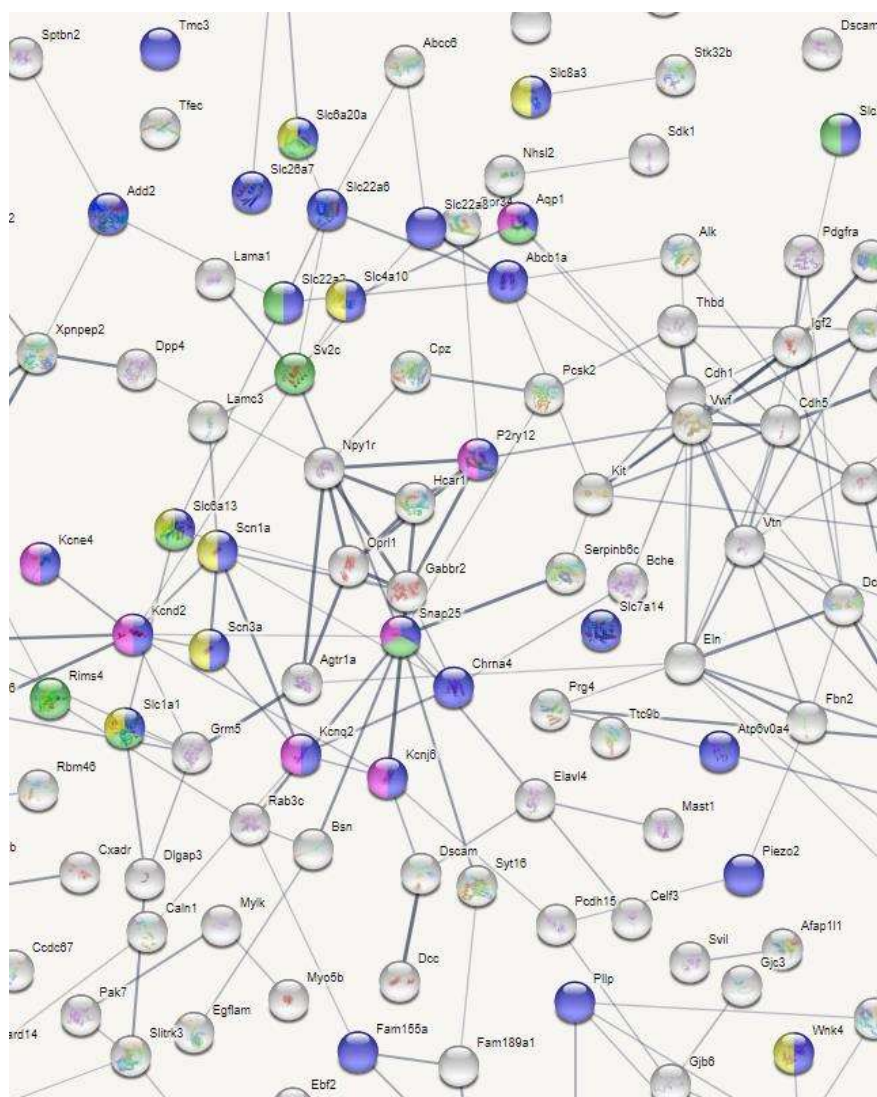


Figure 72 : Relation fonctionnelle entre les 29 gènes communs sous-exprimés impliqués dans le transport d'ion et de neurotransmetteurs.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans le « *transport d'ion* », notamment le *potassium* et le *sodium*, et le « *transport de neurotransmetteur* ».

Le troisième cluster identifié est en lien avec des gènes communs impliqués dans le « comportement » (26 gènes, $p = 3,62 \times 10^{-7}$) et plus particulièrement le « comportement locomoteur » (15 gènes, $p = 2,72 \times 10^{-6}$), l'« apprentissage » (9 gènes, $p = 0,0020$) et le « comportement adulte » (7 gènes, $p = 0,0255$) (Figure 73).

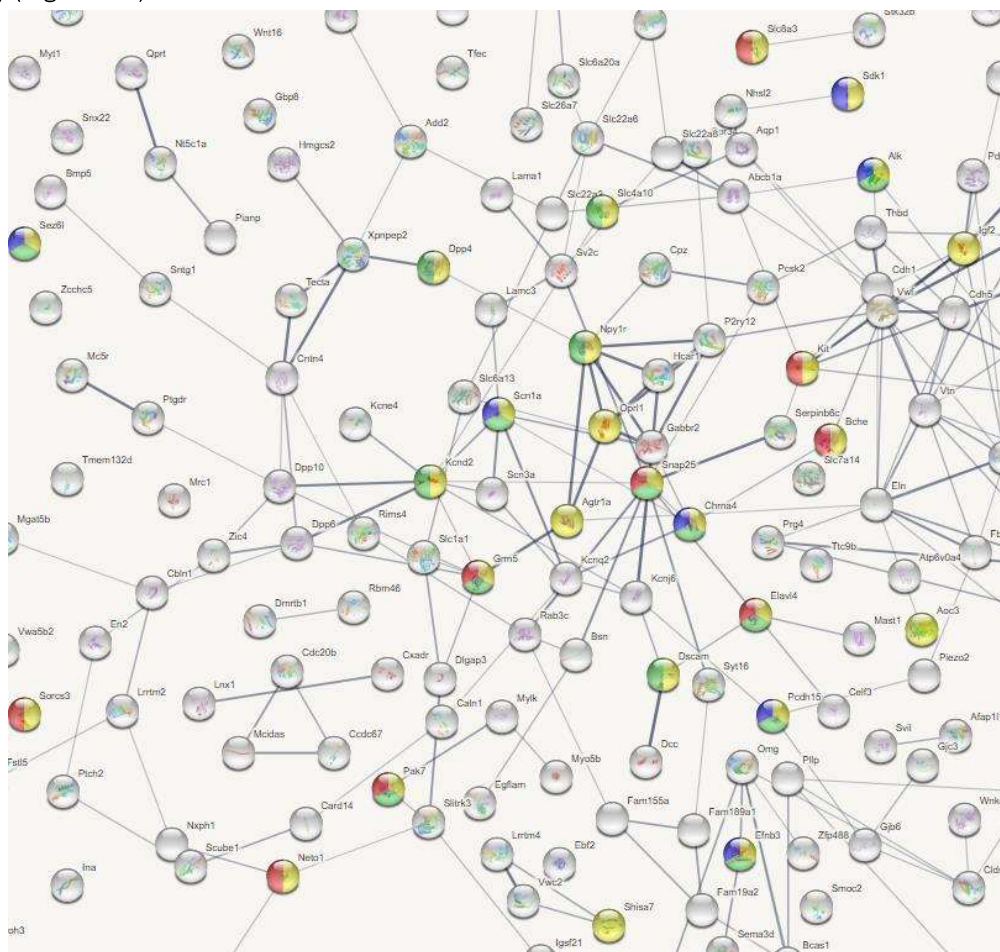


Figure 73 : Relation fonctionnelle entre les 26 gènes communs sous-exprimés impliqués dans le comportement et l'apprentissage.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans le « *comportement* » et plus particulièrement le « *comportement locomoteur* », l'« *apprentissage* » et le « *comportement adulte* ».

Le quatrième cluster est lié à la « signalisation » (60 gènes, $p = 0,0012$) et particulièrement la « signalisation cellule-cellule » (16 gènes, $p = 0,0393$) (Figure 74). Une partie des signales concerne la « transduction du signal de protéine SMAD » (5 gènes, $p = 0,0144$).

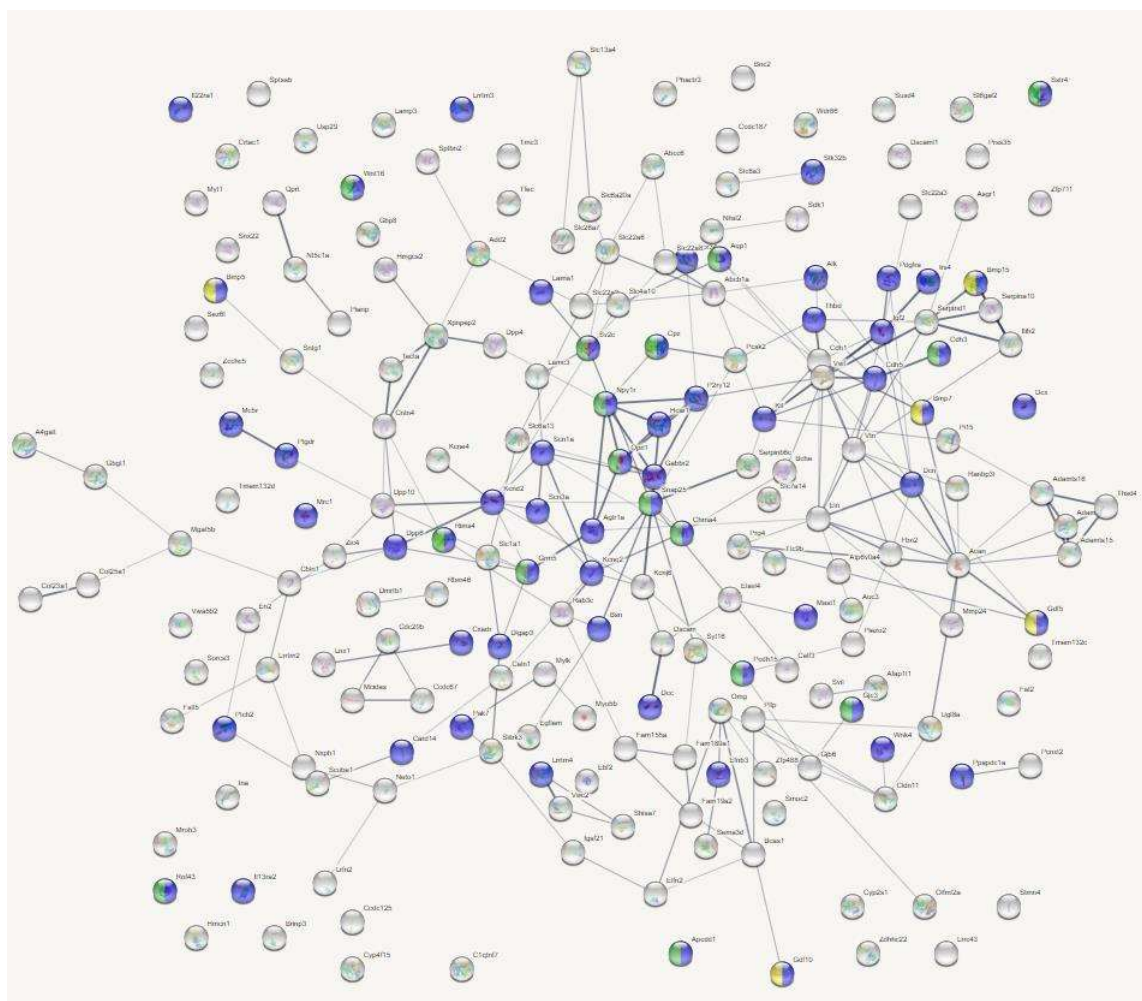


Figure 74 : Relation fonctionnelle entre les 60 gènes communs sous-exprimés impliqués dans la signalisation.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans la « signalisation », la « signalisation cellule-cellule » et plus particulièrement la « transduction du signal de la protéine SMAD ».

Enfin, le dernier cluster regroupe des gènes impliqués dans l'« adhésion cellulaire » (29 gènes, $p = 4,56 \times 10^{-8}$) et plus particulièrement l'« adhésion cellule-cellule » (18 gènes, $p = 2,72 \times 10^{-6}$) (Figure 75).

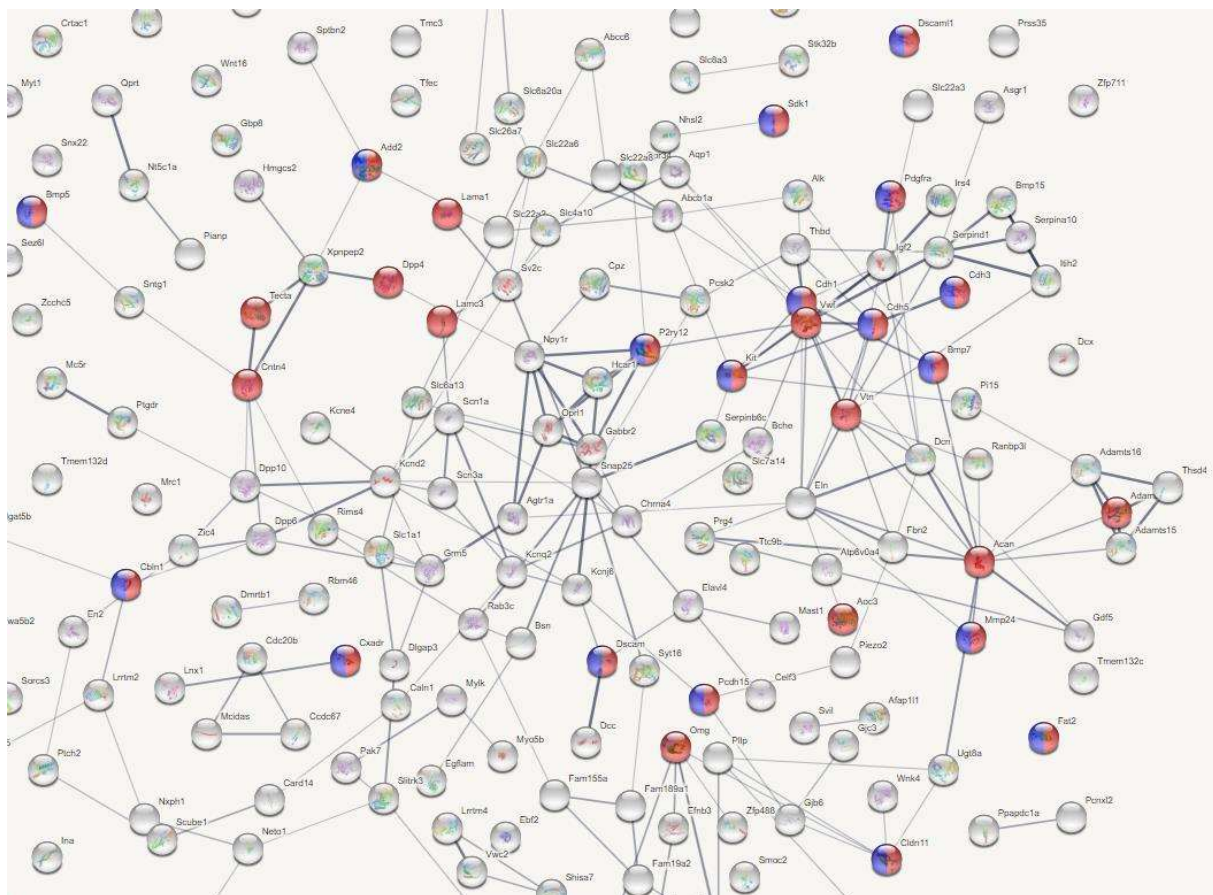


Figure 75 : Relation fonctionnelle entre les 29 gènes communs sous-exprimés impliqués dans l'adhésion cellulaire.

Ce cluster regroupe des gènes impliqués dans l'« *adhésion* », et plus particulièrement dans l'« *adhésion cellule-cellule* ».

Les **19 gènes communs surexprimés** ne sont regroupés dans aucun cluster (Figure 76). Cependant, ils sont impliqués dans le processus d'oxydation biologique et dans la voie de signalisation d'IL-17.

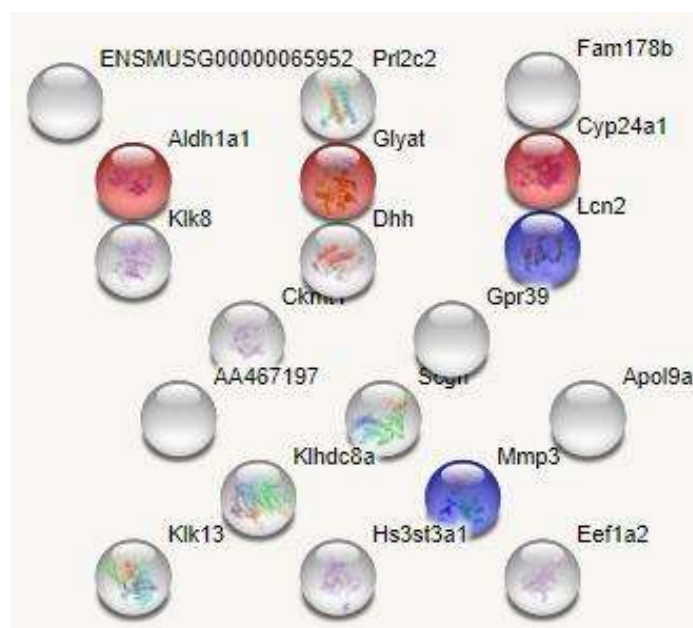


Figure 76 : 19 gènes communs surexprimés au jour 7 et au jour 10.

En rouge, les gènes impliqués dans l' « oxydation biologique » et en bleu les gènes impliqués dans la « voie de signalisation d'IL-17 ».

L'étude des profils transcriptomique communs au jour 7 et 10 après une exposition aux RF à 2,155 W/kg pendant 7 jours montre un effet significatif avec **225 gènes modulés** dont **19 surexprimés** et **206 sous-exprimés**. L'analyse fonctionnelle permet de confirmer et d'approfondir les processus dérégulés à 7 jours et 10 jours respectivement et de montrer des mécanismes communs à ces deux durées.

Ainsi, la dérégulation du processus développemental est maintenue du jour 7 au jour 10. Ce processus regroupe la neurogenèse et les effets sur les types cellulaires tels que les neurones, les OPC ou encore les cellules épithéliales multi-ciliées sont identifiés dès la fin de l'exposition. La perturbation des gènes en lien avec transport d'ion est un processus maintenu entre le jour 7 et 10. Il en est de même pour les gènes impliqués dans la réponse à un stimulus. L'analyse au jour 10 permet de caractériser ce stimulus comme étant un stress oxydatif impliquant des EROs, et l'analyse des gènes communs au jour 7 et 10 permet d'affiner la cytokine du jour 7 en cytokine IL-17 au jour 10.

Les gènes impliqués dans le potentiel d'action, la voie de régulation de Wnt, l'homéostasie cellulaire, la régulation positive des cascades MAPK et ERK1/ERK2 sont des processus immédiats non retrouvés au jour 10. Les gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et le comportement font partis de processus tardifs uniquement retrouvés au jour 10. L'analyse des gènes communs au jour 7 et 10 permettent d'affiner le comportement en comportement locomoteur.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'exposition aux RF affecterait peut-être des processus cellulaires de maturation et de plasticité cérébrale.

Partie 4 : Discussion et perspectives

1. Choix du protocole

1.1. L'exposition aux RF

Les protocoles utilisés dans la littérature expérimentale sont très variés : durée d'exposition (chronique ou aiguë), choix des fréquences et de leur intensité, signal continu ou pulsé, DAS différents, conditions d'exposition variables (corps entier, tête seulement, animaux libres de mouvements ou en contention), choix de l'espèce (rats ou souris), de la souche et de l'âge pour les études *in vivo*, et du type cellulaire pour les études *in vitro*. Cette importante hétérogénéité est très probablement à l'origine d'une grande discordance entre les résultats publiés depuis des années.

Lors de ces travaux, des expositions subaiguës de 3 jours et chroniques de 7 jours ont été réalisées. Ces durées correspondent respectivement au milieu et à la fin de la fenêtre de différenciation des cellules souches neurales. Ainsi, il a été possible d'étudier l'effet des RF sur des cellules immatures et encore non différenciées. Ces expositions ont été réalisées dans un système d'exposition *in vitro* par Wire Patch Cell. Ce concept basé sur une antenne filaire GSM à 900 MHz (2G) offre un contrôle précis des paramètres de l'exposition, ainsi qu'une répartition homogène du signal et la possibilité d'exposer jusqu'à 8 échantillons en même temps.

Le signal 2G couvre aujourd'hui plus de 99 % du territoire français et exploite essentiellement le standard GSM. C'est le système le plus répandu en Europe (bandes de fréquences 900 MHz et 1 800 MHz) et aussi en Afrique. C'est pour ces raisons qu'il a été choisi dans le cadre de cette thèse.

Les valeurs de DAS choisies sont de 0,083 W/kg et 2,155 W/kg. Elles correspondent aux limites imposées par le décret Français selon les recommandations de l'Union Européenne ($DAS_{\text{corps entier}} = 0,08 \text{ W/kg}$ et $DAS_{\text{tête}} = 2 \text{ W/kg}$). Ces deux valeurs sont retrouvées dans notre environnement (DAS couramment émis par des téléphones portables) mais sont largement supérieures à ce que reçoit les cellules du cerveau d'un fœtus lorsque sa mère est exposée.

Enfin, ces valeurs sont dans la continuité travaux *in vivo* réalisés dans le laboratoire (Petitdant et al., 2018). Lors de cette étude les niveaux moyens pour les fœtus étaient de 1,5 et 6 W/kg. A ces niveaux d'exposition durant toute la gestation, la descendance présente des modifications comportementales significatives mesurables à l'adolescence. Enfin, ces valeurs permettent de comparer nos résultats avec les résultats *in vitro* de cultures de cellules souches exposées aux RF obtenus précédemment dans la littérature (Eghlidospour et al., 2015 ; Chen et al., 2014 ; Delvecchio et al., 2009 ; Nikolova et al., 2005).

Ainsi, lors de cette thèse, des cellules souches neurales de la V-SVZ ont été exposées à un signal GSM 2G (900 MHz) à des DAS de 0,083 W/kg et 2,155 W/kg pendant 3 et 7 jours.

1.2. Les cellules souches neurales de la V-SVZ

Le développement fœtal est une période critique dans le développement d'un individu, et donc du cerveau. Les adolescents ont un cerveau avec de nombreux processus de maturation. Ainsi, le transport du téléphone portable à proximité du fœtus au cours de la grossesse ou son utilisation intensive lors de l'adolescence posent des questions sur les effets des CEM RF sur les fonctions cérébrales.

Les travaux de cette thèse ont pour objectif d'évaluer les effets neurodéveloppementaux d'une exposition RF aux cours de la neurogenèse. Peu d'étude s'intéressent et montrent des effets neurotoxiques des RF au cours du développement. Précédemment, l'équipe a démontré qu'une exposition durant le développement fœtal diminue le comportement exploratoire des animaux avec une diminution de l'activité horizontale dans *l'open field* (Petitdant et al., 2018). Ces résultats suggèrent un effet néfaste des RF au cours du développement du cerveau. Ainsi, les travaux menés recherchent à mettre en évidence les mécanismes cellulaires et moléculaire de la neurogenèse perturbés par une exposition aux RF. Pour cela, un modèle *in vitro* de NSCs murines a été utilisé pour évaluer la toxicité des RF.

La neurogenèse est un processus complexe comprenant l'activation d'un pool de cellules souches, la prolifération des précurseurs et la différenciation/maturation fonctionnelle des nouvelles cellules. Pendant le développement, la plupart des NSCs et leur niche sont spatialement éphémères et temporellement transitoires. Cependant, chez l'adulte, les NSCs résident dans deux niches neurogéniques permettant leur auto-renouvellement et leur différenciation tout au long de la vie de l'individu (Silva-Vargas et al., 2013 ; Alvarez-Buylla et al., 2001).

Avec la découverte de la neurogenèse et des NSCs, de nombreuses applications notamment pour la médecine réparatrice du cerveau ont été développées. Différentes techniques existent pour l'étude des NSCs, telles que les cultures en monocouches et plus récemment les neurosphères. Néanmoins, ces techniques présentent des inconvénients non négligeables. Le modèle *in vitro* mis en place au laboratoire est un système de culture en monocouche et nécessite l'utilisation de tissus de plusieurs animaux pour initier chaque culture (au moins 6 cerveaux de souriceaux). Dans celui-ci, il est difficile de surveiller et de quantifier les clones individuels dérivés de NSCs. La technique d'immunohistochimie permet de caractériser les différentes populations présentes dans la population cellulaire initiale. Cependant, la combinaison d'anticorps est limitée à deux marqueurs permettant de visualiser uniquement deux populations cellulaires distinctes à la fois, par exemple GFAP-Nestin pour les cellules B1 et les cellules C. Ce modèle *in vitro* permet de cribler rapidement et facilement les potentiels effets toxiques de substances neurotoxiques. Néanmoins, il ne permet pas de mimer les interactions cellules-cellules entre tous les types cellulaires présents dans la V-SVZ, ni la structure particulière de cette niche. En effet, deux cultures primaires différentes sont utilisées pour obtenir soit une population de cellules E, soit une population de NSCs et de progéniteurs immatures. Concernant les neurosphères, elles se développent en présence de fortes concentrations en EGF et FGF-2. Elles diffèrent fortement de leurs homologues *in vivo*, de par leur forte prolifération (les NSCs *in vivo* prolifèrent lentement), la production majoritaire de cellules gliales (les NSCs *in vivo* forment principalement des neurones), et la dérégulation de certaines voies essentielles (Urban et Guillemot, 2014).

Par la suite, il serait intéressant de réaliser des cultures en trois dimensions permettant d'étudier les interactions des cellules avec leur environnement. Ces modèles permettraient d'obtenir un modèle de reconstruction d'une V-SVZ *in vitro* par l'association de plusieurs types cellulaires qui cohabitent normalement ensemble. Ce type de modèle permettrait d'apprécier la sensibilité relative des différents types cellulaires aux RF. Un autre point important serait de purifier des populations de NSCs issues de la V-SVZ à l'aide de techniques plus précises, telles que la cytométrie en flux. Cependant, ces techniques ne font pas de distinction entre les différents états d'action des cellules B1 et les différents progéniteurs intermédiaires ou immatures.

2. Effets des RF sur le cycle cellulaire

L'ensemble des données obtenues montrent qu'après une exposition aux RF la croissance cellulaire et la viabilité cellulaire sont significativement diminuées. En revanche, l'exposition a significativement augmenté la prolifération cellulaire et l'apoptose cellulaire.

La diminution de la croissance cellulaire est maintenue de la fin de l'exposition aux RF jusqu'au jour 10. Cependant deux effets sont retrouvés en fonction du temps d'exposition. Lorsque les cellules sont exposées 3 jours, le nombre total de cellules continue à diminuer tandis que lorsque les cellules sont exposées 7 jours, le nombre de cellules total est toujours inférieur au SHAM mais la diminution est moins importante qu'à la fin des temps d'exposition. Ces données supposent que les cellules se sont adaptées, c'est-à-dire qu'elles meurent moins et/ou ont réduit le défaut de prolifération cellulaire, ou alors un mécanisme de prolifération excessive s'est déclenché de façon plus tardive couvrant en partie un mécanisme de mort cellulaire toujours présent.

La diminution de la croissance cellulaire peut être expliquée par la diminution de la viabilité cellulaire qui montre bien qu'un mécanisme de mort cellulaire se met en place dès la fin des expositions aux RF. La diminution de la croissance cellulaire est du même ordre que la diminution de la viabilité cellulaire ce qui montrent la cohérence des données obtenues. L'augmentation de l'apoptose cellulaire est un paramètre lié à la diminution de la croissance cellulaire et de la viabilité cellulaire. Le nombre de cellules en apoptose est plus faible que le nombre de cellules mortes ce qui montre que le phénomène d'apoptose n'est pas le seul mécanisme de mort cellulaire mis en jeu.

De nombreuses études se sont intéressées à la mort cellulaire neuronale. En 2009, le rapport de l'Afsset ne mettait pas en évidence d'effet délétère des RF sur la mort cellulaire neuronale (Afsset 2009). En ce qui concerne la mort neuronale *in vitro*, l'étude de Terro et al. (2012) complète et confirme l'absence d'effet des RF sur l'apoptose *in vitro*. Quatre études *in vivo* se sont intéressées au nombre de neurones. Deux études du même groupe suggèrent qu'une exposition sub-chronique à un signal continu (CW de 900 MHz) pourrait affecter le nombre total de neurones et induire une dégénérescence dans le cervelet et l'hippocampe chez la rate adulte (Bas et al., 2009 ; Somnez et al., 2010). Concernant l'apoptose, dans les approches *in vivo*, 2 études avec exposition chronique présentent des résultats divergents. L'une montre une augmentation du nombre de neurones apoptotiques après une exposition à un signal de type CDMA pendant 3 mois (Maskey et al., 2010b) et l'autre plutôt une diminution après une exposition à un signal GSM 900 MHz pendant 10 mois (Dasdag et al., 2009). Les résultats *in vivo* sur le nombre de neurones sont contradictoires et ne sont pas soutenus par les résultats *in vitro*. En l'absence de travaux complémentaires, il est difficile de conclure sur l'existence, ou non, d'un effet biologique des RF sur la

mort cellulaire des neurones. De plus, l'intégralité de ces expositions ont eu lieu sur ces cellules matures déjà différenciées pouvant expliquer la divergence de résultat par rapport à notre étude exposant des cellules immatures.

La prolifération cellulaire est également maintenue de la fin de l'exposition aux RF jusqu'au jour 10. Deux effets sont également retrouvés en fonction du temps d'exposition. Lorsque les cellules sont exposées 3 jours, le nombre total en prolifération continue à augmenter mais l'augmentation est moins importante qu'à la fin des temps d'exposition. Lorsque les cellules sont exposées 7 jours, le nombre de cellules total de cellule en prolifération entre le jour 7 et 10 est davantage augmenté. Ces résultats sont cohérents avec les données sur la croissance cellulaire. En effet, lorsque les cellules sont exposées 3 jours, la prolifération entre le jour 3 et le 10 n'est pas assez importante pour couvrir le nombre total de cellule morte expliquant la diminution de la croissance cellulaire. Lorsque les cellules sont exposées 7 jours, la prolifération entre le jour 7 et 10 est excessive et dépassant le nombre total de cellule mort expliquant alors une diminution de la croissance moins importante.

L'analyse des corrélations a permis de montrer que l'ensemble de ces perturbations est amplifié lorsque le DAS augmente.

Chen et collaborateurs (Chen et *al.*, 2014) ont exposé des NSCs à un signal GSM 1 800 MHz à un DAS de 1, 2 et 4 W/kg pendant 1, 2 et 3 jours. Les résultats ne montrent aucun effet sur l'apoptose, la prolifération et le cycle cellulaire. Les résultats sont complétés par Eghlidospour et collaborateurs (Eghlidospour et *al.*, 2016) qui ont exposés des neurosphères de NSCs à un signal GSM 900 MHz à un DAS de 2,287 W/kg pendant 15, 30, 60 et 120 minutes. L'exposition aux RF n'a eu aucun effet sur la viabilité cellulaire et l'apoptose des NSCs. En revanche, les résultats montrent une diminution de la fréquence de formation des neurosphères et une diminution de leur taille suggérant une diminution de la prolifération cellulaire. Ces différences de résultats par rapport à notre étude peuvent s'expliquer par l'utilisation d'une fréquence différente (900 MHz dans nos conditions expérimentales et 1 800 MHz dans l'étude de Chen et collaborateurs), par des durées d'expositions plus courtes et par une différence de culture (2D dans nos conditions expérimentales et 3D pour l'étude menée par Eghlidospour et collaborateurs).

Il existe très peu d'études évaluant l'effet des RF sur le cycle cellulaire de NSCs. Les résultats obtenus lors de ces travaux montrent différents effets sur le cycle cellulaire tels que l'augmentation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose et une diminution de la croissance cellulaire et de la viabilité cellulaire. Cette thèse est la première à étudié l'ensemble des paramètres généraux de culture. L'absence de travaux antérieurs dans ces conditions expérimentales nécessite une réplication des données.

3. Effets génotoxiques des RF

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent un effet génotoxique des RF sur les cellules souches de la V-SVZ. En effet, une augmentation du nombre de cellules comportant des cassures double brin de l'ADN a été trouvée. Cette augmentation est corrélée à l'augmentation du DAS. Ces travaux menés dans le cadre de la neurogène et avec ce modèle *in vitro* de cellules souches sont novateurs et uniques dans la littérature.

L'effet génotoxique des RF a été étudié par de nombreuses études *in vitro* (Markova et *al.*, 2010 ; Franzellitti et *al.*, 2010 ; Campisi et *al.*, 2010) et *in vivo* (Kesari et *al.*, 2010a). L'ensemble des données soutiennent nos données et montrent une augmentation du nombre de cellules comportant des cassures double brin de l'ADN et/ou du nombre de cassure par noyau. Dans une méta-analyse (Vijayalaxmi et Prihoda, 2012), il a été estimé qu'après exposition aux RF, les niveaux de lésions à l'ADN se situent en général dans la fourchette des valeurs correspondant aux lésions naturelles. Parmi les publications montrant un effet, une seule exhibe des niveaux de cassures nettement au-dessus du niveau de base (Franzellitti et *al.*, 2010). Aucun mécanisme d'action pouvant expliquer une faible augmentation du nombre de cassures, n'a été mis en évidence. Cependant, Markova et *al.* (2010) ont utilisé 2 modèles cellulaires différents : soit des cellules souches primaires purifiées à partir de tissus adipeux, soit des fibroblastes de peau. Les cellules ont été exposées à un signal GSM (905 et 915 MHz), ou à un signal UMTS (1 947 MHz, les DAS étant de 37 et 39 mW/kg). Après 1, 2 ou 3 h d'exposition, les auteurs ont recherché la présence de *foci* de 53BP1, une protéine s'accumulant sur les sites de cassures double-brin de l'ADN. Cette expérience montre une diminution du nombre de *foci* 53BP1 plus marquée dans les cellules souches que dans les cellules différenciées et une diminution du nombre de *foci* 53BP1 plus marquée pour une exposition à 915 MHz (GSM) qu'à 1 947 MHz (UMTS). Les auteurs concluent que dans certaines conditions, l'exposition aux RF inhibe le recrutement de 53BP1 sur les lieux de cassures, ce qui pourrait avoir un effet néfaste sur l'efficacité de la réparation de l'ADN.

Les RF n'ont pas l'énergie suffisante pour provoquer directement des cassures ou induire des réactions photochimiques. Deux hypothèses de mécanisme d'action génotoxique des RF sont avancées, d'un côté l'exposition aux RF augmenterait le stress oxydant (production de EROs), ce qui amplifierait le taux naturel de lésions oxydatives de l'ADN, de l'autre l'exposition aux RF inhiberait (partiellement) l'efficacité de certains agents impliqués dans la réparation de l'ADN.

Les résultats obtenus lors de ces travaux montrent pour la première fois un effet génotoxique d'une exposition aux RF sur les NSCs. Cependant, l'absence de données au jour 10 ne permet de conclure sur le devenir de ces cellules (réparation ou mort cellulaire). Il serait donc intéressant, dans les mêmes conditions expérimentales, d'étudier les mécanismes de réparation de l'ADN après la fin d'exposition au jour 10. En effet la présence de *foci* γ H2AX est un préalable nécessaire pour le recrutement des protéines des mécanismes de réparation.

4. Effets des RF sur la différenciation cellulaire

La niche neurogénique est composée d'un pool de cellules B1 multipotentes capables de se différencier en astrocytes, oligodendrocytes, neuroblastes et neurones. Lors de ces travaux, les effets potentiels des RF sur les cellules B1 et leurs progéniteurs. Les résultats montrent une augmentation du nombre des progéniteurs immatures (cellules A et OPC) sans modification des pools de cellules B1 et C après exposition aux RF. De plus, le nombre d'astrocyte est diminué et le nombre de cellules microgliales est augmenté. La recherche de mécanisme met en évidence une augmentation de la prolifération des OPC et une augmentation de la mort cellulaire par apoptose des astrocytes. Cette étude est la première à s'intéresser aux effets des RF sur la neurogenèse et plus particulière à la différenciation des cellules souches neurales.

Chen et collaborateurs (Chen et *al.*, 2014) ont exposé des NSCs à un signal GSM 1 800 MHz à un DAS de 1, 2 et 4 W/kg pendant 1, 2 et 3 jours. Les auteurs se sont intéressés à la différenciation astrogliale. Les résultats ne montrent aucun effet sur le nombre d'astrocyte. Eghlidospour et collaborateurs (Eghlidospour et *al.*, 2016) ont exposés des neurosphères de NSCs à un signal GSM 900 MHz à un DAS de 2,287 W/kg pendant 15, 30, 60 et 120 minutes. Les travaux se sont également intéressés à la différenciation astrogliale. Aucun effet des RF n'a été retrouvé. Cependant, dans ces deux études la différenciation astrogliale a été étudiée avec le marqueur GFAP seul qui marque également les cellules B1. De ce fait, une supposée augmentation du « pool » de cellule B1 peut cacher une diminution du « pool » d'astrocytes. De plus, les différences de résultats par rapport à notre étude peuvent s'expliquer par l'utilisation d'une fréquence différente (900 MHz dans nos conditions expérimentales et 1 800 MHz dans l'étude de Chen et collaborateurs), par des durées d'expositions plus courtes et par une différence de culture (2D dans nos conditions expérimentales et 3D pour l'étude menée par Eghlidospour et collaborateurs).

En accord avec notre étude, Yang et al. (2010), ont étudié des cultures des cellules microgliales N9 de souris après une exposition de 20 minutes à un signal de 2,45 GHz et un DAS de 6 W/kg. Les données montrent une augmentation significative de CD11b, marqueur des cellules microgliales. Cependant, l'exposition à un DAS de 6 W/kg ne permet pas d'exclure d'éventuels effets thermiques. Au contraire, Hirose et al. (2010) ont étudié les effets d'une exposition de 2 heures à un signal W-CDMA (1 950 MHz, DAS de 0,2, 0,8 et 2 W/kg) sur des cultures de cellules microgliales. Vingt-quatre ou 72 heures après la fin de l'exposition, les auteurs ont mesuré par immunohistochimie les cellules positives pour le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC classe II), le TNF α et l'interleukine IL-1 β . Aucun effet significatif n'a été mis en évidence par rapport aux cellules témoins et ce, quels que soient le marqueur de neuro-inflammation recherché et le niveau de DAS. Là encore, les divergences peuvent s'expliquer par l'utilisation d'une fréquence différente, par des durées d'expositions plus courtes et par une différence de culture (culture des NSCs dans notre étude et culture astrogliale seule dans les deux études). La microglie est intimement liée à la population astrogliale, dans notre étude, l'augmentation microgliale peut être déclenchée par l'apoptose des astrocytes et/ou en réponse à un stress oxydatif.

Notre étude est la seule évaluant l'effet d'une exposition aux RF sur la différenciation des NSCs et ce pour tous les types cellulaires. Les résultats obtenus lors de ces travaux suggèrent une orientation de la différenciation cellulaire vers les lignées oligodendriales (par prolifération) et neuroblastiques au

détriment de la lignée astrocytaire orientée vers un processus d'apoptose. Une augmentation du nombre de cellules microgliales est également démontré. Il serait intéressant d'étudier, dans nos conditions expérimentales, si la population microgliale présente des caractéristiques montrant son activation. L'absence de travaux antérieurs dans ces conditions expérimentales nécessite une réplication des données.

5. Effets des RF sur l'expression des gènes

De façon globale, le processus majeur perturbé par une exposition aux RF est la différenciation cellulaire lors de la neurogenèse et notamment la différenciation des oligodendrocytes. Ces résultats obtenus par transcriptomique sont en accord avec ceux trouvés lors de la première étude. D'autres perturbations de processus sont redondantes notamment la réponse à un stress oxydatif, la perturbation de l'homéostasie calcique, la régulation positive de la cascade MAPK, la régulation positive des cascades ERK1 et ERK2, la régulation négative de la voie Wnt et enfin le transport d'ion et de neurotransmetteur. Bien que ces processus soient des entités différentes, ils sont intimement liés. En effet, ils tous jouent un rôle dans la neurogenèse et pourraient être les cibles moléculaires des RF.

L'analyse fonctionnelle met en évidence une sous-expression de gènes liés à la régulation du transport du glutamate et du calcium (Slc1a1, Slc6a20a, Slc17a8, Slc22a2, Slc22a3, Slc6a13 et Slc24a3). De nombreuses études *in situ* et *in vivo* montrent l'expression des récepteurs mGluRs et des iGluRs dans les cellules matures de l'hippocampe, du cortex et du striatum, mais peu d'études ont montré leurs expressions dans la V-SVZ (Fotuhi et al., 1994 ; Sidorov et al., 2015 ; Wullner et al., 1994). Les NSCs expriment des récepteurs fonctionnels au glutamate (mgluR1, 5 et 3, AMPA/KA) et des transporteurs du glutamate (GLAST, GLT-1, VGLUT)(Brazel et al., 2005 ; Deisseroth et al., 2004 ; Di Giorgi-Gerevini et al., 2005). Les progéniteurs intermédiaires et neuroblastes expriment des récepteurs ionotropiques et métabotropiques fonctionnels ainsi que des transporteurs (Platel et al., 2007 ; Platel et al., 2008 ; Platel et al., 2010). Les OPC expriment des récepteurs ionotropiques et métabotropiques (mGluR3, 5)(Attwell et al., 2010 ; De Biase et al., 2011). Brazel et collaborateurs ont mis en évidence la résistance des NSCs à la toxicité du glutamate et leur prolifération par la stimulation des KAR et mGluR3. Bien qu'un excès de glutamate s'avère toxique pour les neurones et les oligodendrocytes en développement dans le cerveau, l'excès de glutamate peut induire une prolifération compensatoire des progéniteurs multipotents présents dans la V-SVZ [Wang et al., 2010 ; Brazel et al., 2005 ; Leuchtman et al., 2003].

Le mGluR5 est le principal récepteur métabotropique du glutamate au cours de la phase de développement précoce et s'exprime dans les progéniteurs précoces et dans les cellules gliales radiales. L'activation de ce récepteur induit la prolifération et la survie des NSCs (Jansson et Akerman, 2014). L'activation des mGluR5 sur l'enveloppe nucléaire génère une augmentation oscillatoire du calcium intranucléaire (O'Malley et al., 2003). Les mGluR5 activent différentes voies de signalisation via l'activation de la protéine Gαq/11 ou via son interaction avec des protéines post-synaptiques telle que la protéine Homer. L'activation de la protéine G conduit à l'activation de la PLCβ et à la formation des seconds messagers IP3 et DAG. L'IP3 se fixe sur ses récepteurs IP3R du RE et conduit à la libération de calcium dans le cytosol et à l'activation simultanée de la PKC, élément clé de l'activation de la cascade MAPK/ERK. Les protéines Homer interagissent avec la voie PI3K/Akt et la MAPK/ERK (Olmo et al., 2016).

Une des hypothèses serait l'implication des récepteurs AMPA/KA et des mGluR dans la mise en place du stress oxydatif lié à une perturbation de l'homéostasie calcique. En effet, les récepteurs AMPA/KA tout comme le mGluR5 sont exprimés au début du développement embryonnaire ainsi que dans les zones neurogènes du cerveau adulte. Les récepteurs AMPA/KA perméables au Ca^{2+} ont initialement une importance pour la prolifération cellulaire et la motilité neuronale. À des stades ultérieurs du développement les récepteurs NMDA ont un rôle plus important. L'activation des mGluR3 prévient l'apoptose et la stimulation des récepteurs KA prévient l'apoptose uniquement si les récepteurs NMDA sont inactivés par un antagoniste (Brazel et *al.*, 2005). De nombreuses études présentent les récepteurs AMPA comme principal médiateur de la mort des oligodendrocytes matures par excitotoxicité (Leuchtman et *al.*, 2003) et les récepteurs NMDA via la cascade PKC/NOX2 génèrent un stress oxydatif à l'origine de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR conduisant à la production des OPC (Cavaliere et *al.*, 2013 ; Cavaliere et *al.*, 2012).

La stimulation excessive de différents récepteurs glutamatergiques induit la mise en place d'un mécanisme d'excitotoxicité du glutamate impliquant différentes voies de signalisation intracellulaire. Ces dernières conduisent à l'augmentation de la concentration en calcium. Ce phénomène d'excitotoxicité conduit à la mise en place d'un stress oxydatif important pour les cellules pouvant être à l'origine de dommages cellulaires importants voire conduire à la mort cellulaire. Lors d'un stress oxydatif, des EROs sont générées et peuvent entraîner des lésions au niveau des organites cellulaires, un mauvais repliement des protéines, et des cassures de l'ADN. Des systèmes antioxydants endogènes et exogènes existent pour prévenir les lésions cellulaires pendant un stress oxydatif tels que la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et les vitamines B, C, D et K. Cependant, la présence de EROs est nécessaire à différents processus cellulaires notamment pour les NSCs. En effet, Le Belle et collaborateurs ont démontré la nécessité de niveaux élevés en EROs endogènes dans les NSCs pour la régulation de leur auto-renouvellement et la neurogenèse via la voie MAPK/ERK et la voie PI3K/Akt.

Il est bien établi que les voies de signalisation PI3K-Akt-mTOR et MAPK-ERK interviennent dans la régulation de diverses fonctions cellulaires, y compris la prolifération cellulaire, la croissance, l'autophagie, l'apoptose et la migration. Dans la voie ERK-MAPK, les composants majeurs sont la protéine Ras GTPase et les protéines kinases Raf, MEK et ERK. Ras et la voie ERK-MAPK sont activés par des facteurs de croissance, des hormones polypeptidiques et des neurotransmetteurs via leurs RTKs (récepteurs tyrosine kinases) et leurs RCPGs ou par activation directe des PKC. Les ERK activés phosphorylent de nombreuses protéines cytoplasmiques comme RSK (p90 ribosomal S6 kinase) phosphorylant à leur tour d'autres cibles comme les facteurs de transcription TCF permettant la transcription des gènes c-Myc et c-Fox impliqués dans la survie, la division et la mobilité cellulaire (Mendoza et *al.*, 2011). En l'absence de stimulus, Akt est cytoplasmique et inactif. En présence de stimulus, l'enzyme PI3K activé permet l'activation de Akt via sa phosphorylation par PDK1 en Thr308 et par mTORC2 en Ser473. Un régulateur négatif important de la voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR est PTEN (homologue de la phosphatase et de la tensine). Grâce à son activité lipide phosphatase, PTEN déphosphoryle PIP3 en PIP2 et contrebalance la fonction kinase de PI3K et l'activation ultérieure de la signalisation Akt en aval. Le dysfonctionnement de la cascade PI3K-Akt-mTOR a été reconnu comme une des causes de maladies neurodéveloppementales et neuropsychiatriques avec des phénotypes cliniques distincts, comme les

troubles du spectre autistique, l'épilepsie, les lésions cérébrales et diverses malformations cérébrales lors du développement (Wang et *al.*, 2017). Les résultats obtenus lors de cette thèse montrent une dérégulation de gène en lien avec les voies de signalisation PI3k/akt et MAPK/ERK. Il serait intéressant dans nos conditions expérimentales d'effectuer des western blots sur des protéines d'intérêts telles que ERK1/2 et RSK1 pour la voie Ras/MAPK/ERK et sur la protéine Akt de la voie PI3K/Akt.

Le stress oxydatif peut également contribuer à l'activation des kinases JNK et p38 impliquées dans la voie de signalisation Wnt. Ces kinases permettent l'activation des facteurs de transcription FOXOs, effecteur en aval de Akt. FOXOs sont des régulateurs importants de la réponse cellulaire à un stress et favorise la défense antioxydante. En conditions physiologiques, FOXO est inhibé par Akt. En réponse à un stress oxydatif, FOXO est phosphorylé par une petite GTPase Ral activée par un stress oxydatif. L'activation de Ral entraîne la phosphorylation et l'activation de JNK qui à son tour phosphoryle les facteurs FOXO (Essers et *al.*, 2004). Cette phosphorylation de FOXO permet sa translocation dans le noyau et la transcription de gènes cibles localisés dans différents compartiments cellulaire tels que la MnSOD, la catalase et Sesn3 pour limiter le stress oxydatif (Dolado et *al.*, 2008). De plus, les EROs modulent d'activité des FOXOs notamment par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation et acétylation), des interactions avec des co-régulateurs (Klotz et *al.*, 2015). Un autre rôle des FOXOs est le maintien d'une balance homéostatique entre l'activité de Akt et des complexes mTOR en favorisant Akt-mTORC2 et en inhibant mTORC1 (Chen et *al.*, 2000). L'analyse transcriptomique montre qu'une exposition aux RF entraîne une dérégulation de gène en lien avec un stress oxydatif et la réponse à des EROs. Il serait intéressant, dans les mêmes conditions expérimentales, de mesurer le stress oxydatif à l'aide par exemple du H₂DCDFA qui est un marqueur sensible aux EROs. De plus, un dosage luminex du surnageant permettrait d'étudier la libération de cytokine. En effet, des gènes en lien avec la cytokine IL-17 sont sur-exprimés. IL-17 est une molécule pro-inflammatoire dont les récepteurs IL-17R sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires, la microglie et les astrocytes. Il a été montré qu'IL-17 est capable d'inhiber la prolifération des NSCs, sans induire de cytotoxicité ou d'apoptose, et d'entraver la différenciation des NSCs en astrocytes.

Le calcium est une molécule de transduction du signal ubiquitaire. Il joue un rôle clé dans la modulation de l'activité neuronale et est impliqué dans de nombreuses signalisations cellulaires régulant différents processus tels que la croissance cellulaire, la prolifération, le métabolisme et l'apoptose (Berridge et *al.*, 2003). Dans les neurones, l'élévation de la concentration intracellulaire en calcium [Ca²⁺]_i déclenche la libération de neurotransmetteurs dans les synapses et contribue à la formation d'un potentiel d'action et la plasticité synaptique. Dans le cytosol, les niveaux en calcium sont faibles (100nm) comparés à ceux de la fente synaptique (2mM) ou aux stocks intracellulaires (100-500μM) du réticulum endoplasmique (Santulli et *al.*, 2017). L'hypothèse d'une perturbation de l'homéostasie calcique peut être à l'origine de diverses pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Bezprozvanny et *al.*, 2009). Au niveau du RE, la libération des stocks de calcium peut avoir lieu à la suite d'une augmentation de calcium intracellulaire liée à un stress oxydatif *via* les récepteurs à la ryanodine (RyR) et les récepteurs IP3R. En plus des récepteurs au glutamate permettant l'entrée du calcium dans cellule, les NSCs expriment d'autres canaux calciques fonctionnels comme les canaux CRAC (store-operated Ca²⁺ entry mediated by Ca²⁺ release-activated Ca²⁺) (Toth et *al.*, 2016). Les canaux CRAC sont le principal mécanisme de mobilisation du calcium dans les cellules non excitables et s'ouvrent en

réponse à une déplétion calcique du RE après une stimulation des récepteurs couplés à une protéine G (Lewis et *al.*, 2011 ; Prakriya, 2009). Ces canaux sont composés des protéines Orai1 formant le pore localisé à la membrane plasmique et des protéines senseurs STIM1 au niveau du RE. Initialement retrouvés dans les lymphocytes T et les macrophages, des études récentes ont démontré l'implication des canaux CRAC dans l'auto-renouvellement et la prolifération cellulaire des NSCs (Somasundaram et *al.*, 2014 ; Domenichini et *al.*, 2018 ; Hogan et *al.*, 2010) . Les données de transcriptomiques montrent une dérégulation de gènes en lien avec le transport de calcium et le potentiel d'action. Afin d'explorer cette hypothèse, il serait intéressant d'exposer une culture de cellule souche neurales dans les mêmes conditions expérimentales utilisées lors de cette thèse et d'effectuer des mesures de calcium intracellulaire. Pour compléter cette hypothèse, il faudrait orienter la différenciation des cellules souches vers la lignée neuronale pour mener une étude d'électrophysiologie. Un milieu sans sérum supplémenté en N2 et B27 conditionne cette orientation neuronale. Ce protocole permettrait également d'étudier la différenciation neuronale dont l'analyse transcriptomique met en évidence un certain nombre de gène dérégulés.

In vivo, la V-SVZ est composée d'une VZ épendymaire et d'une SVZ riche en NSCs et en cellules progénitrices. Une altération de la VZ peut indirectement affecter les NSCs et les cellules progénitrices sous-jacentes et conduire à des anomalies cérébrales, telles que l'hydrocéphalie (Grondona et *al.*, 2010 ; Jacquet et *al.*, 2009). Les cellules E présentent de nombreuses caractéristiques essentielles au maintien du microenvironnement neurogénique de la V-SVZ. D'une part, elles forment une barrière protectrice entre le LCR et le parenchyme cérébral grâce à leurs touffes multi ciliées (Del Bigio, 1995 ; Del Bigio, 2010). Les cils sont des structures dynamiques apicales exprimant une large gamme de transporteurs et récepteurs à différents signaux extracellulaires du LCR. La ciliogenèse est un mécanisme complexe faisant intervenir le flux du LCR, les jonctions d'adhésion des voies de signalisation essentielles au bon fonctionnement des épendymocytes. D'autre part, les cellules E dérivent des cellules de la glie radiaire, cellules souches primaires du cerveau embryonnaire, et deviennent matures pendant la première semaine post-natale (Spassky, 2005). L'analyse transcriptomique montre une dérégulation de gène en lien avec leur différenciation. Dans nos conditions expérimentales, il serait intéressant de ne pas compléter le milieu de culture avec du SVF afin d'orienter la différenciation des NSCs en épendymocytes. Ainsi, il serait possible d'étudier l'impact d'une exposition aux RF sur ce type cellulaire. Une modification de l'intégrité de la barrière épendymaire pourrait mener à des perturbations de la niche neurogénique sous-jacente. En effet, les cellules E et B1 sont étroitement associées et partagent des facteurs physico-chimiques régulant l'auto-renouvellement et la multipotence des cellules B1 (Chojnacki et *al.*, 2009). Cette étroite relation fait de l'épendyme un modulateur clé des populations cellulaires de la V-SVZ. De plus, les cellules E organisent la V-SVZ via la production de facteurs trophiques et la régulation métabolique (métabolisme du glucose et homéostasie ionique) créant un environnement neurogénique favorable à la V-SVZ. Une perturbation de l'épithélium épendymaire peut conduire à une désorganisation complète de la niche neurogénique avec une perte de cellules B1 et une diminution importante des progéniteurs neuronaux. Or, ces modifications peuvent amener à l'apparition de plusieurs désordres neuronaux tels que des anomalies du tube neural, une dyskinésie ciliaire et une hydrocéphalie.

Pour finir, l'analyse transcriptomique met en évidence une dérégulation de gènes en lien avec le comportement locomoteur et l'apprentissage. Ceci corrobore les résultats obtenus précédemment où les

données montrent une diminution nette de la distance parcourue dans l'*open field* après une exposition durant toute la gestation que ce soit chez les rats adolescents ou les jeunes adultes. On retrouve notamment le gène codant pour la protéine Neto1 dont le rôle essentiel dans l'apprentissage spatial et la mémoire est suspecté. Il serait donc intéressant d'étudier *in vivo* les profils transcriptomiques des rats exposés aux RF. Cette exploration permettrait peut-être de trouver de nouvelles cibles moléculaires.

L'étude menée est la seule évaluant l'effet des RF sur les profils transcriptomiques des NSCs. Les résultats obtenus lors de ces travaux suggèrent la perturbation de nombreux processus en lien avec la différenciation cellulaire lors de la neurogenèse. Le modèle *in vitro* de V-SVZ est composé d'une population hétérogène de cellules souches, de progéniteurs intermédiaires et de progéniteurs plus restreints. Ainsi ces expériences seules ne permettent pas directement de savoir quelle population cellulaire répond à l'exposition aux RF. Les effets observés peuvent donc passer par la stimulation de différents récepteurs ou transporteurs au glutamate exprimés par les différents types cellulaires présents dans le modèle *in vitro*. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour mesurer le stress oxydatif et la concentration de calcium intracellulaire et déterminer les types cellulaires sensibles à l'exposition aux RF, le type de récepteurs ou transporteurs au glutamate impliqué et les facteurs impliqués dans la régulation des voies de signalisation notamment les voies MAPK/ERK et Pi3K-Akt. De plus, les résultats de transcriptomiques doivent être confirmés par RT-PCR.

Pour aller plus loin :

Cinq études ont utilisé des puces à ADN pour analyser l'expression différentielle des gènes. Toutes ces publications concernent des expériences *in vitro*, effectuées sur des cellules humaines en culture.

- 1) Im et *al.* (2010a) ont utilisé des cellules embryonnaires d'origine humaine. Les cellules en culture ont été exposées pendant 24 h à 1 762 MHz, avec un DAS de 60 W/kg. L'analyse ne montre aucune différence statistiquement fiable entre les cellules témoins et les cellules exposées. À noter que dans cette expérience, le DAS est très élevé. Il y a donc un apport important d'énergie thermique, même si un système de thermorégulation a été mis en place pour permettre d'évacuer la chaleur.
- 2) Roux et *al.* (2011) ont exposé des cultures primaires de kératinocytes humains à une onde continue de 900 MHz (DAS de 2,6 et 73 mW/kg). Avec les puces à ADN, les auteurs ont montré une différence d'expression de faible amplitude significative pour 20 gènes. Avec la RT-PCR quantitative, il n'y a eu aucune différence d'expression.
- 3) Sekijima et *al.* (2010) ont exposé, pendant 96 heures, trois lignées différentes de cellules humaines (glioblastome, neurogliome, fibroblaste), à 2 145 MHz avec 3 DAS différents (80, 250 et 800 mW/kg). Une quinzaine de gènes présentent une différence d'expression d'un facteur 2 (8 gènes pour la lignée de glioblastome, 5 gènes dans la lignée de neurogliome, et 1 seul dans les fibroblastes). Aucune vérification par RT-PCR n'a été effectuée.
- 4) Sakurai et *al.* (2011) ont effectué leur criblage sur des cellules gliales humaines d'origine fœtale. Au total, 9 conditions différentes ont été testées par les auteurs : 3 DAS différents (1, 5 et 10 W/kg à 2,45 GHz) et 3 durées d'exposition (1, 4 et 24 h). 5 gènes ont été trouvés différentiellement exprimés avec un coefficient de changement supérieur à 2, et 28 gènes avec un coefficient supérieur à 1,5 seulement. Sur ces 28 gènes, 22 ont été sélectionnés et une vérification par RT-PCR a été effectuée. Aucune expression différentielle n'a été confirmée par cette technique.

En accord avec nos données, ces articles montrent que, dans certaines conditions, il est effectivement possible qu'une exposition aux RF puissent modifier l'expression génique. Cependant, lors de ces études modifications de l'expression génique observées sont vraisemblablement de faibles ampleurs, réversibles dans le temps et sans conséquence sur la concentration finale en protéines dans la cellule. Cette divergence peut encore une fois s'expliquer par les différentes fréquences utilisées, les DAS plus faibles dans certaines études expliquant peut être la réversibilité des effets ou encore le temps d'exposition.

6. Hypothèses de mécanisme d'action

Les RF seraient capables d'interagir avec la voie glutamatergique en modulant des gènes liés à son transport et à sa régulation. Ainsi, une stimulation excessive de différents récepteurs glutamatergiques induirait la mise en place d'un mécanisme d'excitotoxicité du glutamate impliquant différentes voies de signalisation intracellulaire (Wnt, MAPK/ERK et PI3K/Akt). Ces dernières conduiraient à l'augmentation de la concentration en calcium. Ce phénomène d'excitotoxicité pousserait à la mise en place d'un stress oxydatif important pour les cellules, notamment les astrocytes, pouvant être à l'origine de dommages cellulaires importants voire conduire à la mort cellulaire.

Les RF n'ont pas l'énergie suffisante pour provoquer directement des cassures ou induire des réactions photochimiques. Deux hypothèses de mécanisme d'action génotoxique des RF sont avancées, d'un côté l'exposition aux RF augmenterait le stress oxydatif (production de EROs), ce qui amplifierait le taux naturel de lésions oxydatives de l'ADN, de l'autre l'exposition aux RF inhiberait (partiellement) l'efficacité de certains agents impliqués dans la réparation de l'ADN. Dans ce cas, les ondes seraient des agents co-génotoxiques qui pourraient aggraver l'effet d'agents génotoxiques directs. Lors d'un stress oxydatif, des EROs sont générées et peuvent entraîner des lésions au niveau des organites cellulaires, un mauvais repliement des protéines, et des cassures de l'ADN. Cet état inflammatoire pourrait être à l'origine d'une microglie caractérisée par une activation et une augmentation des cellules de la microglie.

En condition physiologique, la production de EROs est essentielle au bon fonctionnement des NSCs. En condition de stress oxydatif, ils peuvent induire des changements dans l'homéostasie cellulaire et conduire à des perturbations de la différenciation cellulaire. Au sein des niches neurogéniques, le microenvironnement est extrêmement sensible au stress oxydatif. Néanmoins, les NSCs maintiennent un statut de EROs élevé contribuant à l'amélioration de leur auto-renouvellement, à leur prolifération et à leur différenciation via. Plus les niveaux des EROs augmentent dans les NSCs, plus l'environnement intracellulaire favorise la différenciation au détriment de la prolifération.

Les progéniteurs intermédiaires (neuroblastes et OPC) sont également des cibles potentielles des RF car ils expriment des récepteurs métabotropiques et ionotropiques fonctionnels au glutamate (Faigle et Song, 2013 ; Platel et *al.*, 2010). L'augmentation significative de la population des cellules A et des OPC pourrait être la conséquence d'une perturbation du signal glutamatergique. En effet, plusieurs études de la littérature scientifique montrent l'effet bénéfique du glutamate sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs cérébraux immatures au sein de la niche V-SVZ par son action sur les récepteurs ionotropiques (Fan et *al.*, 2012 ; Jansson et Akerman, 2014 ; Platel et *al.*, 2010 ; Platel et *al.*, 2007, Brazel et *al.*, 2005 ; Lai et *al.*, 2016).

Grâce à l'étude de la neurogenèse, les chercheurs ont également pu faire la lumière sur les origines du glioblastome. La caractérisation des progéniteurs neuronaux dans les niches cérébrales spécifiques a permis d'axer les nouvelles études sur des types de cellules spécifiques. Grâce à l'avènement des techniques modernes, il a également été possible de retracer les marqueurs et les cellules le long d'une certaine période. La cellule d'origine des glioblastomes fait toujours l'objet de débats, mais il devient maintenant clair qu'elles peuvent découler d'une prolifération excessive des provenant des niches neurogéniques (De Almeida Sassi et *al.*, 2012) (Figure 77). Au vu des résultats obtenus sur la prolifération des OPC après un exposition à des RF, il est intéressant de se questionner sur leur devenir.



- (A) Les interactions entre la SVZ et les NSCs mettant en évidence les types de cellules les plus pertinents et les facteurs sécrétés qui affectent la prolifération neuronale. Les progéniteurs d'oligodendrocytes sont plus susceptibles de subir une transformation maligne.
- (B) Le rôle des cellules souches cancéreuses (CSC) dans la progression tumorale. Il existe différents sous-populations de CSC, ce qui peut contribuer à l'hétérogénéité tumorale. Les inhibiteurs de l'histone deacetylase (HDACis) peuvent être efficaces contre les CSC en favorisant leur différenciation. Les niches périvasculaires (NPN) fournissent des facteurs de croissance qui améliorent la prolifération et l'auto-renouvellement des CSS. En raison de la croissance rapide des tumeurs, des niches hypoxiques (HNs) sont formées et, par l'action des HIFs, sécrètent VEGF, qui à son tour peut conduire à de nouvelles niches vasculaires.

Conclusion

Le public se pose de nombreuses questions sur les effets des ondes RF utilisées par la téléphonie mobile. Les interrogations sur les effets cérébraux sont les plus fréquentes puisque le téléphone est contre l'oreille et donc proche du cerveau lorsque nous l'utilisons. Jusqu'à maintenant, la plupart des études consacrées aux effets des ondes RF ont été réalisées chez les sujets adultes. Pourtant, l'exposition à ces ondes est de plus en plus précoce avec l'acquisition du premier téléphone portable à l'adolescence, voire plus tôt. Les femmes enceintes sont également sujettes à de grandes inquiétudes face à l'exposition éventuelle de l'enfant au cours du développement fœtal. Ces périodes de développement (fœtale et adolescente) sont critiques pour le développement cérébral et peuvent donc être plus sensibles aux CEM RF.

Dans un contexte bibliographique très contradictoire n'ayant pas permis de définir un mode d'action des ondes RF, cette étude pionnière a été menée pour évaluer l'effet d'une exposition aux RF sur le cerveau et plus précisément sur les processus cellulaires de maturation et de plasticité cérébrales et l'identification de biomarqueurs d'effets cérébraux.

En ciblant spécifiquement les cellules souches cérébrales et leurs progéniteurs *in vitro*, le modèle choisi lors de ces travaux est novateur et approprié dans la détection des potentiels effets des RF sur la niche neurogénique V-SVZ. Les cellules souches issues de ce modèle expriment les caractéristiques majeures des cellules de la V-SVZ *in vivo* et se différencient en cellules E ou en cellules de la neuroglie. Dans l'ensemble, ce modèle *in vitro* est un nouvel outil pour l'évaluation de substances présentes dans l'environnement et se place dans le cadre conceptuel de la toxicologie moderne en cours de développement.

Les résultats de cette thèse démontrent pour la première fois les effets néfastes des RF sur la différenciation cellulaire et l'induction d'un stress oxydatif des NSCs. Les RF modifient la différenciation des NSCs dans la SVZ-sous-jacente. Les RF pourraient induire un stress oxydatif sur les NSCs de la SVZ par la production de EROs et la perturbation de l'homéostasie calcique. L'activation des récepteurs glutamatergiques serait à l'origine d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et de l'activation des voies de signalisation Wnt, Pi3K/Akt et MAPK/ERK. Un effet génotoxique lié au stress oxydatif augmenterait le nombre de cassure et/ou RF inhiberait (partiellement) l'efficacité de certains agents impliqués dans la réparation de l'ADN. Ce mécanisme semblerait cibler les astrocytes alors dirigés vers un mécanisme d'apoptose.

Ces données mettent en avant la multitude de cibles possibles et l'importance de réaliser des expériences complémentaires dans la compréhension des mécanismes d'action. Pour la première fois, ces travaux mettent en avant les effets cellulaires néfastes des RF au cours de la neurogenèse.

Bien que les valeurs de DAS choisies dans cette étude soient retrouvées dans notre environnement mais sont largement supérieures à ce que reçoit les cellules du cerveau d'un fœtus lorsque sa mère est exposée. Les ondes électromagnétiques provoquent des modifications biologiques, mais ne sont surement pas aussi dangereuses pour la santé que dans cette étude. Néanmoins, un point d'accord existe : la vigilance face à une utilisation excessive de ces nouvelles technologies.

Annexes

Annexe 1 : Rapport pour le NRA-seq

Analysis of S20124 RNA sequencing data

Celine Keime

1 Data analysed in this report

Figure 1 on the following page represents the total number of sequenced reads in each sample (50 bp reads).

Table 1 lists all samples analysed in this report, together with their associated experimental conditions.

Table 1: **Samples analysed in this report and their experimental conditions.**

Sample ID	Sample name	Condition
VSLD17	2 w/kg Tj - replica 1	SHAM_2_J7
VSLD18	2 w/kg Tj - replica 2	SHAM_2_J7
VSLD19	2 w/kg Tj - replica 3	SHAM_2_J7
VSLD20	2 w/kg Tj - replica 4	SHAM_2_J7
VSLD21	2 w/kg Tj - replica 1	EXPO_2_J7
VSLD22	2 w/kg Tj - replica 2	EXPO_2_J7
VSLD23	2 w/kg Tj - replica 3	EXPO_2_J7
VSLD24	2 w/kg Tj - replica 4	EXPO_2_J7
VSLD25	2 w/kg Tj - replica 1	SHAM_2_J10
VSLD26	2 w/kg Tj - replica 2	SHAM_2_J10
VSLD27	2 w/kg Tj - replica 3	SHAM_2_J10
VSLD28	2 w/kg Tj - replica 4	SHAM_2_J10
VSLD29	2 w/kg Tj - replica 1	EXPO_2_J10
VSLD30	2 w/kg Tj - replica 2	EXPO_2_J10
VSLD31	2 w/kg Tj - replica 3	EXPO_2_J10
VSLD32	2 w/kg Tj - replica 4	EXPO_2_J10

2 Preprocessing

Reads were preprocessed in order to remove adapter, polyA and low-quality sequences (Phred quality score below 20). After this preprocessing, reads shorter than 40 bases were discarded for further analysis. These preprocessing steps were performed using cutadapt [1] version 1.10. Reads were mapped to rRNA sequences using bowtie [2] version 2.2.8, and reads mapping to rRNA sequences were removed for further analysis. Figure 2 on page 3 provides the proportion of remaining reads after each preprocessing step.

Figure 3 on page 4 provides the number of different¹ and unique¹ reads in each sample after the preprocessing step.

¹For a given sample, the set of unique reads contains reads found only once in this sample and the set of different reads contains all distinct reads, whatever their occurrence number. For instance, for the following set of reads {A, B, C, C, D, E, F, F, F, G}, the set of unique reads is {A, B, D, E, G} and the set of different reads is {A, B, C, D, E, F, G}.

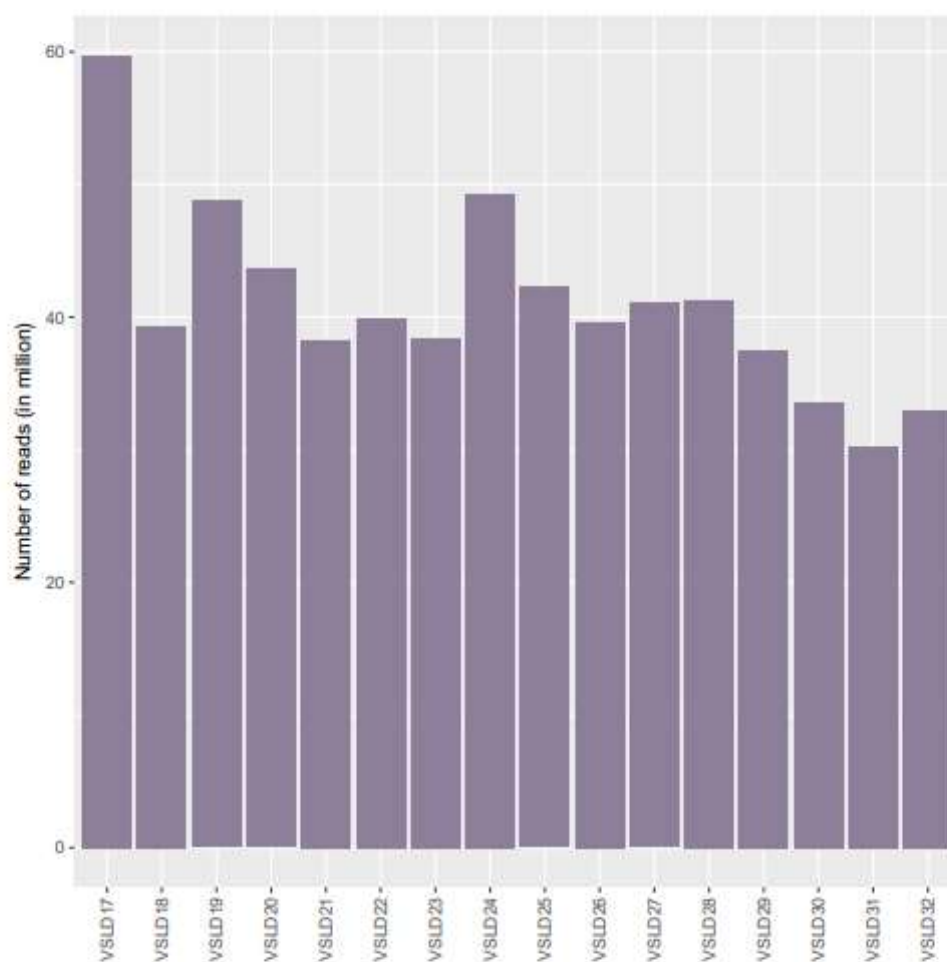


Figure 1: **Number of sequenced reads in each sample.** This barplot represents the total number of sequenced reads (in million, y-axis), in all samples (x-axis).

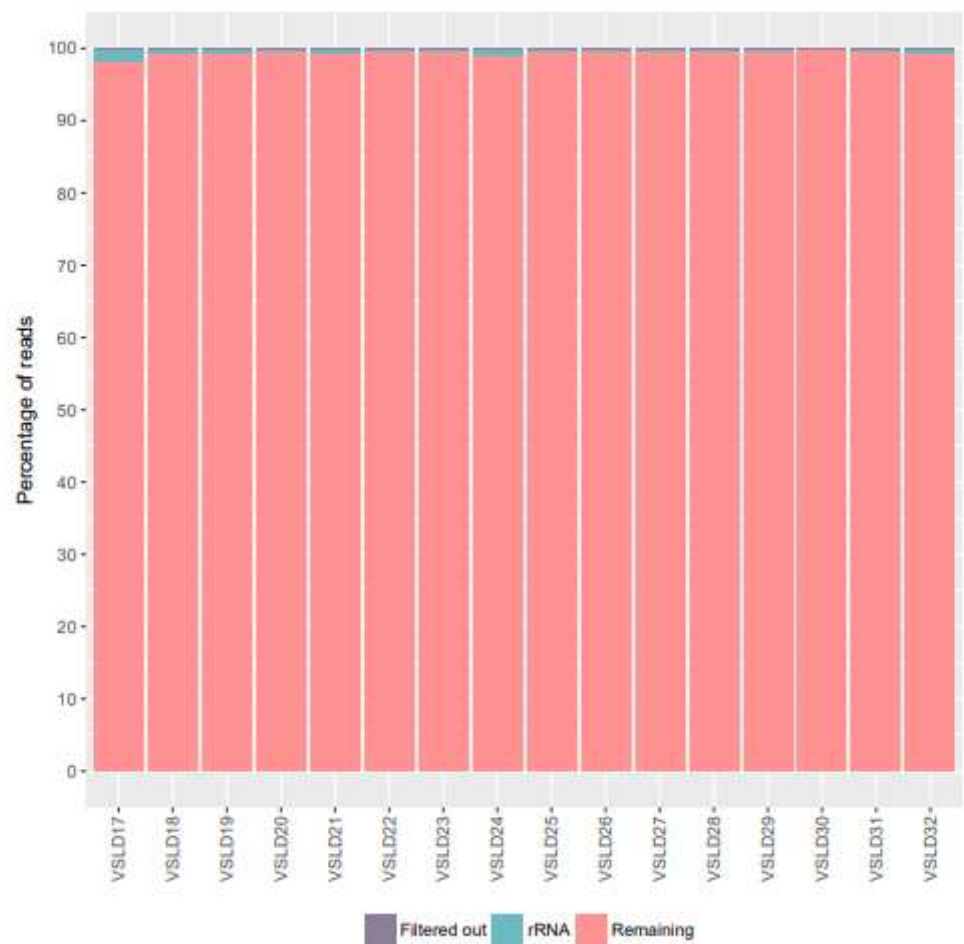


Figure 2: **Summary of preprocessing results.** "Filtered out" represents the percentage of reads shorter than 40 bases discarded after adapter and low-quality sequences (Phred quality score below 20) removal. "rRNA" represents the percentage of reads mapping to rRNA sequences. "Remaining" indicates the percentage of reads that remain after all preprocessing steps. All percentages were calculated relative to the total number of sequenced reads in each sample.

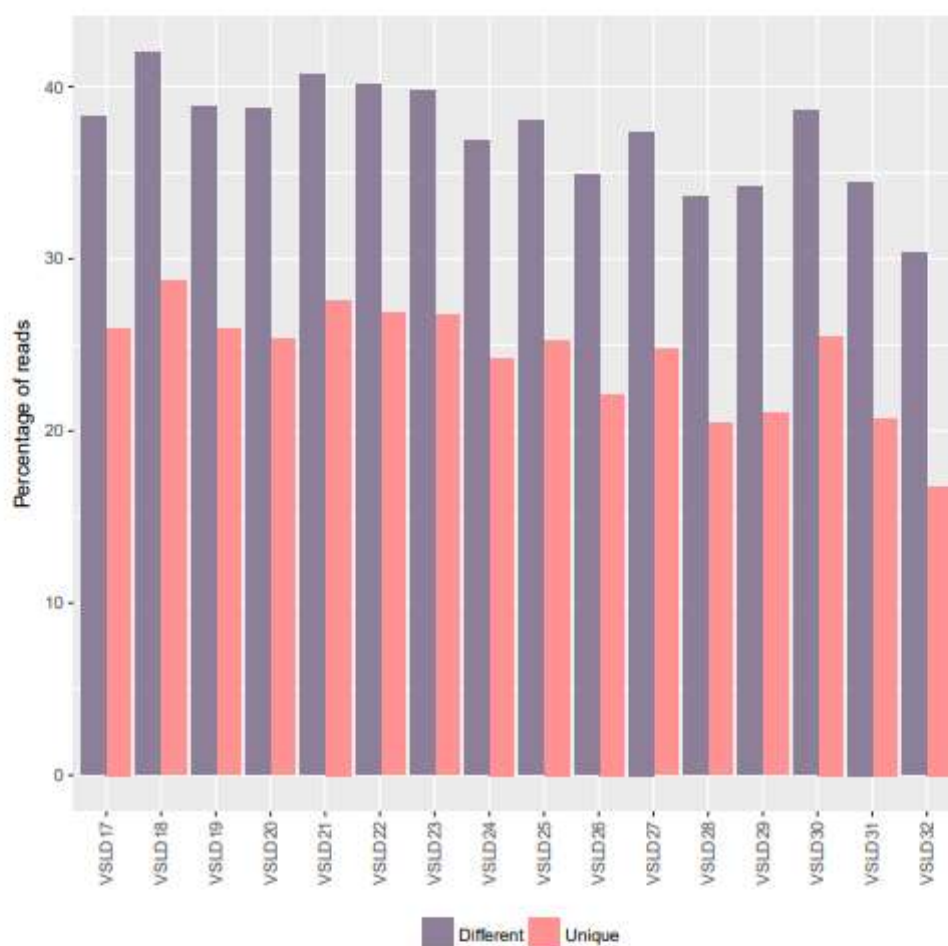


Figure 3: **Percentage of different and unique reads in each sample.** These percentages were calculated relative to the number of reads after preprocessing step.

3 Mapping

Reads were mapped onto the mm10 assembly of *Mus musculus* genome using STAR [3] version 2.5.3a. Figure 4 on the following page provides a summary of mapping results.

Figure 5 on page 7 represents read coverage over genes in all samples (coverage was computed for each gene percentile using geneBodyCoverage from RSeQC [4] version 2.6.4).

Figure 6 on page 8 provides the median of transcript integrity numbers (TIN) [5] computed across all transcripts with at least 10 mapped reads. TIN is a metric dedicated to capture the uniformity of coverage for a given transcript, and thus is a measure of RNA integrity. TIN score is the percentage of transcript that has uniform read coverage and ranges from 0 (the worst) to 100 (the best).

Figure 7 on page 9 provides the proportion of uniquely aligned reads across exonic, intronic and intergenic genomic regions (using annotations from Ensembl release 100). When genome features overlapped (e.g. the same region can be annotated as both exonic and intronic when different transcripts are overlapping), they are prioritized as: exonic > intronic > intergenic regions. For example, if a read was mapped to both exonic and intronic regions, it will be assigned to exonic region.

4 Quantification

Gene expression quantification was performed from uniquely aligned reads using htseq-count [6] version 0.6.1p1, with annotations from Ensembl version 100 and "union" mode². Figure 8 on page 10 provides a summary of quantification results. Only non-ambiguously assigned reads have been retained for further analyses.

5 Data exploration

Figure 9 on page 11 provides an heatmap of sample-to-sample distances. The Simple Error Ratio Estimate (SERE) [7] coefficient that quantifies global RNA-seq sample differences has been used. A SERE coefficient of 0 indicates data duplication, a score of 1 corresponds to faithful replication (samples differ exactly as would be expected due to Poisson variation). If RNA-Seq samples are truly different, this coefficient is greater than 1 (overdispersion), and the more the coefficient is high, the more the samples are different.

Figure 10 on page 12 represents the first principal components of a Principal Component Analysis, showing the main sources of variance in the data.

²<http://htseq.readthedocs.io/en/master/count.html>

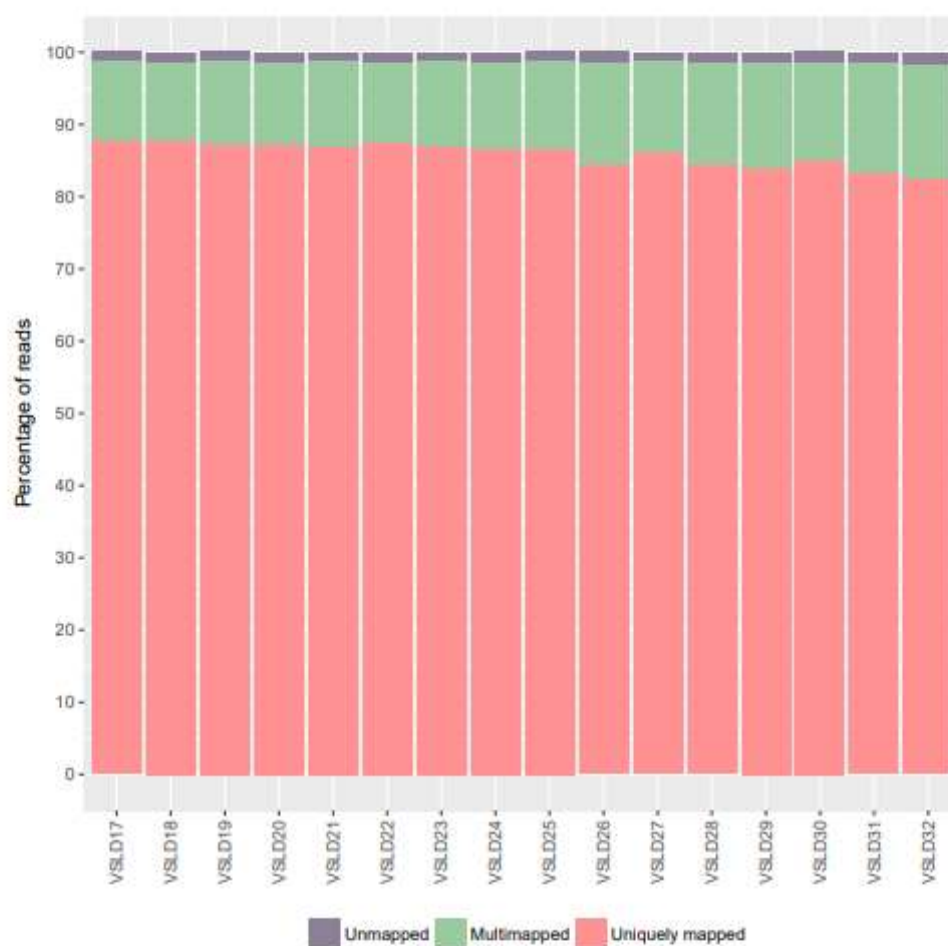


Figure 4: **Summary of mapping results.** This barplot represents the percentage of reads mapped only once on the genome (uniquely mapped), mapped at several locations on the genome (multi-mapped), or not mapped onto the genome (unmapped). These percentages were calculated relative to the number of input reads (i.e. reads kept after preprocessing).

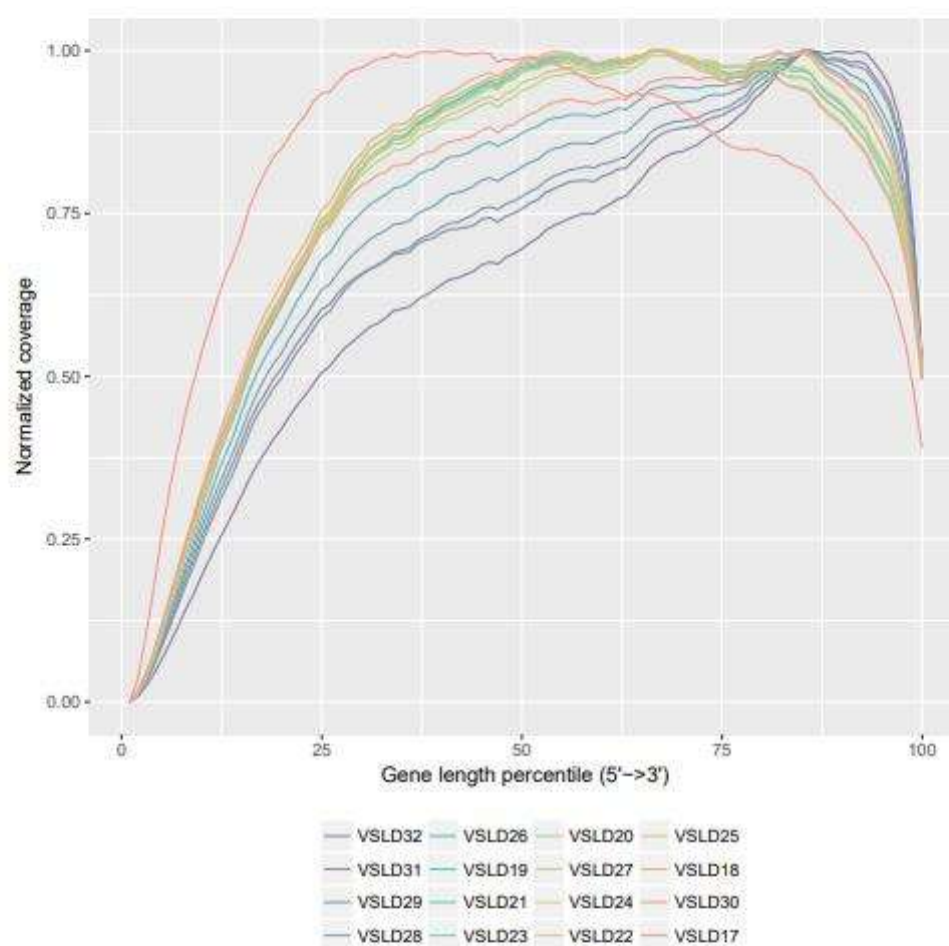


Figure 5: **Read coverage over genes in all samples.** This plot represents the normalized coverage (y-axis) at all percentiles of gene length (x-axis). Genes with mRNA length below 100bp were skipped from this analysis. In the legend, samples are ordered according to their Pearson's skewness coefficient (samples with more skewness are displayed at the beginning of the legend).

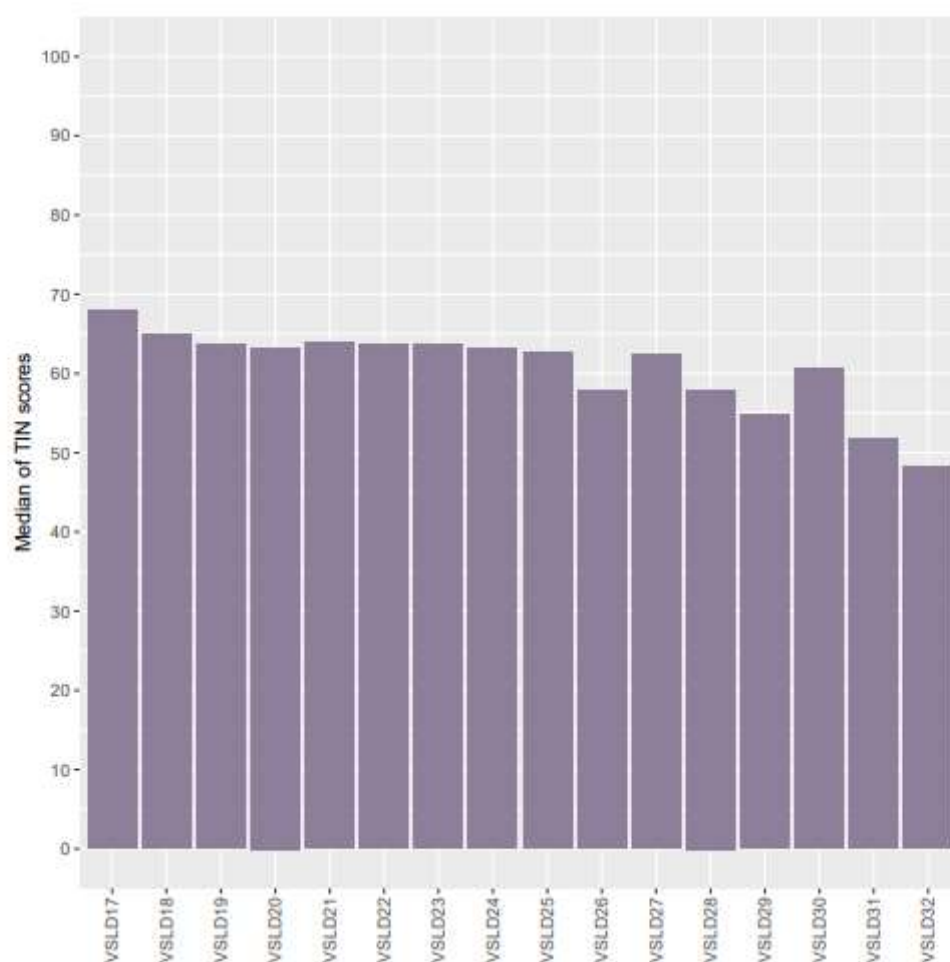


Figure 6: **Median of TIN scores for each sample.** This barplot represents the median of TIN scores (y-axis), in all samples (x-axis). TIN score is the percentage of transcript that has uniform read coverage and ranges from 0 (the worst) to 100 (the best). Transcript with a number of mapped reads below 10 were skipped from the analysis.

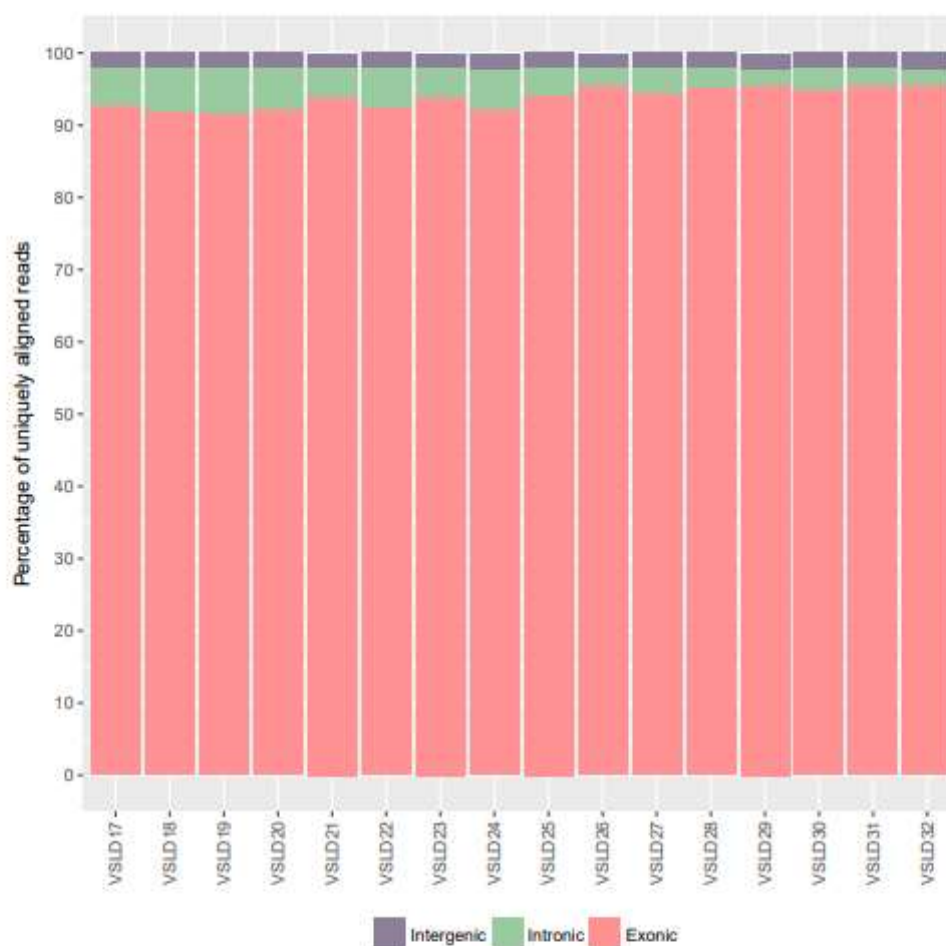


Figure 7: **Reads distribution over annotated genome features.** This barplot represents the proportion of reads aligned to exonic, intronic or intergenic regions, among all uniquely aligned reads.

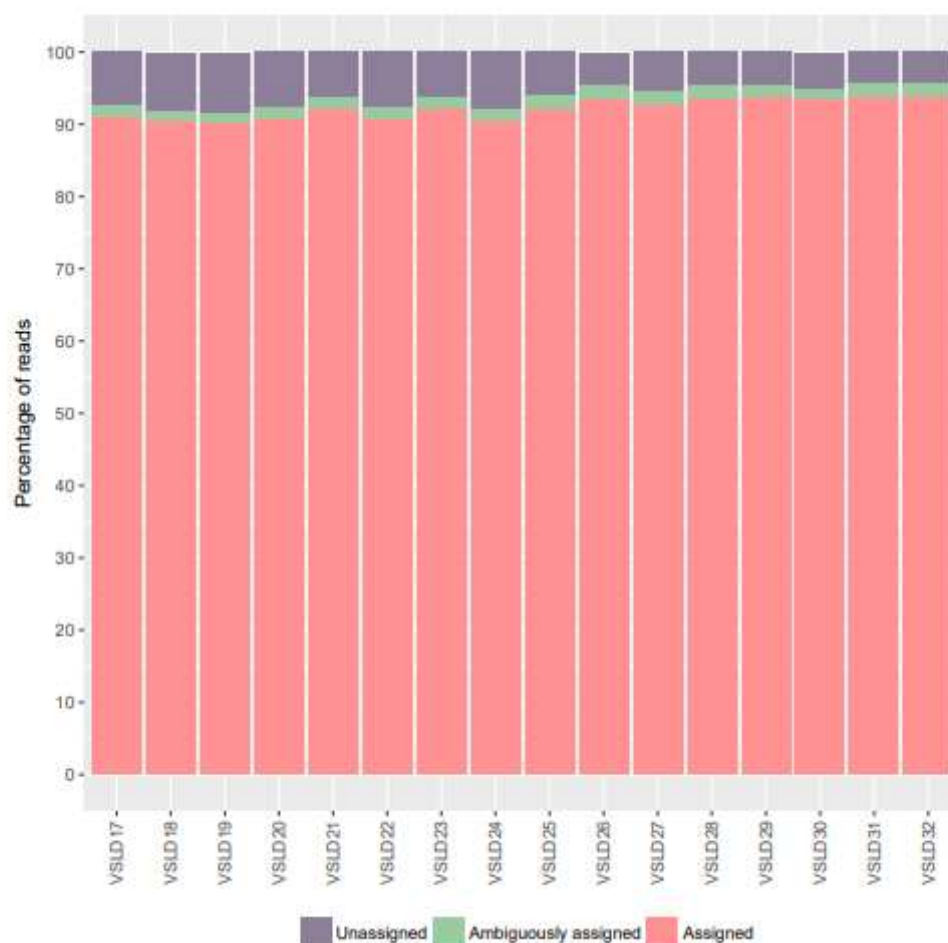


Figure 8: **Summary of quantification results.** This barplot represents the proportion of reads aligned to a genomic region corresponding to one annotated gene (Assigned), to more than one annotated gene (Ambiguously assigned) or to no annotated gene (Unassigned), among all uniquely aligned reads.

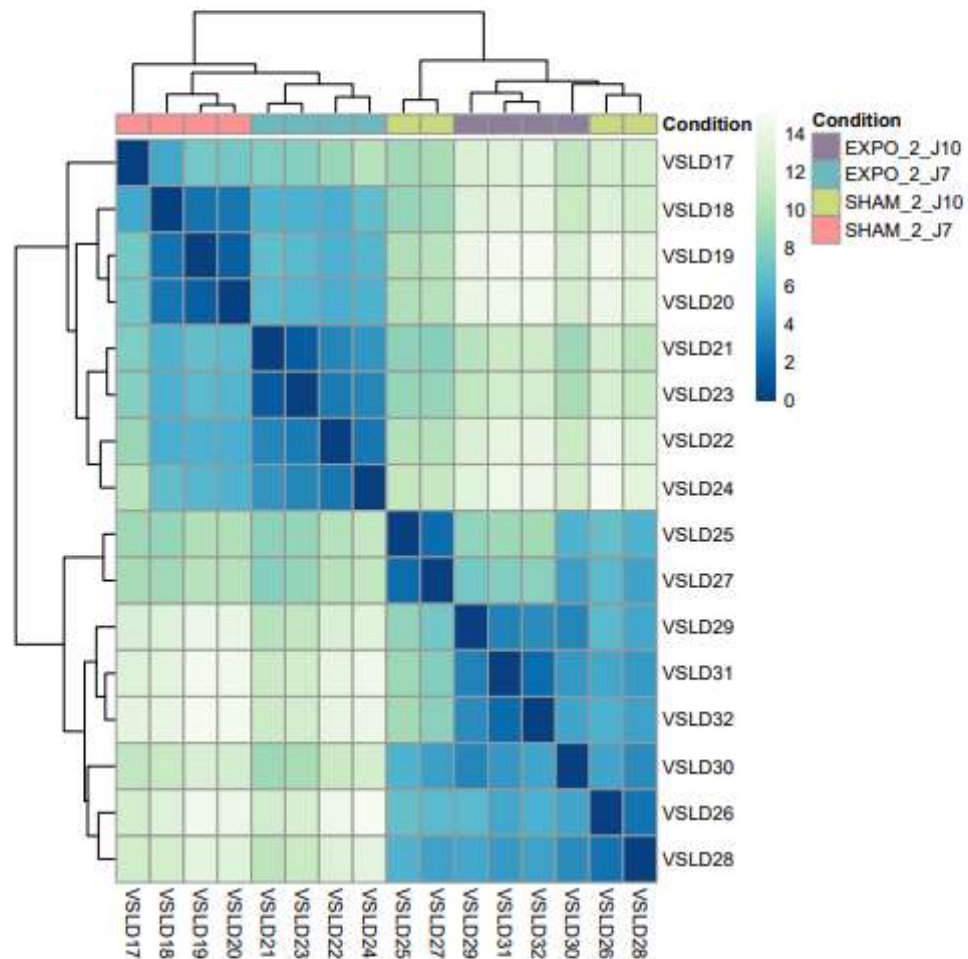


Figure 9: **Heatmap of sample-to-sample distances.** Sample-to-sample distances correspond to SERE [7] coefficient. Hierarchical clustering was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) algorithm.

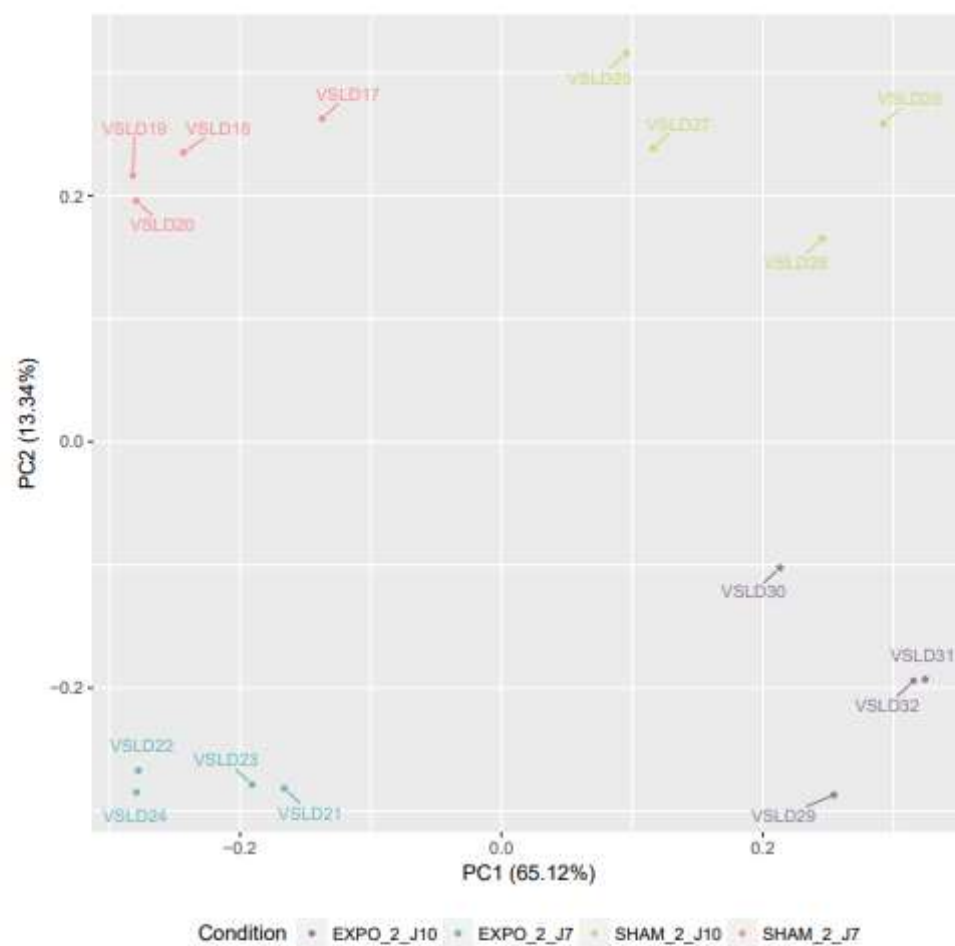


Figure 10: **Principal component analysis.** PC_i axis represents the principal component *i* and the number into brackets indicates the percentage of explained variance associated with this axis. Principal Component Analysis was computed on regularized logarithm transformed data calculated with the method proposed in [8].

6 Differential gene expression analysis

Comparisons of interest (listed in Table 2) were performed using the test for differential expression indicated in Table 2, proposed by Love et al. [8] and implemented in the Bioconductor package DESeq2 version 1.16.1.

Table 2: Differential expression comparisons performed.

Name of the comparison	Statistical test	Variable(s) taken into account in the model	Levels compared	Sample(s) filtered out
EXPO_2_J7 vs SHAM_2_J7	Wald	Condition	EXPO_2_J7 vs SHAM_2_J7	None
EXPO_2_J10 vs SHAM_2_J10	Wald	Condition	EXPO_2_J10 vs SHAM_2_J10	None

Genes with no p-value in the resulting file correspond to genes with high Cook's distance that were filtered out. Cook's distance is a measure of how much a single sample is influencing the fitted coefficients for a gene, and a large value of Cook's distance is intended to indicate an outlier count.

P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method [9].

Genes with no adjusted p-value in the resulting file correspond to genes filtered out in the independent filtering step. Independent filtering based on the mean of normalized counts was performed in order to filter out those genes that have no or little chance of showing significance evidence of differential expression (without looking at their statistic). Indeed, genes with very low counts in all samples are not likely to be significantly differentially expressed. This independent filtering results in increased detection power.

Table 3: Number of significantly differentially expressed genes. These genes were selected using the following thresholds: adjusted p-value lower than 0.05 and absolute value of log2 Fold-Change greater than 1.

Name of the comparison (A vs B)	Number of over-expressed genes (A>B)	Number of under-expressed genes (A<B)	Number of significantly differentially expressed genes
EXPO_2_J7 vs SHAM_2_J7	125	541	666
EXPO_2_J10 vs SHAM_2_J10	141	435	576

Table 3 provides the number of significantly differentially expressed genes in all comparisons.

Figures 11 on the following page to 12 on page 15 represent the results of these comparisons.

Figure 13 on page 16 provides a Venn diagram comparing the sets of significantly differentially expressed genes highlighted in several comparisons.

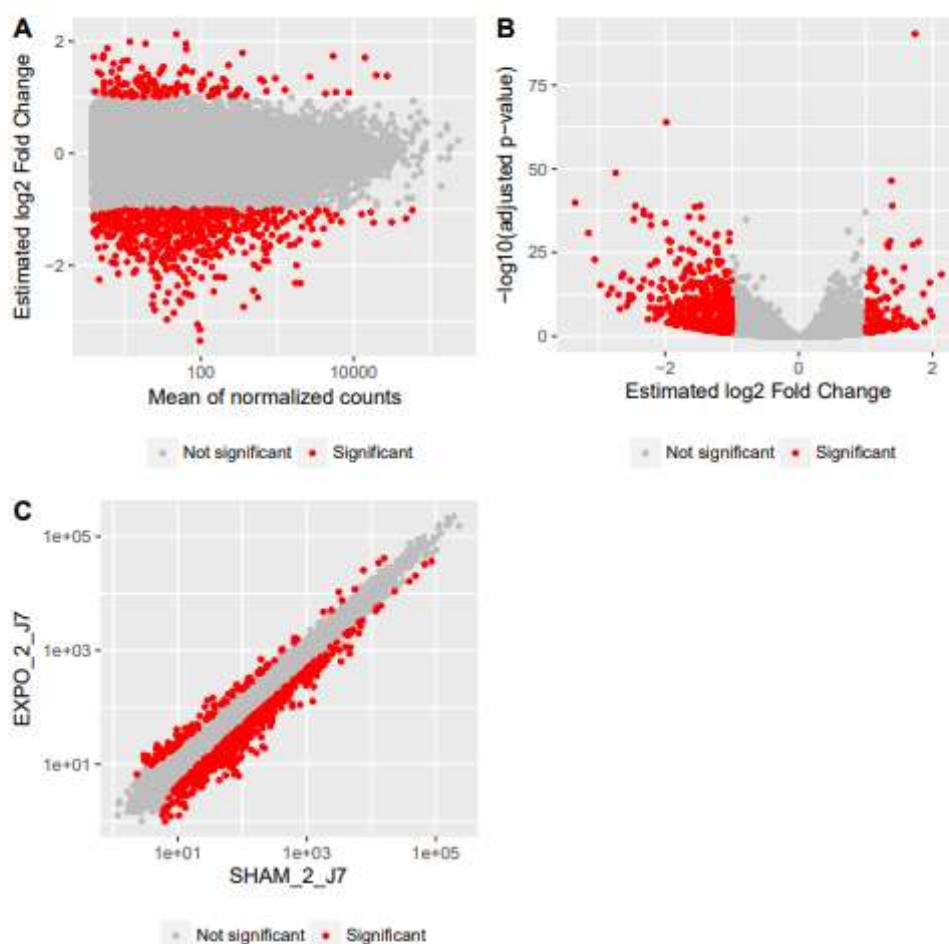


Figure 11: **EXPO.2.J7 vs SHAM.2.J7 comparison.** Panel **A**: MA-plot representing the estimated log2 Fold-Change as a function of the mean of normalized counts. Panel **B**: Volcano-plot representing $-\log_{10}(\text{adjusted p-value})$ as a function of the estimated log2 Fold-Change. Panel **C**: Scatter-plot comparing the mean normalized counts for each condition. A pseudocount of 1 was added to all values in order to represent genes that are not expressed in one condition. Significant genes were selected using the following thresholds: adjusted p-value lower than 0.05 and absolute value of log2 Fold-Change greater than 1.

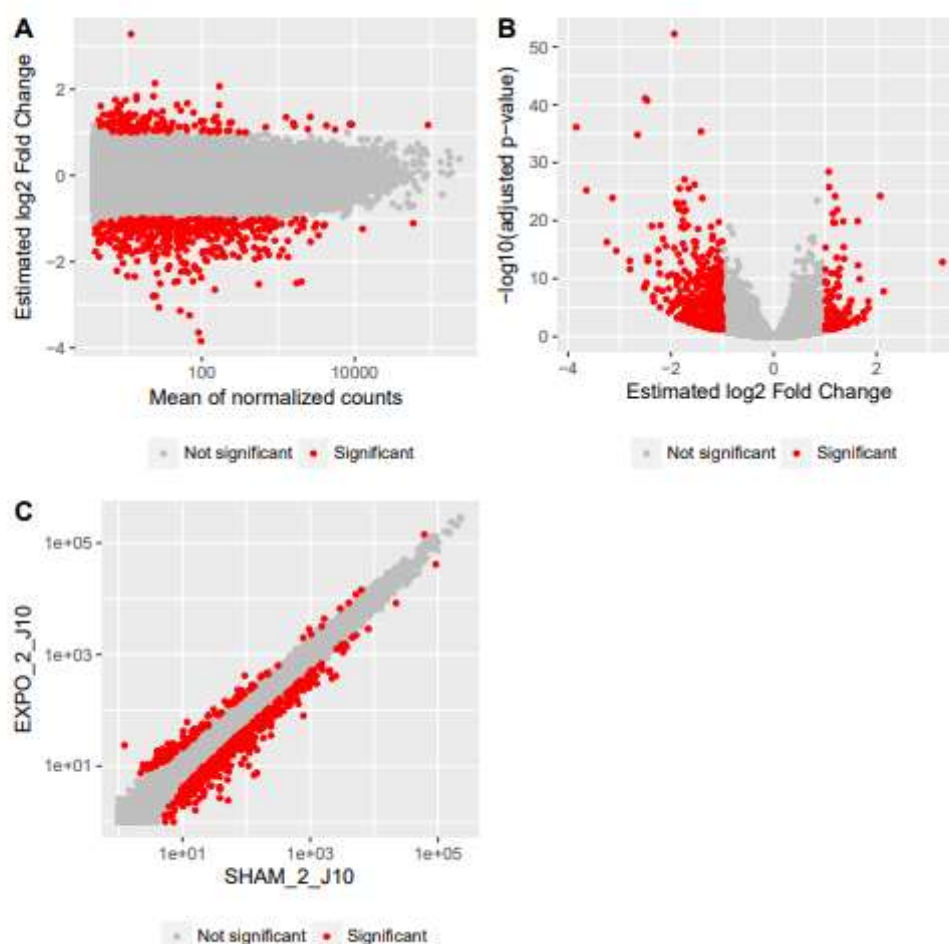


Figure 12: **EXPO_2_J10 vs SHAM_2_J10 comparison.** Panel **A**: MA-plot representing the estimated log₂ Fold-Change as a function of the mean of normalized counts. Panel **B**: Volcano-plot representing $-\log_{10}(\text{adjusted p-value})$ as a function of the estimated log₂ Fold-Change. Panel **C**: Scatter-plot comparing the mean normalized counts for each condition. A pseudocount of 1 was added to all values in order to represent genes that are not expressed in one condition. Significant genes were selected using the following thresholds: adjusted p-value lower than 0.05 and absolute value of log₂ Fold-Change greater than 1.

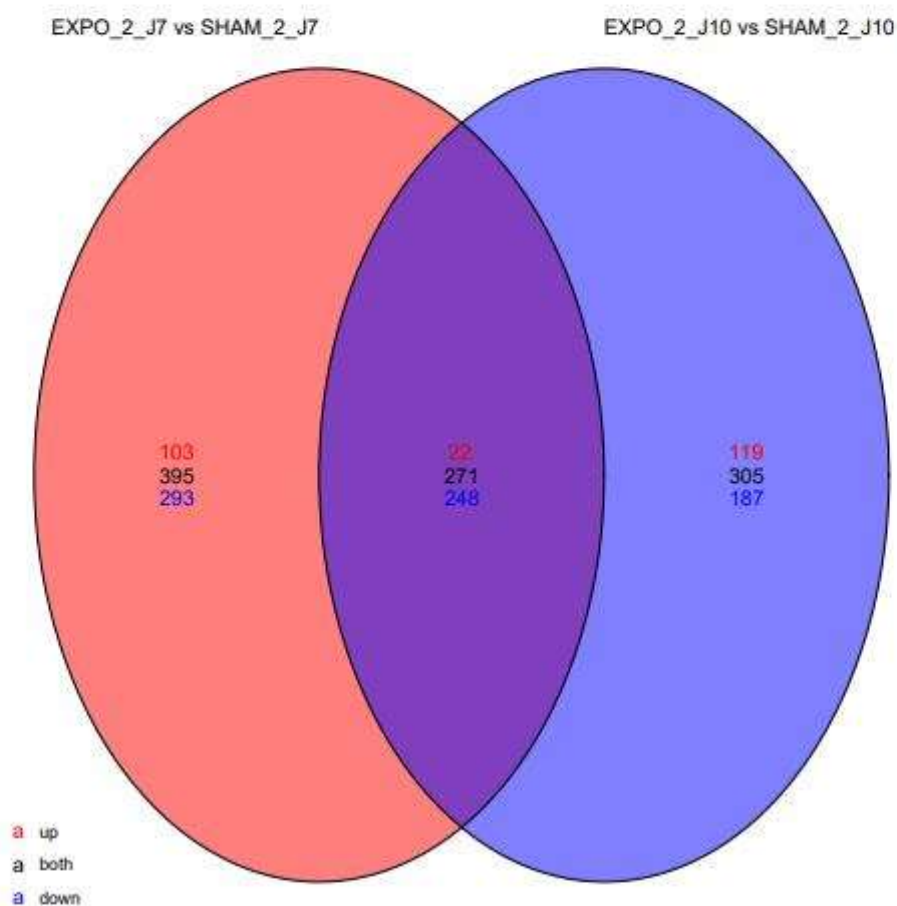


Figure 13: **Venn diagram comparing the sets of significantly differentially expressed genes highlighted in several comparisons.** Significant genes were selected using the following thresholds: adjusted p-value lower than 0.05 and absolute value of log2 Fold-Change greater than 1. Red numbers correspond to significantly over-expressed genes, blue numbers to significantly under-expressed genes and black numbers to all significantly differentially expressed genes.

7 Files delivered

7.1 Alignment files

For each sample, an alignment file in BAM format and the corresponding index (BAI format) are available. The BAM files can be opened using a genome browser, for example Integrative Genomics Viewer³.

7.2 Result file

A TSV (tab-separated values) file provides raw read counts and normalized read counts for each gene together with gene annotations and the p-value, adjusted p-value and log2 fold-change for each performed comparison. This file contains only genes with at least one read count in one sample. It can be opened with a spreadsheet software like Excel or Calc. The "," character is used as decimal separator in numeric columns. This file contains the following columns:

Ensembl Gene ID Ensembl identifier of the gene, corresponding to Ensembl release 100.

Raw read counts Number of reads that have been assigned to the gene.

Normalized read counts Number of reads that have been assigned to the gene, normalized to make these counts comparable between samples, using the method described in [10].

Normalized read counts divided by median of transcripts length in kb Number of reads that have been assigned to the gene, normalized between samples and divided by transcript length in kb (calculated as the median of the length of all transcripts corresponding to this gene). These expression estimates can be compared across genes and samples.

Median of transcripts length Median of the length of all transcripts corresponding to this gene (in bp).

Gene name Common gene name.

Description Description of the gene.

Chromosome name Name of the chromosome where the gene is located.

Start gene position Start coordinate of the gene.

End gene position End coordinate of the gene.

Gene biotype Biotype of the gene as defined in Ensembl⁴.

GO:biological process Biological process Gene Ontology terms associated with this gene. A biological process term describes a series of events accomplished by one or more organized assemblies of molecular functions.

GO:molecular function Molecular function Gene Ontology terms associated with this gene. A molecular function term describes activities that occur at the molecular level.

GO:cellular component Cellular component Gene Ontology terms associated with this gene. A cellular component term describes a location, relative to cellular compartments and structures, occupied by a macromolecular machine when it carries out a molecular function.

log2 FC Log2 of the expression fold change estimated, reflecting differential expression between the two compared conditions.

p-value P-value of the statistical test.

Adjusted p-value P-value of the statistical test, adjusted for multiple testing.

³IGV is freely available on <http://software.broadinstitute.org/software/igv>

⁴<https://www.ensembl.org/Help/Faq?id=468>

8 Version information

8.1 Version of used tools

Table 4 provides the tools used in GenomEast RNA-seq pipeline version 1.2.2 (used to perform the analyses described in the report) and their corresponding version.

Table 4: Tools used for the analyses presented in this report.

Tool	Release	Description
cutadapt	1.10	To trim low quality bases and adapter sequences from the reads and to remove too-short reads after trimming.
FastQC	0.11.5	To perform quality controls on the reads.
HTSeq	0.6.1p1	To compute the number of reads in annotated transcribed regions.
R	3.3.2	To perform statistical analysis, graphics and to generate this report.
RSeqQC	2.6.4	To perform quality controls on the alignments.
samtools	1.3.1	To manipulate SAM/BAM files.
STAR	2.5.3a	To perform spliced alignment of reads onto a reference genome.

8.2 Version of used R packages

```
## R version 3.3.2 (2016-10-31)
## Platform: x86_64-pc-linux-gnu (64-bit)
## Running under: Scientific Linux release 6.7 (Carbon)
##
## locale:
## [1] LC_CTYPE=fr_FR.UTF-8      LC_NUMERIC=C
## [3] LC_TIME=fr_FR.UTF-8      LC_COLLATE=fr_FR.UTF-8
## [5] LC_MONETARY=fr_FR.UTF-8  LC_MESSAGES=fr_FR.UTF-8
## [7] LC_PAPER=fr_FR.UTF-8     LC_NAME=C
## [9] LC_ADDRESS=C             LC_TELEPHONE=C
## [11] LC_MEASUREMENT=fr_FR.UTF-8 LC_IDENTIFICATION=C
##
## attached base packages:
## [1] parallel stats4 methods grid stats graphics grDevices
## [8] utils datasets base
##
## other attached packages:
## [1] DESeq2_1.16.1             SummarizedExperiment_1.4.0
## [3] Biobase_2.34.0            GenomicRanges_1.26.4
## [5] GenomeInfoDb_1.10.3      IRanges_2.8.2
## [7] S4Vectors_0.12.2         BiocGenerics_0.22.0
## [9] ggrepel_0.6.5             ggfortify_0.4.1
## [11] pheatmap_1.0.8           reshape2_1.4.2
## [13] VennDiagram_1.6.18       futile.logger_1.4.1
## [15] knitr_1.12.3             xtable_1.8-2
## [17] cowplot_0.8.0            ggplot2_2.2.1
##
## loaded via a namespace (and not attached):
## [1] locfit_1.5-9.1           Rcpp_0.12.13             lattice_0.20-34
## [4] tidyr_0.6.1             assertthat_0.1           digest_0.6.12
```

```
## [7] R6_2.2.0          plyr_1.8.4          futile.options_1.0.0
## [10] backports_1.0.5    acepack_1.4.1       RSQLite_1.1-2
## [13] evaluate_0.10      zlibbioc_1.20.0     lazyeval_0.2.0
## [16] annotate_1.50.0     data.table_1.10.4   rpart_4.1-10
## [19] Matrix_1.2-7.1     checkmate_1.8.2     labeling_0.3
## [22] splines_3.3.2      BiocParallel_1.6.6  geneplotter_1.50.0
## [25] stringr_1.2.0      foreign_0.8-67      htmlwidgets_0.5
## [28] RCurl_1.95-4.8     munsell_0.4.3       base64enc_0.1-3
## [31] htmltools_0.3      nnet_7.3-12         tibble_1.2
## [34] gridExtra_2.2.1    htmlTable_1.9       Hmisc_4.0-3
## [37] XML_3.98-1.6       dplyr_0.5.0         bitops_1.0-6
## [40] gtable_0.2.0       DBI_0.6-1           magrittr_1.5
## [43] formatR_1.4        scales_0.4.1        stringi_1.1.2
## [46] XVector_0.14.1     genefilter_1.58.1   latticeExtra_0.6-28
## [49] Formula_1.2-1      lambda.r_1.1.7      RColorBrewer_1.1-2
## [52] tools_3.3.2        survival_2.40-1     AnnotationDbi_1.38.0
## [55] colorspace_1.3-2    cluster_2.0.6       memoise_1.1.0
```

References

- [1] M. Martin, "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads," *EMBnet.journal*, vol. 17, no. 1, pp. 10–12, 2011.
- [2] B. Langmead and S. Salzberg, "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2," *Nat Methods*, vol. 9, no. 4, pp. 357–359, 2012.
- [3] A. Dobin, C. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. Gingeras, "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner," *Bioinformatics*, vol. 29, no. 1, pp. 15–21, 2013.
- [4] L. Wang, S. Wang, and W. Li, "RSeQC: quality control of RNA-seq experiments," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 16, pp. 2184–5, 2012.
- [5] L. Wang, J. Nie, H. Sicotte, Y. Li, J. Eckel-Passow, S. Dasari, P. Vedell, P. Barman, L. Wang, R. Weinshiboum, J. Jen, H. Huang, M. Kohli, and J. Kocher, "Measure transcript integrity using RNA-seq data," *BMC Bioinformatics*, vol. 17, no. 58, 2016.
- [6] S. Anders, P. Pyl, and W. Huber, "HTSeq—a python framework to work with high-throughput sequencing data," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 2, pp. 166–169, 2015.
- [7] S. Schulze, R. Kanwar, M. Glzenleuchter, T. Therneau, and A. Beutler, "SERE: Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq," *BMC Genomics*, vol. 13, p. 524, 2012.
- [8] M. Love, W. Huber, and S. Anders, "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2," *Genome Biol*, vol. 15, no. 12, p. 550, 2014.
- [9] Y. Benjamini and Y. Hochberg, "Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing," *J R Statist Soc B*, vol. 57, no. 1, pp. 289–300, 1995.
- [10] S. Anders and W. Huber, "Differential expression analysis for sequence count data," *Genome Biol*, vol. 11, no. 10, p. R106, 2010.

Annexe 2 : Gènes modulés à 7 jours après une exposition GSM 900 MHz à 2,155 W/kg pendant 7 jours

Gene Symbol	Definition	Log2 FC	Adjusted p-value
Ckmt1	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	1,16	2,29E-14
Il27ra	interleukin 27 receptor, alpha	1,14	4,16E-06
Dqx1	DEAQ RNA-dependent ATPase	1,06	1,50E-05
Cd5l	CD5 antigen-like	1,43	3,91E-08
Eef1a2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	1,13	6,73E-15
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	1,03	2,38E-11
Gprc6a	G protein-coupled receptor, family C, group 6, member A	1,27	9,93E-03
Ace	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	1,28	6,38E-20
Scgn	secretagogin, EF-hand calcium binding protein	1,13	7,16E-04
Dhh	desert hedgehog	1,21	1,30E-11
Gabrr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) C receptor, subunit rho 2	1,60	3,32E-04
C3	complement component 3	1,71	4,96E-28
Aldh1a7	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	1,11	4,85E-18
Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	1,31	6,94E-05
Gpr39	G protein-coupled receptor 39	1,14	6,81E-09
Rgs1	regulator of G-protein signaling 1	1,05	3,34E-09
Sele	selectin, endothelial cell	1,66	2,24E-05
Lcn2	lipocalin 2	1,57	3,34E-21
Dusp2	dual specificity phosphatase 2	1,35	1,02E-03
Angpt4	angiopoietin 4	1,13	2,09E-06
Ifi44	interferon-induced protein 44	1,22	5,73E-07
Clca3a2	chloride channel accessory 3A2	2,13	3,34E-19
Artn	artemin	1,24	2,47E-05
Cd164l2	CD164 sialomucin-like 2	1,24	3,70E-03
Tnfrsf9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	1,25	3,50E-03
Spp1	secreted phosphoprotein 1	1,39	1,09E-39
Dmp1	dentin matrix protein 1	1,52	1,14E-04
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	1,75	1,17E-03
P2rx2	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2	1,51	1,34E-03
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	1,74	4,31E-91
Usp18	ubiquitin specific peptidase 18	1,29	1,63E-12
Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d	1,04	2,25E-10
AA467197	expressed sequence AA467197	1,25	3,06E-04
Trim69	tripartite motif-containing 69	1,46	4,02E-03
Myrf1	myelin regulatory factor-like	1,88	6,40E-05
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	1,13	5,54E-07
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1,79	6,14E-29
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	1,55	2,45E-06
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1,41	4,11E-17
Fgf1	fibroblast growth factor 1	1,36	4,12E-29
Serpinf2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 2	1,17	6,66E-04

Cyp24a1	cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide 1	1,86	2,26E-13
S100g	S100 calcium binding protein G	1,12	1,89E-03
Syt15	synaptotagmin XV	1,13	2,84E-10
Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	1,19	5,66E-03
Klhdc8a	kelch domain containing 8A	1,07	1,26E-17
Pm20d1	peptidase M20 domain containing 1	1,14	3,52E-19
Mmp3	matrix metalloproteinase 3	1,31	6,54E-09
Fam178b	family with sequence similarity 178, member B	1,96	8,87E-17
H2bc6	H2B clustered histone 6	1,32	3,89E-28
Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	1,02	3,17E-08
Nrsn1	neurensin 1	1,15	8,02E-06
Mmp12	matrix metalloproteinase 12	1,03	1,69E-06
H1f4	H1.4 linker histone, cluster member	1,16	1,03E-08
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	1,08	6,13E-21
Sh2d4a	SH2 domain containing 4A	1,04	1,09E-05
Klk13	kallikrein related-peptidase 13	1,30	2,17E-03
Nell1	NEL-like 1	1,07	1,12E-03
Apol9a	apolipoprotein L 9a	1,22	1,35E-04
H4c3	H4 clustered histone 3	1,35	1,45E-04
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	1,53	2,35E-15
Glyat	glycine-N-acyltransferase	1,18	5,24E-05
S100a7a	S100 calcium binding protein A7A	1,18	1,89E-06
Klk8	kallikrein related-peptidase 8	1,13	5,51E-11
Ifi27	interferon, alpha-inducible protein 27	1,09	2,95E-18
Rps23rg1	ribosomal protein S23, retrogene 1	1,41	3,36E-04
Apol9b	apolipoprotein L 9b	1,03	3,00E-03
Cd59b	CD59b antigen	1,45	7,15E-14
Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6	1,05	1,60E-19
Lyz1	lysozyme 1	1,42	3,75E-06
Lyz2	lysozyme 2	1,38	3,56E-47
Cox7a1	cytochrome c oxidase subunit 7A1	1,33	4,74E-12
Msmg	microseminoprotein, prostate associated	1,49	6,24E-07
Prl2c2	prolactin family 2, subfamily c, member 2	1,99	1,09E-06
Tmem217	transmembrane protein 217	1,01	7,96E-03
Gbp5	guanylate binding protein 5	1,23	9,95E-08
Cdh1	cadherin 1	-2,57	8,98E-10
Fap	fibroblast activation protein	-1,37	6,29E-07
Lsr	lipolysis stimulated lipoprotein receptor	-1,67	7,35E-12
Col18a1	collagen, type XVIII, alpha 1	-1,05	6,38E-20
Col1a1	collagen, type I, alpha 1	-1,16	1,26E-07
Slc1a5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	-1,07	9,04E-14
Vwf	Von Willebrand factor	-1,85	3,40E-15
Efnb3	ephrin B3	-1,15	5,23E-23
Col26a1	collagen, type XXVI, alpha 1	-1,60	9,40E-11
Clec11a	C-type lectin domain family 11, member a	-1,16	6,86E-03

Aqp1	aquaporin 1	-1,06	1,28E-12
MLxipl	MLX interacting protein-like	-1,04	1,94E-04
Kit	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	-1,93	4,79E-26
Spo11	SPO11 meiotic protein covalently bound to DSB	-1,06	4,97E-03
Prg4	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)	-2,67	6,93E-09
Itih3	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3	-1,20	4,02E-23
Chrd	chordin	-1,13	4,35E-16
Mc5r	melanocortin 5 receptor	-1,72	1,85E-08
Ttc9b	tetratricopeptide repeat domain 9B	-1,22	1,82E-03
Bmp7	bone morphogenetic protein 7	-1,17	1,78E-12
Myt1	myelin transcription factor 1	-3,34	1,26E-40
Scarf2	scavenger receptor class F, member 2	-1,05	8,30E-03
Card14	caspase recruitment domain family, member 14	-2,50	9,31E-13
Bcas1	breast carcinoma amplified sequence 1	-1,49	1,87E-16
Tnr	tenascin R	-1,10	3,65E-12
Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2	-1,30	5,16E-04
Scube1	signal peptide, CUB domain, EGF-like 1	-1,72	1,04E-14
Vtn	vitronectin	-1,81	1,53E-09
Eya2	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 2	-1,07	1,35E-09
Crhr1	corticotropin releasing hormone receptor 1	-1,24	9,15E-03
Sfrp5	secreted frizzled-related sequence protein 5	-1,64	8,73E-07
Aoc3	amine oxidase, copper containing 3	-2,85	2,87E-13
Dcn	decorin	-1,08	1,93E-03
Mrln	myoregulin	-1,34	1,07E-03
Avpr1a	arginine vasopressin receptor 1A	-1,11	3,79E-04
Wif1	Wnt inhibitory factor 1	-1,47	1,82E-16
Col6a2	collagen, type VI, alpha 2	-1,02	2,14E-08
Tmem132e	transmembrane protein 132E	-1,27	3,18E-13
Cygb	cytoglobin	-1,31	1,38E-04
Doc2b	double C2, beta	-1,15	6,00E-09
Asgr1	asialoglycoprotein receptor 1	-1,64	1,34E-05
Ror2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2	-1,19	2,42E-12
Rab3c	RAB3C, member RAS oncogene family	-2,38	4,11E-15
Thbs4	thrombospondin 4	-1,40	5,07E-06
Hcn1	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 1	-1,49	2,29E-03
Gdf10	growth differentiation factor 10	-1,78	1,98E-07
Stmn4	stathmin-like 4	-1,39	2,71E-15
Ebf2	early B cell factor 2	-1,28	8,95E-05
Nefm	neurofilament, medium polypeptide	-1,13	7,22E-07
Nefl	neurofilament, light polypeptide	-1,43	1,76E-03
Gpc5	glypican 5	-1,61	1,42E-10
Csm2d3	CUB and Sushi multiple domains 3	-1,75	9,91E-11
Ly6h	lymphocyte antigen 6 complex, locus H	-1,24	4,18E-03
Lypd2	Ly6/Plaur domain containing 2	-1,83	6,27E-04
Serpind1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade D, member 1	-1,63	1,07E-11

Mylk	myosin, light polypeptide kinase	-1,70	1,00E-19
Cxadr	coxsackie virus and adenovirus receptor	-1,62	3,98E-20
Grik1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	-1,63	2,49E-07
Clc6	chloride intracellular channel 6	-1,13	4,52E-04
Asic1	acid-sensing (proton-gated) ion channel 1	-1,11	1,92E-06
Bmp15	bone morphogenetic protein 15	-1,68	4,45E-06
Slc22a3	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3	-2,25	8,99E-06
Thbs2	thrombospondin 2	-1,23	5,22E-26
Smoc2	SPARC related modular calcium binding 2	-1,17	7,59E-05
Arhgap28	Rho GTPase activating protein 28	-1,15	2,11E-16
St6gal2	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 2	-2,13	5,18E-23
Svil	supervillin	-1,13	2,04E-09
Col11a2	collagen, type XI, alpha 2	-1,32	5,70E-08
Fbn2	fibrillin 2	-2,00	1,68E-34
Slc22a6	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	-1,54	3,27E-03
Pcsk5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	-1,22	4,01E-23
Ms4a10	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 10	-1,66	1,14E-03
Slc1a1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	-1,98	1,14E-64
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	-1,44	1,09E-03
Slit1	slit guidance ligand 1	-1,18	1,59E-05
Jph3	junctophilin 3	-1,52	9,06E-06
Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1	-1,55	2,77E-39
Caly	calcyon neuron-specific vesicular protein	-1,25	9,95E-03
Dpysl4	dihydropyrimidinase-like 4	-1,23	3,35E-31
Zfp711	zinc finger protein 711	-1,17	1,19E-05
Col7a1	collagen, type VII, alpha 1	-1,18	4,84E-17
Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1	-1,25	3,48E-05
Myo5b	myosin VB	-1,45	2,09E-10
Sntg1	syntrophin, gamma 1	-1,90	1,19E-07
2010300C02Rik	RIKEN cDNA 2010300C02 gene	-1,03	1,48E-05
B3gat2	beta-1,3-glucuronyltransferase 2 (glucuronosyltransferase S)	-1,09	6,35E-19
Slc16a14	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14	-2,15	7,17E-06
Mrc1	mannose receptor, C type 1	-2,45	1,09E-39
Gbgt1	globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-1,39	2,21E-06
Lamc3	laminin gamma 3	-1,72	2,81E-09
Slc4a10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter-like, member 10	-2,05	1,88E-07
Sapcd2	suppressor APC domain containing 2	-1,01	1,67E-05
Snap25	synaptosomal-associated protein 25	-1,13	1,24E-03
Hdc	histidine decarboxylase	-1,02	5,46E-10
Pcsk2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	-1,10	4,17E-06
Nkx2-2	NK2 homeobox 2	-1,29	2,39E-03
Phactr3	phosphatase and actin regulator 3	-1,69	2,99E-12

Car3	carbonic anhydrase 3	-1,06	7,12E-12
Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4	-1,15	3,40E-14
Oprl1	opioid receptor-like 1	-1,29	6,26E-09
Mmp24	matrix metalloproteinase 24	-1,43	1,24E-12
Bche	butyrylcholinesterase	-1,54	2,56E-16
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	-1,54	9,06E-17
Celf3	CUGBP, Elav-like family member 3	-1,00	1,11E-04
Lrrc7	leucine rich repeat containing 7	-1,09	6,21E-05
Epha7	Eph receptor A7	-1,29	1,40E-17
Col15a1	collagen, type XV, alpha 1	-1,11	1,03E-08
Bnc2	basonuclein 2	-1,33	3,34E-09
Bend5	BEN domain containing 5	-1,28	6,33E-10
Elavl4	ELAV like RNA binding protein 4	-1,37	7,41E-07
Dmrtb1	DMRT-like family B with proline-rich C-terminal, 1	-1,37	6,77E-11
Col9a2	collagen, type IX, alpha 2	-1,33	1,73E-07
Ptch2	patched 2	-1,62	5,05E-22
Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-1,66	1,25E-11
Adgrb2	adhesion G protein-coupled receptor B2	-1,13	5,36E-08
Kcnip4	Kv channel interacting protein 4	-1,05	4,53E-03
Stk32b	serine/threonine kinase 32B	-1,95	2,08E-29
Ln timer	ligand of numb-protein X 1	-1,19	8,29E-07
Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	-2,32	2,95E-38
Pf4	platelet factor 4	-1,28	3,29E-09
Tfec	transcription factor EC	-1,28	7,55E-04
Wnt16	wingless-type MMTV integration site family, member 16	-2,07	1,89E-15
Eln	elastin	-1,51	5,96E-06
Svop1	SV2 related protein homolog (rat)-like	-1,27	8,08E-03
Slc13a4	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4	-1,07	1,19E-11
Add2	adducin 2 (beta)	-1,14	2,81E-09
Slc6a13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	-1,87	2,61E-06
Mfap5	microfibrillar associated protein 5	-1,25	5,34E-15
Clec4a2	C-type lectin domain family 4, member a2	-1,01	4,29E-03
Pianp	PILR alpha associated neural protein	-1,10	1,96E-05
Fam189a1	family with sequence similarity 189, member A1	-1,64	3,60E-09
Rab38	RAB38, member RAS oncogene family	-1,06	4,98E-07
Acan	aggreCAN	-2,22	1,11E-12
Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase	-1,69	9,62E-04
Abcc6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	-1,53	1,77E-08
Rbm3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	-1,04	1,84E-31
Dcx	doublecortin	-1,88	1,55E-15
Il13ra2	interleukin 13 receptor, alpha 2	-1,44	3,82E-03
Adgra2	adhesion G protein-coupled receptor A2	-1,11	4,70E-20
Col4a2	collagen, type IV, alpha 2	-1,23	3,18E-27
Cbln1	cerebellin 1 precursor protein	-1,97	8,20E-05
Nkd1	naked cuticle 1	-1,12	1,35E-12

Plip	plasma membrane proteolipid	-1,44	4,90E-14
Cngb1	cyclic nucleotide gated channel beta 1	-1,96	2,42E-09
Necab2	N-terminal EF-hand calcium binding protein 2	-1,29	2,64E-11
Cdh5	cadherin 5	-1,34	4,42E-18
Bean1	brain expressed, associated with Nedd4, 1	-1,12	1,90E-09
Chst5	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5	-1,29	3,43E-03
Dscam1	DS cell adhesion molecule like 1	-2,32	1,42E-17
Mpzl2	myelin protein zero-like 2	-1,08	7,44E-08
Bmp5	bone morphogenetic protein 5	-1,61	1,44E-11
Tmprs5	transmembrane protease, serine 5 (spinesin)	-1,29	3,01E-03
Nnmt	nicotinamide N-methyltransferase	-1,12	3,75E-08
Thsd4	thrombospondin, type I, domain containing 4	-2,32	3,49E-37
Stra6	stimulated by retinoic acid gene 6	-1,35	8,26E-09
Acpp	acid phosphatase, prostate	-1,24	2,52E-03
Bsn	bassoon	-1,58	9,06E-17
Sbspon	somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing	-1,89	2,22E-15
Lama1	laminin, alpha 1	-2,74	1,64E-49
Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	-1,72	3,76E-18
Sox10	SRY (sex determining region Y)-box 10	-1,02	9,81E-07
Afap1l1	actin filament associated protein 1-like 1	-1,12	2,01E-08
Wnt6	wingless-type MMTV integration site family, member 6	-2,06	4,77E-09
Tnxb	tenascin XB	-1,08	9,35E-07
Adamts15	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 15	-1,47	1,20E-16
Prss35	protease, serine 35	-1,48	1,56E-21
Ppargc1b	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	-1,43	4,57E-05
Rbm46	RNA binding motif protein 46	-1,27	1,26E-03
Fstl5	folliculin-like 5	-1,64	1,73E-10
Rnf43	ring finger protein 43	-1,29	2,62E-10
Tmem132d	transmembrane protein 132D	-1,77	1,68E-06
Tmem132c	transmembrane protein 132C	-1,91	8,28E-17
Ina	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	-1,48	9,10E-09
Tmem30b	transmembrane protein 30B	-1,07	2,52E-06
Gbp8	guanylate-binding protein 8	-1,58	1,69E-07
Scara3	scavenger receptor class A, member 3	-1,04	4,32E-29
Inpp5j	inositol polyphosphate 5-phosphatase J	-1,13	2,22E-15
Pcdh11x	protocadherin 11 X-linked	-1,30	2,51E-09
Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	-1,40	4,47E-07
Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	-2,03	1,46E-14
Wnk4	WNK lysine deficient protein kinase 4	-1,39	2,01E-11
Brinp3	bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural specific 3	-1,18	8,63E-06
Ano4	anoctamin 4	-1,10	1,07E-04
Rims4	regulating synaptic membrane exocytosis 4	-1,85	4,56E-07
Sgcg	sarcoglycan, gamma (dystrophin-associated glycoprotein)	-1,16	3,00E-17

P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	-1,08	5,01E-12
P2ry13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 13	-1,12	2,09E-10
Npy1r	neuropeptide Y receptor Y1	-1,38	1,38E-14
Adamts2	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	-1,06	4,60E-11
Cpz	carboxypeptidase Z	-1,62	5,51E-17
Fam135b	family with sequence similarity 135, member B	-1,59	4,66E-15
Slc6a20a	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20A	-1,69	6,43E-05
Dpp10	dipeptidylpeptidase 10	-1,87	2,86E-09
Arhgap33	Rho GTPase activating protein 33	-1,02	8,88E-11
Zic4	zinc finger protein of the cerebellum 4	-1,34	3,38E-23
Xpnpep2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	-2,65	2,01E-18
Sstr4	somatostatin receptor 4	-2,70	3,78E-13
Il22ra1	interleukin 22 receptor, alpha 1	-2,23	3,30E-09
Mycn	v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived	-1,00	9,20E-05
Grhl3	grainyhead like transcription factor 3	-1,04	3,79E-03
Itih2	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	-1,54	7,60E-11
Uvssa	UV stimulated scaffold protein A	-1,08	1,51E-16
Vash2	vasohibin 2	-1,11	5,34E-15
Cldn11	claudin 11	-1,62	3,61E-08
Tecta	tectorin alpha	-1,21	1,94E-09
Atp13a4	ATPase type 13A4	-1,13	6,36E-11
AW551984	expressed sequence AW551984	-1,62	4,28E-12
Gdf5	growth differentiation factor 5	-1,47	3,03E-04
Foxf2	forkhead box F2	-1,06	8,09E-05
Srcin1	SRC kinase signaling inhibitor 1	-1,08	3,21E-08
Tmc3	transmembrane channel-like gene family 3	-1,13	3,72E-04
Susd4	sushi domain containing 4	-1,22	1,13E-25
Atp6v0a4	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A4	-1,34	4,05E-13
Zkscan16	zinc finger with KRAB and SCAN domains 16	-1,01	2,17E-03
Pkhd1l1	polycystic kidney and hepatic disease 1-like 1	-1,39	8,81E-03
Vill	villin-like	-1,35	8,63E-23
Tcf15	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	-1,50	5,02E-16
En2	engrailed 2	-1,48	7,83E-04
Zfp750	zinc finger protein 750	-1,33	7,09E-04
C130074G19Rik	RIKEN cDNA C130074G19 gene	-1,44	3,06E-20
Snx22	sorting nexin 22	-1,78	6,02E-10
Col10a1	collagen, type X, alpha 1	-1,15	7,09E-05
Ppp1r3f	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3F	-1,20	1,68E-03
Dusp26	dual specificity phosphatase 26 (putative)	-1,27	2,66E-05
Sdk1	sidekick cell adhesion molecule 1	-1,00	8,99E-12
Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	-1,37	1,02E-08
Lrrc17	leucine rich repeat containing 17	-1,20	4,07E-22
Pak7	p21 (RAC1) activated kinase 7	-1,51	1,31E-04

Deup1	deuterosome assembly protein 1	-1,01	1,58E-06
Gjb6	gap junction protein, beta 6	-1,07	2,21E-04
Gpr26	G protein-coupled receptor 26	-1,35	7,87E-04
Gpr34	G protein-coupled receptor 34	-1,21	8,67E-11
Sema3d	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	-1,24	3,27E-15
Sec1	secretory blood group 1	-2,03	1,14E-08
Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	-1,31	1,79E-09
Lrfrn2	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 2	-1,85	2,00E-15
Slc26a7	solute carrier family 26, member 7	-2,49	4,66E-12
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	-1,41	1,11E-08
Ildr2	immunoglobulin-like domain containing receptor 2	-1,22	3,23E-14
Cyp2s1	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1	-1,39	9,06E-17
Erg	ETS transcription factor	-1,13	8,63E-03
Slc16a11	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 11	-1,68	5,35E-04
Slc22a2	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	-1,39	4,24E-04
Igsf21	immunoglobulin superfamily, member 21	-2,21	6,26E-12
Lamp3	lysosomal-associated membrane protein 3	-1,94	4,42E-05
Car8	carbonic anhydrase 8	-1,46	4,61E-36
Nkx6-2	NK6 homeobox 2	-1,18	6,86E-03
Piezo2	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2	-1,64	1,93E-26
Rims1	regulating synaptic membrane exocytosis 1	-1,05	1,76E-03
Fam169a	family with sequence similarity 169, member A	-1,87	1,71E-08
Dlgap3	DLG associated protein 3	-1,38	3,15E-04
Crtac1	cartilage acidic protein 1	-1,84	1,48E-22
Ccno	cyclin O	-1,06	6,51E-05
Itpr3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3	-1,17	2,24E-14
Lrrtm3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3	-1,34	6,41E-07
Egflam	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains	-1,79	1,14E-23
Kcnj6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6	-2,51	2,19E-17
Zfp536	zinc finger protein 536	-1,15	1,17E-16
Elfn2	leucine rich repeat and fibronectin type III, extracellular 2	-1,61	6,80E-06
Sptssb	serine palmitoyltransferase, small subunit B	-2,54	5,92E-13
Tril	TLR4 interactor with leucine-rich repeats	-1,45	1,21E-14
Mgat5b	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B	-1,23	9,11E-06
Cilp2	cartilage intermediate layer protein 2	-1,26	9,18E-03
Tafa2	TAFa chemokine like family member 2	-1,54	3,64E-12
Il20rb	interleukin 20 receptor beta	-1,13	6,64E-06
Pcsk9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	-1,10	3,68E-03
Cdkn2a	cyclin dependent kinase inhibitor 2A	-1,03	2,08E-03
Aplnr	apelin receptor	-1,42	9,58E-03
Hs3st5	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5	-1,38	1,32E-04
Zfp488	zinc finger protein 488	-2,13	7,32E-08

Dact1	dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1	-1,13	9,22E-15
Csrnp3	cysteine-serine-rich nuclear protein 3	-1,42	1,40E-06
Syt16	synaptotagmin XVI	-1,43	3,60E-05
Prrt3	proline-rich transmembrane protein 3	-1,44	8,42E-06
Cirbp	cold inducible RNA binding protein	-1,21	9,06E-17
Nxph1	neurexophilin 1	-1,75	6,25E-27
Kctd4	potassium channel tetramerisation domain containing 4	-1,04	7,32E-08
Vwa5b2	von Willebrand factor A domain containing 5B2	-1,30	7,11E-04
Olfml2a	olfactomedin-like 2A	-1,26	2,70E-16
Foxc2	forkhead box C2	-1,42	4,12E-10
Fam187b	family with sequence similarity 187, member B	-1,38	9,29E-04
Kcne4	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	-1,29	2,16E-05
Adamts12	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 12	-1,68	6,71E-21
Rtl3	retrotransposon Gag like 3	-1,89	1,48E-06
A4galt	alpha 1,4-galactosyltransferase	-1,00	9,01E-08
Dipk1c	divergent protein kinase domain 1C	-1,35	4,97E-07
Hes5	hes family bHLH transcription factor 5	-1,30	1,31E-03
Ccdc187	coiled-coil domain containing 187	-1,01	2,02E-04
Slitrk3	SLIT and NTRK-like family, member 3	-1,75	5,34E-18
Pou4f1	POU domain, class 4, transcription factor 1	-1,36	4,03E-03
Fgfbp1	fibroblast growth factor binding protein 1	-1,07	2,25E-10
Osr1	odd-skipped related transcription factor 1	-1,22	1,30E-12
Ranbp3l	RAN binding protein 3-like	-2,21	1,82E-16
Zdhhc22	zinc finger, DHHC-type containing 22	-2,63	2,22E-19
Igf2	insulin-like growth factor 2	-1,55	7,56E-09
Fndc9	fibronectin type III domain containing 9	-1,06	8,49E-05
Ccdc125	coiled-coil domain containing 125	-1,16	3,53E-06
Ndnf	neuron-derived neurotrophic factor	-1,59	1,39E-31
Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	-1,34	2,54E-05
Hcar1	hydrocarboxylic acid receptor 1	-1,79	2,59E-06
Upk1b	uroplakin 1B	-1,38	9,61E-09
Adamts16	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 16	-2,22	1,18E-36
Grm5	glutamate receptor, metabotropic 5	-1,37	1,88E-28
Gpr55	G protein-coupled receptor 55	-1,09	1,58E-03
Omg	oligodendrocyte myelin glycoprotein	-1,62	4,07E-16
Rasd1	RAS, dexamethasone-induced 1	-1,11	5,69E-04
Shisa3	shisa family member 3	-1,35	1,50E-07
Dscam	DS cell adhesion molecule	-2,47	1,53E-35
Neto1	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	-2,14	3,43E-23
Tnfsf15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-1,17	2,03E-11
Vwc2	von Willebrand factor C domain containing 2	-1,64	1,70E-05
Rtn4rl2	reticulon 4 receptor-like 2	-1,15	8,11E-03
Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	-2,08	9,41E-12
Tacstd2	tumor-associated calcium signal transducer 2	-1,81	1,12E-05

Usp29	ubiquitin specific peptidase 29	-1,10	2,50E-03
Serpinb6c	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6c	-1,18	5,83E-04
Adarb2	adenosine deaminase, RNA-specific, B2	-1,06	9,60E-03
Lrrtm4	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4	-1,63	1,50E-11
Pcdh15	protocadherin 15	-1,98	2,75E-12
Shisa7	shisa family member 7	-3,15	1,59E-31
Gper1	G protein-coupled estrogen receptor 1	-1,01	1,09E-11
Tgm5	transglutaminase 5	-1,62	4,89E-04
Mast1	microtubule associated serine/threonine kinase 1	-1,84	1,26E-07
Srcap	Snf2-related CREBBP activator protein	-1,02	2,26E-03
Syne3	spectrin repeat containing, nuclear envelope family member 3	-1,01	3,72E-05
Irs4	insulin receptor substrate 4	-1,34	1,56E-05
Kcnmb4	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	-1,70	1,31E-15
Nt5c1a	5'-nucleotidase, cytosolic 1A	-1,69	2,51E-06
Lmntd1	lamin tail domain containing 1	-1,31	4,04E-08
Wdr86	WD repeat domain 86	-2,36	2,88E-15
Fat2	FAT atypical cadherin 2	-3,05	1,34E-23
Alk	anaplastic lymphoma kinase	-1,08	1,03E-04
Clca3a1	chloride channel accessory 3A1	-1,16	7,74E-03
Cd248	CD248 antigen, endosialin	-1,01	3,43E-09
H2bu2	H2B.U histone 2	-1,72	3,92E-05
Mab21l1	mab-21-like 1	-1,17	6,36E-03
Gjc3	gap junction protein, gamma 3	-1,27	2,63E-09
Scn3a	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	-1,88	1,98E-14
Musk	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase	-1,27	6,51E-04
Ryr3	ryanodine receptor 3	-1,47	6,97E-09
Sez6l	seizure related 6 homolog like	-2,21	6,61E-34
Kcnt1	potassium channel, subfamily T, member 1	-1,11	3,13E-08
Col25a1	collagen, type XXV, alpha 1	-2,54	3,31E-11
Grin2a	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)	-1,39	3,40E-04
Kcp	kielin/chordin-like protein	-1,81	5,51E-11
Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	-1,16	6,43E-14
Unc5c	unc-5 netrin receptor C	-1,01	2,43E-17
Nptx2	neuronal pentraxin 2	-1,03	2,39E-04
Pcnx2	pecanex homolog 2	-1,61	1,98E-04
Caln1	calneuron 1	-1,78	1,36E-10
Dcc	deleted in colorectal carcinoma	-2,03	1,00E-17
Ctnna3	catenin (cadherin associated protein), alpha 3	-1,37	1,41E-07
Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	-1,48	1,35E-29
Irx1	Iroquois homeobox 1	-1,79	2,50E-04
Galnt13	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13	-1,07	1,77E-09
Cdh3	cadherin 3	-1,38	2,19E-14
C1qtnf7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	-1,01	1,16E-05
Dpp6	dipeptidylpeptidase 6	-1,57	1,61E-25

Slc22a12	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 12	-1,24	7,55E-05
Serpina10	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 10	-1,15	3,26E-05
Fbxw24	F-box and WD-40 domain protein 24	-1,57	1,30E-04
Trank1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	-1,20	3,13E-04
Tcp11	t-complex protein 11	-1,09	1,96E-05
Msln	mesothelin	-2,14	4,00E-09
Lrrc43	leucine rich repeat containing 43	-1,32	1,89E-07
Sorcs3	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3	-2,80	5,20E-15
Col23a1	collagen, type XXIII, alpha 1	-1,91	6,33E-29
Unc5d	unc-5 netrin receptor D	-1,05	1,93E-04
Slc22a8	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	-1,60	7,12E-11
Cntn4	contactin 4	-1,70	6,05E-05
Aox3	aldehyde oxidase 3	-1,15	5,39E-07
Zpld1	zona pellucida like domain containing 1	-1,94	6,80E-05
Hhip	Hedgehog-interacting protein	-1,04	8,62E-08
Scn1a	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	-1,42	1,85E-04
Hmcn1	hemacentin 1	-2,22	6,30E-22
Myo1h	myosin 1H	-1,18	7,80E-05
Cntnap5b	contactin associated protein-like 5B	-2,09	5,73E-07
Pi15	peptidase inhibitor 15	-1,79	6,33E-11
Sptbn2	spectrin beta, non-erythrocytic 2	-1,82	1,39E-08
Efcc1	EF hand and coiled-coil domain containing 1	-1,61	1,32E-07
Trp53i11	transformation related protein 53 inducible protein 11	-1,08	2,70E-09
Slc7a14	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 14	-1,35	5,51E-11
Insyn2b	inhibitory synaptic factor family member 2B	-1,29	1,31E-16
Plpp4	phospholipid phosphatase 4	-1,48	2,44E-11
Ntn5	netrin 5	-1,64	3,44E-06
Grid2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	-1,35	1,06E-20
Ptgdr	prostaglandin D receptor	-1,29	9,31E-10
Apcdd1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	-1,47	1,09E-39
Lrrtm2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	-1,21	2,04E-09
Cyp4f15	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15	-1,57	4,30E-07
Ecscr	endothelial cell surface expressed chemotaxis and apoptosis regulator	-1,09	5,43E-08
Ripor3	RIPOR family member 3	-1,36	7,03E-10
Mcidas	multiciliate differentiation and DNA synthesis associated cell cycle protein	-1,32	1,49E-05
Thbd	thrombomodulin	-1,24	2,44E-18
Lrrc55	leucine rich repeat containing 55	-1,50	1,51E-08
Sp5	trans-acting transcription factor 5	-1,48	6,73E-04
Foxd1	forkhead box D1	-1,02	2,68E-05
Cdc20b	cell division cycle 20B	-1,59	2,75E-07
Col22a1	collagen, type XXII, alpha 1	-1,24	8,87E-31

Slc8a3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3	-1,58	1,67E-19
Fam155a	family with sequence similarity 155, member A	-1,60	2,63E-10
Zan	zonadhesin	-1,07	8,44E-04
Kcnj13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	-1,18	4,61E-10
Nhs12	NHS-like 2	-1,46	3,24E-20
Prpt4	proline-rich transmembrane protein 4	-1,64	8,21E-04
Gm4969	predicted gene 4969	-1,29	3,87E-03
Mroh3	maestro heat-like repeat family member 3	-1,13	4,35E-03
A530084C06Rik	RIKEN cDNA A530084C06 gene	-1,48	5,65E-03
F830016B08Rik	RIKEN cDNA F830016B08 gene	-1,09	8,73E-03
Kcnb2	potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 2	-1,94	2,04E-10
Foxl1	forkhead box L1	-1,04	5,39E-04
Rassf10	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 10	-1,07	2,24E-04
Lhfpl3	lipoma HMGIC fusion partner-like 3	-1,64	2,20E-36

En vert les gènes surexprimés et en rouge les gènes sous-exprimés

Annexe 3 : Gènes modulés à 10 jours après une exposition GSM 900 MHz à 2,155 W/kg pendant 7 jours

Gene Symbol	Definition	Log2 FC	Adjusted p-value
Ckmt1	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	1,04	5,52E-10
Vsig2	V-set and immunoglobulin domain containing 2	1,28	6,92E-04
Esam	endothelial cell-specific adhesion molecule	1,64	1,13E-20
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1,15	6,51E-22
Mapk13	mitogen-activated protein kinase 13	1,24	7,34E-10
Cox4i2	cytochrome c oxidase subunit 4I2	1,26	1,29E-07
Wnt2	wingless-type MMTV integration site family, member 2	1,01	4,48E-16
Eef1a2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	1,35	1,37E-20
Wt1	Wilms tumor 1 homolog	1,55	1,55E-03
Wfdc2	WAP four-disulfide core domain 2	1,36	8,70E-05
Coch	cochlin	1,12	1,20E-11
Akr1c18	aldo-keto reductase family 1, member C18	1,65	6,02E-04
Scgn	secretagogin, EF-hand calcium binding protein	1,41	1,39E-05
Serpinb9b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9b	1,04	1,94E-05
F2rl1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	1,03	4,21E-05
Dhh	desert hedgehog	1,27	3,72E-11
Meiob	meiosis specific with OB domains	1,76	6,48E-05
Cst6	cystatin E/M	1,31	3,76E-04
Fosl1	fos-like antigen 1	1,07	1,91E-07
Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3	2,07	5,47E-25
Gpr39	G protein-coupled receptor 39	1,26	2,39E-09
F5	coagulation factor V	1,05	9,07E-07
Lcn2	lipocalin 2	1,22	2,50E-14
Stmn2	stathmin-like 2	1,07	3,70E-29
Crct1	cysteine-rich C-terminal 1	2,14	1,61E-08
1700009N14Rik	RIKEN cDNA 1700009N14 gene	1,21	9,42E-03
Ereg	epiregulin	1,16	8,18E-06
Npy	neuropeptide Y	1,13	6,01E-08
Slco1b2	solute carrier organic anion transporter family, member 1b2	1,39	1,39E-03
Thy1	thymus cell antigen 1, theta	1,18	2,69E-20
AA467197	expressed sequence AA467197	1,47	6,57E-06
Scx	scleraxis	1,10	4,80E-03
Cd207	CD207 antigen	1,15	2,50E-03
Lmo1	LIM domain only 1	1,03	4,52E-07
Lcn8	lipocalin 8	1,75	7,84E-04
H2-M1	histocompatibility 2, M region locus 1	1,75	6,67E-05
Cyp24a1	cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide 1	1,67	1,18E-10
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2	1,17	6,90E-09
Klhdc8a	kelch domain containing 8A	1,16	1,76E-20
Trem1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	1,18	1,70E-03
Mmp3	matrix metalloproteinase 3	1,09	1,92E-06

Defb1	defensin beta 1	1,00	2,85E-12
Clec14a	C-type lectin domain family 14, member a	1,05	6,50E-04
Fam178b	family with sequence similarity 178, member B	1,05	3,24E-04
Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	1,01	6,98E-07
Bex4	brain expressed X-linked 4	1,04	1,12E-08
Dleu7	deleted in lymphocytic leukemia, 7	1,24	2,51E-03
Gja3	gap junction protein, alpha 3	1,07	5,88E-03
Ivl	involucrin	1,19	9,18E-03
Crh	corticotropin releasing hormone	1,61	3,46E-03
Sprr1a	small proline-rich protein 1A	1,38	8,18E-03
Tmem171	transmembrane protein 171	1,64	4,76E-13
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	1,19	6,16E-25
Nrgn	neurogranin	1,46	8,80E-05
Kcnip1	Kv channel-interacting protein 1	1,37	3,61E-14
Klk13	kallikrein related-peptidase 13	1,84	1,19E-05
Apol9a	apolipoprotein L 9a	1,20	2,01E-04
Glyat	glycine-N-acyltransferase	1,14	5,16E-05
Klk8	kallikrein related-peptidase 8	1,28	1,78E-12
Rps23rg1	ribosomal protein S23, retrogene 1	1,32	6,00E-03
Agtr2	angiotensin II receptor, type 2	1,23	4,26E-05
Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	1,36	3,53E-16
Ass1	argininosuccinate synthetase 1	1,08	1,70E-26
Cacng6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	1,06	7,82E-04
Prl2c2	prolactin family 2, subfamily c, member 2	3,28	1,40E-13
Rab26	RAB26, member RAS oncogene family	1,21	1,16E-11
Nwd2	NACHT and WD repeat domain containing 2	1,23	1,13E-04
Gm14399	predicted gene 14399	1,01	9,01E-03
1600014C23Rik	RIKEN cDNA 1600014C23 gene	1,43	5,82E-03
Cdh1	cadherin 1	-2,52	4,08E-09
Egfl6	EGF-like-domain, multiple 6	-1,16	4,37E-04
Vwf	Von Willebrand factor	-1,81	1,36E-13
Elavl3	ELAV like RNA binding protein 3	-1,21	9,34E-16
Efnb3	ephrin B3	-1,00	3,60E-17
Brinp2	bone morphogenic protein/retinoic acid inducible neural-specific 2	-1,06	1,99E-10
Aqp1	aquaporin 1	-1,04	7,92E-12
Dnah2	dynein, axonemal, heavy chain 2	-1,07	7,85E-09
Kit	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	-1,84	9,41E-23
Prg4	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)	-2,01	3,27E-05
Cdcp3	CUB domain containing protein 3	-1,10	4,45E-03
D130043K22Rik	RIKEN cDNA D130043K22 gene	-1,20	9,84E-05
Pcdha11	protocadherin alpha 11	-1,44	9,53E-03
Mc5r	melanocortin 5 receptor	-1,88	1,15E-09
Ttc9b	tetratricopeptide repeat domain 9B	-1,43	1,94E-04
Clstn3	calsyntenin 3	-1,26	2,26E-08
Bmp7	bone morphogenetic protein 7	-1,17	2,39E-12

Trpm5	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5	-1,56	4,30E-03
Myt1	myelin transcription factor 1	-3,84	7,24E-37
Card14	caspase recruitment domain family, member 14	-2,04	5,44E-09
Bcas1	breast carcinoma amplified sequence 1	-1,76	9,35E-24
Alx3	aristaless-like homeobox 3	-1,21	2,59E-05
Serac1	serine active site containing 1	-1,15	4,99E-04
Camk1g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	-1,09	3,12E-06
Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2	-1,75	8,53E-05
Scube1	signal peptide, CUB domain, EGF-like 1	-1,50	7,11E-11
Vtn	vitronectin	-1,99	1,70E-11
Aoc3	amine oxidase, copper containing 3	-2,48	5,26E-10
Dcn	decorin	-1,24	3,84E-04
Mrln	myoregulin	-1,24	2,23E-03
Slc17a8	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 8	-1,02	2,46E-04
Pde7b	phosphodiesterase 7B	-1,40	5,52E-07
Adap2	ArfGAP with dual PH domains 2	-1,09	8,42E-03
Cacna1g	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	-1,13	5,19E-10
Asgr1	asialoglycoprotein receptor 1	-1,27	1,09E-03
Vash1	vasohibin 1	-1,11	8,74E-05
Aspn	asporin	-1,07	1,64E-05
Rab3c	RAB3C, member RAS oncogene family	-3,06	1,52E-15
Dnah12	dynein, axonemal, heavy chain 12	-1,26	1,92E-07
Gdf10	growth differentiation factor 10	-1,12	2,64E-03
Stmn4	stathmin-like 4	-1,22	3,57E-11
Ebf2	early B cell factor 2	-1,35	8,57E-04
Acod1	aconitate decarboxylase 1	-1,19	8,20E-03
Ttll8	tubulin tyrosine ligase-like family, member 8	-1,13	8,01E-03
Serpind1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade D, member 1	-1,54	3,50E-10
Mylk	myosin, light polypeptide kinase	-1,46	1,64E-13
Cxadr	coxsackie virus and adenovirus receptor	-1,39	1,66E-14
Lrrc71	leucine rich repeat containing 71	-1,03	8,85E-08
Kcnk5	potassium channel, subfamily K, member 5	-1,46	1,10E-10
Cd4	CD4 antigen	-1,24	7,33E-03
Bmp15	bone morphogenetic protein 15	-1,63	5,56E-05
Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	-1,11	4,01E-05
Celsr3	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	-1,27	3,29E-06
Slc22a3	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3	-1,54	5,45E-03
Smoc2	SPARC related modular calcium binding 2	-1,89	2,86E-11
St6gal2	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 2	-2,23	2,07E-13
Svil	supervillin	-1,21	2,41E-10
Tmem178	transmembrane protein 178	-1,04	1,68E-04
Grp	gastrin releasing peptide	-1,87	6,27E-04
Fbn2	fibrillin 2	-1,30	1,32E-13

Slc22a6	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	-2,03	6,11E-05
Slc1a1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	-1,94	5,92E-53
Zfp711	zinc finger protein 711	-1,51	9,32E-07
Crispld1	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 1	-1,17	3,25E-03
Myo5b	myosin VB	-1,29	1,31E-07
Sntg1	syntrophin, gamma 1	-1,74	4,44E-05
Khdrbs2	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 2	-1,08	3,24E-03
Tmem169	transmembrane protein 169	-1,02	1,17E-03
Iqca	IQ motif containing with AAA domain	-1,12	6,98E-07
Marco	macrophage receptor with collagenous structure	-1,50	6,60E-03
Pik3c2b	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta	-1,18	9,53E-09
Myoc	myocilin	-1,39	1,31E-24
Mrc1	mannose receptor, C type 1	-1,67	6,69E-20
Serpinc1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	-1,12	2,98E-03
Gbgt1	globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-2,46	1,96E-14
Lamc3	laminin gamma 3	-1,12	1,36E-03
Slc4a10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter-like, member 10	-1,89	3,46E-06
Snap25	synaptosomal-associated protein 25	-1,60	3,11E-05
Rassf2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2	-1,02	1,42E-13
Il1b	interleukin 1 beta	-1,21	5,35E-03
Pcsk2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	-1,11	1,18E-05
Phactr3	phosphatase and actin regulator 3	-1,62	1,38E-10
Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4	-1,26	5,53E-15
Oprl1	opioid receptor-like 1	-1,65	1,72E-11
Mmp24	matrix metalloproteinase 24	-1,01	2,61E-07
Bche	butyrylcholinesterase	-1,12	1,93E-07
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	-1,90	9,35E-24
Olfm3	olfactomedin 3	-1,50	6,25E-03
Gucy1b1	guanylate cyclase 1, soluble, beta 1	-1,05	2,25E-06
Enpep	glutamyl aminopeptidase	-1,30	3,10E-06
Abca4	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4	-1,10	1,94E-07
Celf3	CUGBP, Elav-like family member 3	-1,15	7,99E-06
Faxc	failed axon connections homolog	-1,13	7,22E-03
Svep1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	-1,20	9,40E-09
Bnc2	basonuclin 2	-1,30	9,88E-08
Elavl4	ELAV like RNA binding protein 4	-1,50	1,47E-06
Dmrtb1	DMRT-like family B with proline-rich C-terminal, 1	-1,21	5,70E-09
Ptch2	patched 2	-1,03	1,56E-11
Vwa5b1	von Willebrand factor A domain containing 5B1	-1,16	1,23E-07
Angptl7	angiopoietin-like 7	-1,23	6,05E-07
Trp73	transformation related protein 73	-1,02	4,57E-07

Stk32b	serine/threonine kinase 32B	-1,76	8,91E-21
Ln timer	ligand of numb-protein X 1	-1,48	1,47E-09
Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	-2,46	1,99E-41
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1,23	4,55E-03
Tfec	transcription factor EC	-1,18	1,14E-03
Wnt16	wingless-type MMTV integration site family, member 16	-2,45	9,29E-14
Eln	elastin	-1,73	2,14E-07
Slc13a4	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4	-1,74	7,93E-28
Add2	adducin 2 (beta)	-1,55	6,02E-15
Reg3g	regenerating islet-derived 3 gamma	-1,52	4,51E-03
Grip2	glutamate receptor interacting protein 2	-1,49	5,25E-04
Slc6a13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	-1,51	1,69E-04
Pianp	PILR alpha associated neural protein	-1,20	6,65E-07
Ing4	inhibitor of growth family, member 4	-1,11	1,36E-03
Fam189a1	family with sequence similarity 189, member A1	-1,39	3,80E-06
Acan	aggrecan	-2,27	6,07E-09
Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase	-1,81	1,66E-04
Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	-1,11	4,14E-14
Abcc6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	-1,13	4,01E-05
Tub	tubby bipartite transcription factor	-1,16	3,28E-09
Smarca1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	-1,12	4,92E-10
Dcx	doublecortin	-2,06	3,90E-11
Il13ra2	interleukin 13 receptor, alpha 2	-1,68	1,01E-03
Bmx	BMX non-receptor tyrosine kinase	-1,56	4,39E-03
Cbln1	cerebellin 1 precursor protein	-2,21	9,03E-06
Plip	plasma membrane proteolipid	-1,08	9,46E-09
Dnaaf1	dynein, axonemal assembly factor 1	-1,06	4,95E-06
Cdh5	cadherin 5	-1,14	9,67E-13
Tsnaxip1	translin-associated factor X (Tsnax) interacting protein 1	-1,01	1,75E-07
Dscam1	DS cell adhesion molecule like 1	-2,25	1,16E-15
Bmp5	bone morphogenetic protein 5	-1,21	3,49E-06
Itga11	integrin alpha 11	-1,40	2,24E-11
Thsd4	thrombospondin, type I, domain containing 4	-2,50	7,83E-42
Tmem266	transmembrane protein 266	-1,53	4,91E-06
Ttc21a	tetratricopeptide repeat domain 21A	-1,44	1,49E-09
Bsn	bassoon	-1,10	1,59E-07
Chrm1	cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS	-1,16	1,18E-03
Lama1	laminin, alpha 1	-1,75	1,97E-19
Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	-1,94	5,41E-16
Afap1l1	actin filament associated protein 1-like 1	-1,38	1,86E-12
Duox1	dual oxidase 1	-1,29	2,32E-03
Palmd	palmdelphin	-1,28	2,26E-08
Adamts15	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 15	-1,52	4,83E-17

Prss35	protease, serine 35	-1,04	1,11E-09
Rbm46	RNA binding motif protein 46	-1,42	1,61E-03
Fstl5	folliculin-like 5	-1,46	2,27E-06
Rnf43	ring finger protein 43	-1,04	4,75E-06
Tmem132d	transmembrane protein 132D	-1,80	1,36E-06
Tmem132c	transmembrane protein 132C	-1,41	1,11E-09
Ina	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	-1,39	3,98E-07
Gbp8	guanylate-binding protein 8	-1,59	3,79E-08
Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	-1,70	2,38E-09
Wnk4	WNK lysine deficient protein kinase 4	-1,17	2,64E-08
Brinp3	bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural specific 3	-1,23	1,19E-05
Rims4	regulating synaptic membrane exocytosis 4	-2,80	8,32E-14
Pdzrn4	PDZ domain containing RING finger 4	-1,36	1,69E-07
P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	-1,11	3,11E-14
Npy1r	neuropeptide Y receptor Y1	-1,55	3,99E-17
Cpz	carboxypeptidase Z	-1,02	5,85E-07
Slc6a20a	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20A	-1,99	1,44E-06
Dpp10	dipeptidylpeptidase 10	-1,79	4,93E-07
Cfap221	cilia and flagella associated protein 221	-1,15	1,20E-07
Zic4	zinc finger protein of the cerebellum 4	-1,20	1,45E-17
Xpnpep2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	-1,24	2,46E-04
Sstr4	somatostatin receptor 4	-1,99	2,03E-05
Ttc29	tetratricopeptide repeat domain 29	-1,15	3,81E-04
Il22ra1	interleukin 22 receptor, alpha 1	-2,51	2,22E-09
Itih2	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	-1,14	5,12E-06
Cldn11	claudin 11	-1,12	4,13E-04
Gpr160	G protein-coupled receptor 160	-1,02	1,84E-04
Tecta	tectorin alpha	-1,23	8,92E-09
Dnah10	dynein, axonemal, heavy chain 10	-1,22	1,78E-08
Dlec1	deleted in lung and esophageal cancer 1	-1,09	4,24E-14
Asb10	ankyrin repeat and SOCS box-containing 10	-1,05	6,05E-03
Gdf5	growth differentiation factor 5	-1,12	6,65E-03
Tmc3	transmembrane channel-like gene family 3	-1,05	3,48E-03
Susd4	sushi domain containing 4	-1,07	1,75E-20
Atp6v0a4	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A4	-1,33	9,34E-11
Anpep	alanyl (membrane) aminopeptidase	-1,13	9,67E-11
En2	engrailed 2	-1,75	8,27E-05
Snx22	sorting nexin 22	-1,26	1,95E-06
Sdk1	sidekick cell adhesion molecule 1	-1,07	1,17E-12
Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	-1,35	1,33E-06
Trim14	tripartite motif-containing 14	-1,04	9,79E-03
Pak7	p21 (RAC1) activated kinase 7	-1,29	8,00E-03
Deup1	deuterosome assembly protein 1	-1,09	1,81E-07
Gjb6	gap junction protein, beta 6	-1,79	1,27E-10

Fmo1	flavin containing monooxygenase 1	-1,03	3,59E-05
Gpr34	G protein-coupled receptor 34	-1,19	9,13E-11
Sema3d	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	-1,18	2,29E-12
Lrfrn2	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 2	-1,32	2,01E-09
Tlr8	toll-like receptor 8	-1,21	9,30E-03
Slc26a7	solute carrier family 26, member 7	-2,09	3,46E-07
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	-1,14	2,83E-05
Cyp2s1	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1	-1,16	1,46E-10
Slc22a2	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	-1,69	7,12E-05
Igsf21	immunoglobulin superfamily, member 21	-2,22	1,39E-11
Map6d1	MAP6 domain containing 1	-1,03	1,61E-03
Lamp3	lysosomal-associated membrane protein 3	-1,67	1,30E-03
Piezo2	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2	-1,12	1,14E-11
Entpd3	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	-1,33	4,74E-03
Lhfp1	lipoma HMGIC fusion partner-like 1	-1,50	8,90E-07
Foxn4	forkhead box N4	-1,32	1,68E-03
Tnfrsf14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	-1,57	3,54E-06
Dlgap3	DLG associated protein 3	-1,44	1,78E-04
Crtac1	cartilage acidic protein 1	-1,23	6,53E-10
Jph1	junctophilin 1	-1,06	1,80E-03
Lrrtm3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3	-1,49	1,32E-07
Egflam	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains	-1,75	2,78E-22
Kcnj6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6	-3,25	4,83E-17
Gpr149	G protein-coupled receptor 149	-1,77	1,30E-03
Elfn2	leucine rich repeat and fibronectin type III, extracellular 2	-1,67	3,23E-06
Sptssb	serine palmitoyltransferase, small subunit B	-1,55	3,93E-05
Mgat5b	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B	-1,15	1,14E-05
Tafa2	TAFA chemokine like family member 2	-1,26	1,94E-07
Zfp488	zinc finger protein 488	-2,34	1,03E-07
Syt16	synaptotagmin XVI	-1,24	6,57E-04
Asxl3	additional sex combs like 3, transcriptional regulator	-1,14	2,83E-05
Fam216b	family with sequence similarity 216, member B	-1,05	2,41E-10
B3gat1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P)	-1,19	3,89E-18
Chrm3	cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac	-1,58	7,20E-06
Nxph1	neurexophilin 1	-1,83	2,81E-26
Gjb2	gap junction protein, beta 2	-1,87	2,49E-10
Vwa5b2	von Willebrand factor A domain containing 5B2	-1,51	3,93E-05
Olfml2a	olfactomedin-like 2A	-1,25	7,38E-15
Cfap65	cilia and flagella associated protein 65	-1,52	4,54E-16
Pcdhb13	protocadherin beta 13	-1,24	5,42E-04
Kcne4	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	-1,18	2,32E-04

Fam180a	family with sequence similarity 180, member A	-1,51	2,05E-14
Adamts12	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 12	-1,29	2,75E-11
Baiap3	BAI1-associated protein 3	-1,40	1,98E-04
Rtl3	retrotransposon Gag like 3	-1,73	7,37E-05
Ust	uronyl-2-sulfotransferase	-1,07	7,72E-14
A4galt	alpha 1,4-galactosyltransferase	-1,19	1,46E-10
Dipk1c	divergent protein kinase domain 1C	-1,18	1,62E-05
Ccdc187	coiled-coil domain containing 187	-1,27	3,35E-06
Slitrk3	SLIT and NTRK-like family, member 3	-2,21	6,69E-20
Ranbp3l	RAN binding protein 3-like	-1,69	1,19E-09
Zdhhc22	zinc finger, DHHC-type containing 22	-3,14	1,18E-24
Igf2	insulin-like growth factor 2	-1,69	6,53E-10
Ccdc125	coiled-coil domain containing 125	-1,29	2,63E-07
Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	-1,08	8,06E-03
Hcar1	hydrocarboxylic acid receptor 1	-1,72	1,11E-05
Adamts16	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 16	-1,80	1,14E-19
Grm5	glutamate receptor, metabotropic 5	-1,47	2,69E-19
Omg	oligodendrocyte myelin glycoprotein	-1,77	8,89E-17
Dscam	DS cell adhesion molecule	-2,65	1,51E-35
Neto1	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	-2,15	1,36E-17
Vwc2	von Willebrand factor C domain containing 2	-1,39	5,79E-04
Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	-1,69	1,20E-06
Gfod1	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1	-1,18	1,07E-06
Usp29	ubiquitin specific peptidase 29	-1,26	1,79E-03
Rspo2	R-spondin 2	-1,37	1,03E-12
Serpinb6c	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6c	-1,11	9,17E-04
Gpr17	G protein-coupled receptor 17	-2,10	2,34E-16
Dnah3	dynein, axonemal, heavy chain 3	-1,38	5,67E-04
Lrrtm4	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4	-1,35	6,72E-06
Pcdh15	protocadherin 15	-1,75	6,02E-07
Dnah6	dynein, axonemal, heavy chain 6	-1,24	2,72E-12
Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	-1,66	3,45E-03
Shisa7	shisa family member 7	-2,37	8,40E-20
Mast1	microtubule associated serine/threonine kinase 1	-1,84	1,15E-07
Krt15	keratin 15	-1,10	8,41E-03
Irs4	insulin receptor substrate 4	-1,19	2,60E-03
Nt5c1a	5'-nucleotidase, cytosolic 1A	-1,15	7,36E-03
Wdr86	WD repeat domain 86	-1,15	3,40E-05
Fat2	FAT atypical cadherin 2	-3,65	5,63E-26
Alk	anaplastic lymphoma kinase	-1,38	2,94E-06
Gjc3	gap junction protein, gamma 3	-1,20	6,34E-08
Scn3a	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	-1,08	2,47E-03
Sez6l	seizure related 6 homolog like	-1,88	9,35E-24
Col25a1	collagen, type XXV, alpha 1	-1,97	1,46E-05
Hydin	HYDIN, axonemal central pair apparatus protein	-1,27	5,87E-06

Pcnx2	pecanex homolog 2	-1,60	8,22E-04
Caln1	calneuron 1	-1,30	1,94E-04
Dcc	deleted in colorectal carcinoma	-1,43	5,54E-06
Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	-1,05	2,65E-12
Cdh3	cadherin 3	-1,17	3,18E-08
C1qtnf7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	-1,04	1,26E-05
Dpp6	dipeptidylpeptidase 6	-1,65	2,75E-26
Serpina10	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 10	-1,33	1,07E-05
Kcnj15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	-1,15	3,46E-03
Kcnma1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	-1,02	1,69E-04
Lrrc43	leucine rich repeat containing 43	-1,07	1,21E-05
Sorcs3	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3	-2,80	2,36E-12
Plppr1	phospholipid phosphatase related 1	-1,66	7,59E-07
Col23a1	collagen, type XXIII, alpha 1	-1,71	1,51E-22
Slc22a8	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	-1,86	6,28E-15
Slc24a3	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3	-1,10	1,44E-15
Cntn4	contactin 4	-1,68	6,32E-04
Scn1a	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	-1,50	8,76E-04
Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16	-1,18	1,49E-03
Hmcn1	hemacentin 1	-1,89	5,69E-11
Lpar5	lysophosphatidic acid receptor 5	-1,31	6,49E-05
Pi15	peptidase inhibitor 15	-1,68	7,82E-09
Vxn	vexin	-1,07	6,88E-17
Sptbn2	spectrin beta, non-erythrocytic 2	-1,61	6,25E-07
Cst7	cystatin F (leukocystatin)	-1,01	9,15E-04
Slc7a14	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 14	-1,07	3,91E-05
Plpp4	phospholipid phosphatase 4	-1,16	4,77E-08
Ptgdr	prostaglandin D receptor	-1,46	4,54E-12
Snx29	sorting nexin 29	-1,40	3,69E-03
Apcdd1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	-1,42	4,24E-36
Lrrtm2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	-1,50	5,30E-09
Mansc4	MANSC domain containing 4	-1,60	8,74E-05
Cyp4f15	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15	-1,22	8,10E-05
Ceacam1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	-1,20	6,82E-03
Mcidas	multiciliate differentiation and DNA synthesis associated cell cycle protein	-1,11	1,14E-04
Thbd	thrombomodulin	-1,54	5,77E-27
Tgtp2	T cell specific GTPase 2	-1,26	6,36E-05
Cdc20b	cell division cycle 20B	-1,82	1,24E-08
Slc8a3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3	-1,39	3,97E-13

Fam155a	family with sequence similarity 155, member A	-1,23	6,98E-07
Gm20661	predicted gene 20661	-1,55	1,73E-03
Gbp4	guanylate binding protein 4	-1,39	2,73E-08
Nhsl2	NHS-like 2	-1,04	9,50E-10
Crocc2	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin family member 2	-1,73	8,62E-16
Rtl10	retrotransposon Gag like 10	-1,27	4,52E-04
Mroh3	maestro heat-like repeat family member 3	-1,35	8,54E-04
Col6a5	collagen, type VI, alpha 5	-1,67	5,88E-04
Ldlrad2	low density lipoprotein receptor class A domain containing 2	-1,47	6,20E-03
D430019H16Rik	RIKEN cDNA D430019H16 gene	-1,02	7,11E-11
Ms4a4a	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	-1,66	2,57E-07
Pcdhga10	protocadherin gamma subfamily A, 10	-1,17	2,65E-03
Pcdha12	protocadherin alpha 12	-1,31	2,81E-03
Lhfpl3	lipoma HMGIC fusion partner-like 3	-1,22	1,14E-19
Frmpd2	FERM and PDZ domain containing 2	-1,16	7,82E-09

En vert les gènes surexprimés et en rouge les gènes sous-exprimés

Annexe 4 : Gènes communs modulés à 7 et 10 jours après une exposition GSM 900 MHz à 2,155 W/kg pendant 7 jours

Gene Symbol	Definition	Log2 FC 7 days	Adjusted p-value 7 days	Log2 FC 10 days	Adjusted p-value 10 days
Ckmt1	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	1,164	2,29E-14	1,038	5,52E-10
Eef1a2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	1,134	6,73E-15	1,351	1,37E-20
Scgn	secretagogin, EF-hand calcium binding protein	1,129	7,16E-04	1,412	1,39E-05
Dhh	desert hedgehog	1,214	1,30E-11	1,267	3,72E-11
Gpr39	G protein-coupled receptor 39	1,140	6,81E-09	1,261	2,39E-09
Lcn2	lipocalin 2	1,571	3,34E-21	1,223	2,50E-14
AA467197	expressed sequence AA467197	1,250	3,06E-04	1,469	6,57E-06
Cyp24a1	cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide 1	1,859	2,26E-13	1,673	1,18E-10
Klhdc8a	kelch domain containing 8A	1,065	1,26E-17	1,158	1,76E-20
Mmp3	matrix metalloproteinase 3	1,311	6,54E-09	1,089	1,92E-06
Fam178b	family with sequence similarity 178, member B	1,956	8,87E-17	1,047	3,24E-04
Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	1,024	3,17E-08	1,014	6,98E-07
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	1,083	6,13E-21	1,194	6,16E-25
Klk13	kallikrein related-peptidase 13	1,296	2,17E-03	1,844	1,19E-05
Apol9a	apolipoprotein L 9a	1,220	1,35E-04	1,196	2,01E-04
Glyat	glycine-N-acyltransferase	1,178	5,24E-05	1,137	5,16E-05
Klk8	kallikrein related-peptidase 8	1,134	5,51E-11	1,284	1,78E-12
Rps23rg1	ribosomal protein S23, retrogene 1	1,406	3,36E-04	1,321	6,00E-03
Prl2c2	prolactin family 2, subfamily c, member 2	1,993	1,09E-06	3,282	1,40E-13
Cdh1	cadherin 1	-2,57	8,98E-10	-2,52	4,08E-09
Vwf	Von Willebrand factor	-1,85	3,40E-15	-1,81	1,36E-13
Efnb3	ephrin B3	-1,15	5,23E-23	-1,00	3,60E-17
Aqp1	aquaporin 1	-1,06	1,28E-12	-1,04	7,92E-12
Kit	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	-1,93	4,79E-26	-1,84	9,41E-23
Prg4	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)	-2,67	6,93E-09	-2,01	3,27E-05
Mc5r	melanocortin 5 receptor	-1,72	1,85E-08	-1,88	1,15E-09
Ttc9b	tetratricopeptide repeat domain 9B	-1,22	1,82E-03	-1,43	1,94E-04
Bmp7	bone morphogenetic protein 7	-1,17	1,78E-12	-1,17	2,39E-12
Myt1	myelin transcription factor 1	-3,34	1,26E-40	-3,84	7,24E-37
Card14	caspase recruitment domain family, member 14	-2,50	9,31E-13	-2,04	5,44E-09

Bcas1	breast carcinoma amplified sequence 1	-1,49	1,87E-16	-1,76	9,35E-24
Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2	-1,30	5,16E-04	-1,75	8,53E-05
Scube1	signal peptide, CUB domain, EGF-like 1	-1,72	1,04E-14	-1,50	7,11E-11
Vtn	vitronectin	-1,81	1,53E-09	-1,99	1,70E-11
Aoc3	amine oxidase, copper containing 3	-2,85	2,87E-13	-2,48	5,26E-10
Dcn	decorin	-1,08	1,93E-03	-1,24	3,84E-04
Mrln	myoregulin	-1,34	1,07E-03	-1,24	2,23E-03
Asgr1	asialoglycoprotein receptor 1	-1,64	1,34E-05	-1,27	1,09E-03
Rab3c	RAB3C, member RAS oncogene family	-2,38	4,11E-15	-3,06	1,52E-15
Gdf10	growth differentiation factor 10	-1,78	1,98E-07	-1,12	2,64E-03
Stmn4	stathmin-like 4	-1,39	2,71E-15	-1,22	3,57E-11
Ebf2	early B cell factor 2	-1,28	8,95E-05	-1,35	8,57E-04
Serpind1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade D, member 1	-1,63	1,07E-11	-1,54	3,50E-10
Mylk	myosin, light polypeptide kinase	-1,70	1,00E-19	-1,46	1,64E-13
Cxadr	coxsackie virus and adenovirus receptor	-1,62	3,98E-20	-1,39	1,66E-14
Bmp15	bone morphogenetic protein 15	-1,68	4,45E-06	-1,63	5,56E-05
Slc22a3	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3	-2,25	8,99E-06	-1,54	5,45E-03
Smoc2	SPARC related modular calcium binding 2	-1,17	7,59E-05	-1,89	2,86E-11
St6gal2	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 2	-2,13	5,18E-23	-2,23	2,07E-13
Svil	supervillin	-1,13	2,04E-09	-1,21	2,41E-10
Fbn2	fibrillin 2	-2,00	1,68E-34	-1,30	1,32E-13
Slc22a6	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	-1,54	3,27E-03	-2,03	6,11E-05
Slc1a1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	-1,98	1,14E-64	-1,94	5,92E-53
Zfp711	zinc finger protein 711	-1,17	1,19E-05	-1,51	9,32E-07
Myo5b	myosin VB	-1,45	2,09E-10	-1,29	1,31E-07
Sntg1	syntrophin, gamma 1	-1,90	1,19E-07	-1,74	4,44E-05
Mrc1	mannose receptor, C type 1	-2,45	1,09E-39	-1,67	6,69E-20
Gbgt1	globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-1,39	2,21E-06	-2,46	1,96E-14
Lamc3	laminin gamma 3	-1,72	2,81E-09	-1,12	1,36E-03
Slc4a10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter-like, member 10	-2,05	1,88E-07	-1,89	3,46E-06
Snap25	synaptosomal-associated protein 25	-1,13	1,24E-03	-1,60	3,11E-05
Pcsk2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	-1,10	4,17E-06	-1,11	1,18E-05
Phactr3	phosphatase and actin regulator 3	-1,69	2,99E-12	-1,62	1,38E-10

Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4	-1,15	3,40E-14	-1,26	5,53E-15
Oprl1	opioid receptor-like 1	-1,29	6,26E-09	-1,65	1,72E-11
Mmp24	matrix metalloproteinase 24	-1,43	1,24E-12	-1,01	2,61E-07
Bche	butyrylcholinesterase	-1,54	2,56E-16	-1,12	1,93E-07
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	-1,54	9,06E-17	-1,90	9,35E-24
Celf3	CUGBP, Elav-like family member 3	-1,00	1,11E-04	-1,15	7,99E-06
Bnc2	basonuclin 2	-1,33	3,34E-09	-1,30	9,88E-08
Elavl4	ELAV like RNA binding protein 4	-1,37	7,41E-07	-1,50	1,47E-06
Dmrtb1	DMRT-like family B with proline-rich C-terminal, 1	-1,37	6,77E-11	-1,21	5,70E-09
Ptch2	patched 2	-1,62	5,05E-22	-1,03	1,56E-11
Stk32b	serine/threonine kinase 32B	-1,95	2,08E-29	-1,76	8,91E-21
Ln timer	ligand of numb-protein X 1	-1,19	8,29E-07	-1,48	1,47E-09
Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	-2,32	2,95E-38	-2,46	1,99E-41
Tfec	transcription factor EC	-1,28	7,55E-04	-1,18	1,14E-03
Wnt16	wingless-type MMTV integration site family, member 16	-2,07	1,89E-15	-2,45	9,29E-14
Eln	elastin	-1,51	5,96E-06	-1,73	2,14E-07
Slc13a4	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4	-1,07	1,19E-11	-1,74	7,93E-28
Add2	adducin 2 (beta)	-1,14	2,81E-09	-1,55	6,02E-15
Slc6a13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	-1,87	2,61E-06	-1,51	1,69E-04
Pianp	PILR alpha associated neural protein family with sequence similarity 189, member A1	-1,10	1,96E-05	-1,20	6,65E-07
Fam189a1		-1,64	3,60E-09	-1,39	3,80E-06
Acan	aggrecan	-2,22	1,11E-12	-2,27	6,07E-09
Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase	-1,69	9,62E-04	-1,81	1,66E-04
Abcc6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	-1,53	1,77E-08	-1,13	4,01E-05
Dcx	doublecortin	-1,88	1,55E-15	-2,06	3,90E-11
Il13ra2	interleukin 13 receptor, alpha 2	-1,44	3,82E-03	-1,68	1,01E-03
Cbln1	cerebellin 1 precursor protein	-1,97	8,20E-05	-2,21	9,03E-06
Plip	plasma membrane proteolipid	-1,44	4,90E-14	-1,08	9,46E-09
Cdh5	cadherin 5	-1,34	4,42E-18	-1,14	9,67E-13
Dscaml1	DS cell adhesion molecule like 1	-2,32	1,42E-17	-2,25	1,16E-15
Bmp5	bone morphogenetic protein 5	-1,61	1,44E-11	-1,21	3,49E-06
Thsd4	thrombospondin, type I, domain containing 4	-2,32	3,49E-37	-2,50	7,83E-42
Bsn	bassoon	-1,58	9,06E-17	-1,10	1,59E-07
Lama1	laminin, alpha 1	-2,74	1,64E-49	-1,75	1,97E-19
Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	-1,72	3,76E-18	-1,94	5,41E-16

Afap1l1	actin filament associated protein 1-like 1	-1,12	2,01E-08	-1,38	1,86E-12
Adamts15	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 15	-1,47	1,20E-16	-1,52	4,83E-17
Prss35	protease, serine 35	-1,48	1,56E-21	-1,04	1,11E-09
Rbm46	RNA binding motif protein 46	-1,27	1,26E-03	-1,42	1,61E-03
Fstl5	folliculin-like 5	-1,64	1,73E-10	-1,46	2,27E-06
Rnf43	ring finger protein 43	-1,29	2,62E-10	-1,04	4,75E-06
Tmem132d	transmembrane protein 132D	-1,77	1,68E-06	-1,80	1,36E-06
Tmem132c	transmembrane protein 132C	-1,91	8,28E-17	-1,41	1,11E-09
Ina	interneuron neuronal intermediate filament protein, alpha	-1,48	9,10E-09	-1,39	3,98E-07
Gbp8	guanylate-binding protein 8	-1,58	1,69E-07	-1,59	3,79E-08
Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	-2,03	1,46E-14	-1,70	2,38E-09
Wnk4	WNK lysine deficient protein kinase 4	-1,39	2,01E-11	-1,17	2,64E-08
Brinp3	bone morphogenetic protein/retnoic acid inducible neural specific 3	-1,18	8,63E-06	-1,23	1,19E-05
Rims4	regulating synaptic membrane exocytosis 4	-1,85	4,56E-07	-2,80	8,32E-14
P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	-1,08	5,01E-12	-1,11	3,11E-14
Npy1r	neuropeptide Y receptor Y1	-1,38	1,38E-14	-1,55	3,99E-17
Cpz	carboxypeptidase Z	-1,62	5,51E-17	-1,02	5,85E-07
Slc6a20a	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20A	-1,69	6,43E-05	-1,99	1,44E-06
Dpp10	dipeptidylpeptidase 10	-1,87	2,86E-09	-1,79	4,93E-07
Zic4	zinc finger protein of the cerebellum 4	-1,34	3,38E-23	-1,20	1,45E-17
Xpnpep2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	-2,65	2,01E-18	-1,24	2,46E-04
Sstr4	somatostatin receptor 4	-2,70	3,78E-13	-1,99	2,03E-05
Il22ra1	interleukin 22 receptor, alpha 1	-2,23	3,30E-09	-2,51	2,22E-09
Itih2	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	-1,54	7,60E-11	-1,14	5,12E-06
Cldn11	claudin 11	-1,62	3,61E-08	-1,12	4,13E-04
Tecta	tectorin alpha	-1,21	1,94E-09	-1,23	8,92E-09
Gdf5	growth differentiation factor 5	-1,47	3,03E-04	-1,12	6,65E-03
Tmc3	transmembrane channel-like gene family 3	-1,13	3,72E-04	-1,05	3,48E-03
Susd4	sushi domain containing 4	-1,22	1,13E-25	-1,07	1,75E-20
Atp6v0a4	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A4	-1,34	4,05E-13	-1,33	9,34E-11
En2	engrailed 2	-1,48	7,83E-04	-1,75	8,27E-05
Snx22	sorting nexin 22	-1,78	6,02E-10	-1,26	1,95E-06
Sdk1	sidekick cell adhesion molecule 1	-1,00	8,99E-12	-1,07	1,17E-12

Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	-1,37	1,02E-08	-1,35	1,33E-06
Pak7	p21 (RAC1) activated kinase 7	-1,51	1,31E-04	-1,29	8,00E-03
Deup1	deuterosome assembly protein 1	-1,01	1,58E-06	-1,09	1,81E-07
Gjb6	gap junction protein, beta 6	-1,07	2,21E-04	-1,79	1,27E-10
Gpr34	G protein-coupled receptor 34	-1,21	8,67E-11	-1,19	9,13E-11
Sema3d	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	-1,24	3,27E-15	-1,18	2,29E-12
Lrfrn2	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 2	-1,85	2,00E-15	-1,32	2,01E-09
Slc26a7	solute carrier family 26, member 7	-2,49	4,66E-12	-2,09	3,46E-07
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	-1,41	1,11E-08	-1,14	2,83E-05
Cyp2s1	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1	-1,39	9,06E-17	-1,16	1,46E-10
Slc22a2	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	-1,39	4,24E-04	-1,69	7,12E-05
Igscf21	immunoglobulin superfamily, member 21	-2,21	6,26E-12	-2,22	1,39E-11
Lamp3	lysosomal-associated membrane protein 3	-1,94	4,42E-05	-1,67	1,30E-03
Piezo2	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2	-1,64	1,93E-26	-1,12	1,14E-11
Dlgap3	DLG associated protein 3	-1,38	3,15E-04	-1,44	1,78E-04
Crtac1	cartilage acidic protein 1	-1,84	1,48E-22	-1,23	6,53E-10
Lrrtm3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3	-1,34	6,41E-07	-1,49	1,32E-07
Egflam	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains	-1,79	1,14E-23	-1,75	2,78E-22
Kcnj6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6	-2,51	2,19E-17	-3,25	4,83E-17
Elfn2	leucine rich repeat and fibronectin type III, extracellular 2	-1,61	6,80E-06	-1,67	3,23E-06
Sptssb	serine palmitoyltransferase, small subunit B	-2,54	5,92E-13	-1,55	3,93E-05
Mgat5b	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B	-1,23	9,11E-06	-1,15	1,14E-05
Tafa2	TAFA chemokine like family member 2	-1,54	3,64E-12	-1,26	1,94E-07
Zfp488	zinc finger protein 488	-2,13	7,32E-08	-2,34	1,03E-07
Syt16	synaptotagmin XVI	-1,43	3,60E-05	-1,24	6,57E-04
Nxph1	neurexophilin 1	-1,75	6,25E-27	-1,83	2,81E-26
Vwa5b2	von Willebrand factor A domain containing 5B2	-1,30	7,11E-04	-1,51	3,93E-05
Olfml2a	olfactomedin-like 2A	-1,26	2,70E-16	-1,25	7,38E-15
Kcne4	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	-1,29	2,16E-05	-1,18	2,32E-04

Adamts12	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 12	-1,68	6,71E-21	-1,29	2,75E-11
Rtl3	retrotransposon Gag like 3	-1,89	1,48E-06	-1,73	7,37E-05
A4galt	alpha 1,4-galactosyltransferase	-1,00	9,01E-08	-1,19	1,46E-10
Dipk1c	divergent protein kinase domain 1C	-1,35	4,97E-07	-1,18	1,62E-05
Ccdc187	coiled-coil domain containing 187	-1,01	2,02E-04	-1,27	3,35E-06
Slitrk3	SLIT and NTRK-like family, member 3	-1,75	5,34E-18	-2,21	6,69E-20
Ranbp3l	RAN binding protein 3-like	-2,21	1,82E-16	-1,69	1,19E-09
Zdhhc22	zinc finger, DHHC-type containing 22	-2,63	2,22E-19	-3,14	1,18E-24
Igf2	insulin-like growth factor 2	-1,55	7,56E-09	-1,69	6,53E-10
Ccdc125	coiled-coil domain containing 125	-1,16	3,53E-06	-1,29	2,63E-07
Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	-1,34	2,54E-05	-1,08	8,06E-03
Hcar1	hydrocarboxylic acid receptor 1	-1,79	2,59E-06	-1,72	1,11E-05
Adamts16	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 16	-2,22	1,18E-36	-1,80	1,14E-19
Grm5	glutamate receptor, metabotropic 5	-1,37	1,88E-28	-1,47	2,69E-19
Omg	oligodendrocyte myelin glycoprotein	-1,62	4,07E-16	-1,77	8,89E-17
Dscam	DS cell adhesion molecule	-2,47	1,53E-35	-2,65	1,51E-35
Neto1	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	-2,14	3,43E-23	-2,15	1,36E-17
Vwc2	von Willebrand factor C domain containing 2	-1,64	1,70E-05	-1,39	5,79E-04
Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	-2,08	9,41E-12	-1,69	1,20E-06
Usp29	ubiquitin specific peptidase 29	-1,10	2,50E-03	-1,26	1,79E-03
Serpinb6c	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6c	-1,18	5,83E-04	-1,11	9,17E-04
Lrrtm4	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4	-1,63	1,50E-11	-1,35	6,72E-06
Pcdh15	protocadherin 15	-1,98	2,75E-12	-1,75	6,02E-07
Shisa7	shisa family member 7	-3,15	1,59E-31	-2,37	8,40E-20
Mast1	microtubule associated serine/threonine kinase 1	-1,84	1,26E-07	-1,84	1,15E-07
Irs4	insulin receptor substrate 4	-1,34	1,56E-05	-1,19	2,60E-03
Nt5c1a	5'-nucleotidase, cytosolic IA	-1,69	2,51E-06	-1,15	7,36E-03
Wdr86	WD repeat domain 86	-2,36	2,88E-15	-1,15	3,40E-05
Fat2	FAT atypical cadherin 2	-3,05	1,34E-23	-3,65	5,63E-26
Alk	anaplastic lymphoma kinase	-1,08	1,03E-04	-1,38	2,94E-06
Gjc3	gap junction protein, gamma 3	-1,27	2,63E-09	-1,20	6,34E-08
Scn3a	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	-1,88	1,98E-14	-1,08	2,47E-03
Sez6l	seizure related 6 homolog like	-2,21	6,61E-34	-1,88	9,35E-24
Col25a1	collagen, type XXV, alpha 1	-2,54	3,31E-11	-1,97	1,46E-05
Pcnx2	pecanex homolog 2	-1,61	1,98E-04	-1,60	8,22E-04
Caln1	calneuron 1	-1,78	1,36E-10	-1,30	1,94E-04

Dcc	deleted in colorectal carcinoma	-2,03	1,00E-17	-1,43	5,54E-06
Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	-1,48	1,35E-29	-1,05	2,65E-12
Cdh3	cadherin 3	-1,38	2,19E-14	-1,17	3,18E-08
C1qtnf7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	-1,01	1,16E-05	-1,04	1,26E-05
Dpp6	dipeptidylpeptidase 6 serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 10	-1,57	1,61E-25	-1,65	2,75E-26
Serpina10		-1,15	3,26E-05	-1,33	1,07E-05
Lrrc43	leucine rich repeat containing 43 sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3	-1,32	1,89E-07	-1,07	1,21E-05
Sorcs3		-2,80	5,20E-15	-2,80	2,36E-12
Col23a1	collagen, type XXIII, alpha 1	-1,91	6,33E-29	-1,71	1,51E-22
Slc22a8	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	-1,60	7,12E-11	-1,86	6,28E-15
Cntn4	contactin 4	-1,70	6,05E-05	-1,68	6,32E-04
Scn1a	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	-1,42	1,85E-04	-1,50	8,76E-04
Hmcn1	hemicentin 1	-2,22	6,30E-22	-1,89	5,69E-11
Pi15	peptidase inhibitor 15	-1,79	6,33E-11	-1,68	7,82E-09
Sptbn2	spectrin beta, non-erythrocytic 2	-1,82	1,39E-08	-1,61	6,25E-07
Slc7a14	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 14	-1,35	5,51E-11	-1,07	3,91E-05
Plpp4	phospholipid phosphatase 4	-1,48	2,44E-11	-1,16	4,77E-08
Ptgdr	prostaglandin D receptor	-1,29	9,31E-10	-1,46	4,54E-12
Apcdd1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	-1,47	1,09E-39	-1,42	4,24E-36
Lrrtm2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	-1,21	2,04E-09	-1,50	5,30E-09
Cyp4f15	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15	-1,57	4,30E-07	-1,22	8,10E-05
Mcidas	multiciliate differentiation and DNA synthesis associated cell cycle protein	-1,32	1,49E-05	-1,11	1,14E-04
Thbd	thrombomodulin	-1,24	2,44E-18	-1,54	5,77E-27
Cdc20b	cell division cycle 20B	-1,59	2,75E-07	-1,82	1,24E-08
Slc8a3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3	-1,58	1,67E-19	-1,39	3,97E-13
Fam155a	family with sequence similarity 155, member A	-1,60	2,63E-10	-1,23	6,98E-07
Nhs12	NHS-like 2	-1,46	3,24E-20	-1,04	9,50E-10
Mroh3	maestro heat-like repeat family member 3	-1,13	4,35E-03	-1,35	8,54E-04
Lhfp13	lipoma HMGIC fusion partner-like 3	-1,64	2,20E-36	-1,22	1,14E-19

En vert les gènes surexprimés et en rouge les gènes sous-exprimés

Références Bibliographiques

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease* 37, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Abe, K., Takeichi, M., 2007. NMDA-Receptor Activation Induces Calpain-Mediated β -Catenin Cleavages for Triggering Gene Expression. *Neuron* 53, 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.016>
- Achanta, P., Capilla-Gonzalez, V., Purger, D., Reyes, J., Sailor, K., Song, H., Garcia-Verdugo, J.M., Gonzalez-Perez, O., Ford, E., Quinones-Hinojosa, A., 2012. Subventricular Zone Localized Irradiation Affects the Generation of Proliferating Neural Precursor Cells and the Migration of Neuroblasts. *STEM CELLS* 30, 2548–2560. <https://doi.org/10.1002/stem.1214>
- Ackroyd, M.R., Whitmore, C., Prior, S., Kaluarachchi, M., Nikolic, M., Mayer, U., Muntoni, F., Brown, S.C., 2011. Fukutin-Related Protein Alters the Deposition of Laminin in the Eye and Brain. *Journal of Neuroscience* 31, 12927–12935. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2301-11.2011>
- Afsset, 2009. Les radiofréquences: Mise à jour de l'expertise relative aux radiofréquences.
- Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W.A., Perron, M., 2007. A General Role of Hedgehog in the Regulation of Proliferation. *Cell Cycle* 6, 156–159. <https://doi.org/10.4161/cc.6.2.3745>
- Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O., Kokaia, Z., 2009. Neural Stem and Progenitor Cells Retain Their Potential for Proliferation and Differentiation into Functional Neurons Despite Lower Number in Aged Brain. *Journal of Neuroscience* 29, 4408–4419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6003-08.2009>
- Aït-Aïssa, S., Billaudel, B., De Gannes, F.P., Hurtier, A., Haro, E., Taxile, M., Ruffie, G., Athane, A., Veyret, B., Lagroye, I., 2010. In situ detection of gliosis and apoptosis in the brains of young rats exposed in utero to a Wi-Fi signal. *Comptes Rendus Physique* 11, 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2010.10.005>
- Aldad, T.S., Gan, G., Gao, X.-B., Taylor, H.S., 2012. Fetal Radiofrequency Radiation Exposure From 800-1900 Mhz-Rated Cellular Telephones Affects Neurodevelopment and Behavior in Mice. *Sci Rep* 2, 312. <https://doi.org/10.1038/srep00312>
- Alkuraya, F.S., Cai, X., Emery, C., Mochida, G.H., Al-Dosari, M.S., Felie, J.M., Hill, R.S., Barry, B.J., Partlow, J.N., Gascon, G.G., Kentab, A., Jan, M., Shaheen, R., Feng, Y., Walsh, C.A., 2011. Human Mutations in NDE1 Cause Extreme Microcephaly with Lissencephaly. *The American Journal of Human Genetics* 88, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.003>
- Altman, J., 1969a. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433–457. <https://doi.org/10.1002/cne.901370404>

- Altman, J., 1969b. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J. Comp. Neurol.* 136, 269–293. <https://doi.org/10.1002/cne.901360303>
- Altman, J., 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* 145, 573–591. <https://doi.org/10.1002/ar.1091450409>
- Altman, J., Bayer, S.A., 1990. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* 301, 325–342. <https://doi.org/10.1002/cne.903010302>
- Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D., 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2, 287–293. <https://doi.org/10.1038/35067582>
- Alvarez-Buylla, A., Seri, B., Doetsch, F., 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Research Bulletin* 57, 751–758. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00770-5](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00770-5)
- Ammari, M., Gamez, C., Lecomte, A., Sakly, M., Abdelmelek, H., De Seze, R., 2010. GFAP expression in the rat brain following sub-chronic exposure to a 900 MHz electromagnetic field signal. *International Journal of Radiation Biology* 86, 367–375. <https://doi.org/10.3109/09553000903567946>
- Anderson, V., 2003. Comparisons of peak SAR levels in concentric sphere head models of children and adults for irradiation by a dipole at 900 MHz. *Phys. Med. Biol.* 48, 3263–3275. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/48/20/001>
- Arendash, G.W., Sanchez-Ramos, J., Mori, T., Mamcarz, M., Lin, X., Runfeldt, M., Wang, L., Zhang, G., Sava, V., Tan, J., Cao, C., 2010. Electromagnetic Field Treatment Protects Against and Reverses Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease Mice. *JAD* 19, 191–210. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1228>
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O., 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963–970. <https://doi.org/10.1038/nm747>
- Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V., LoTurco, J.J., 2003. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 6, 1277–1283. <https://doi.org/10.1038/nn1153>
- Bas, Orhan, Odaci, E., Kaplan, S., Acer, N., Ucok, K., Colakoglu, S., 2009. 900 MHz electromagnetic field exposure affects qualitative and quantitative features of hippocampal pyramidal cells in the adult female rat. *Brain Research* 1265, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.011>

- Bas, O, Odaci, E., Mollaoglu, H., Ucok, K., Kaplan, S., 2009. Chronic prenatal exposure to the 900 megahertz electromagnetic field induces pyramidal cell loss in the hippocampus of newborn rats. *Toxicol Ind Health* 25, 377–384. <https://doi.org/10.1177/0748233709106442>
- Bath, K.G., Lee, F.S., 2010. Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Devel Neurobio* NA-NA. <https://doi.org/10.1002/dneu.20781>
- Baumbach, J., Murthy, A., McClintock, M.A., Dix, C.I., Zalyte, R., Hoang, H.T., Bullock, S.L., 2017. Lissencephaly-1 is a context-dependent regulator of the human dynein complex. *eLife* 6, e21768. <https://doi.org/10.7554/eLife.21768>
- Beard, B.B., Kainz, W., Onishi, T., Iyama, T., Watanabe, S., Fujiwara, O., Wang, J., Bit-Babik, G., Faraone, A., Wiart, J., Christ, A., Kuster, N., Lee, A.-K., Kroeze, H., Siegbahn, M., Keshvari, J., Abrishamkar, H., Simon, W., Manteuffel, D., Nikoloski, N., 2006. Comparisons of Computed Mobile Phone Induced SAR in the SAM Phantom to That in Anatomically Correct Models of the Human Head. *IEEE Trans. Electromagn. Compat.* 48, 397–407. <https://doi.org/10.1109/TEM.2006.873870>
- Ben Abdallah, N.M.-B., Slomianka, L., Vyssotski, A.L., Lipp, H.-P., 2010. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiology of Aging* 31, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.002>
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Bit-Babik, G., Guy, A.W., Chou, C.-K., Faraone, A., Kanda, M., Gessner, A., Wang, J., Fujiwara, O., 2005. Simulation of Exposure and SAR Estimation for Adult and Child Heads Exposed to Radiofrequency Energy from Portable Communication Devices. *Radiation Research* 163, 580–590. <https://doi.org/10.1667/RR3353>
- Bond, A.M., Bhalala, O.G., Kessler, J.A., 2012. The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Devel Neurobio* 72, 1068–1084. <https://doi.org/10.1002/dneu.22022>
- Bouab, M., Paliouras, G.N., Aumont, A., Forest-Bérard, K., Fernandes, K.J.L., 2011. Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.032>
- Bouji, M., Lecomte, A., Hode, Y., de Seze, R., Villégier, A.-S., 2012. Effects of 900MHz radiofrequency on corticosterone, emotional memory and neuroinflammation in middle-aged rats. *Experimental Gerontology* 47, 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.03.015>
- Brazel, C.Y., Nuñez, J.L., Yang, Z., Levison, S.W., 2005. Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience* 131, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.038>

- Brillaud, E., Piotrowski, A., de Seze, R., 2007. Effect of an acute 900MHz GSM exposure on glia in the rat brain: A time-dependent study. *Toxicology* 238, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.05.019>
- Capilla-Gonzalez, V., Cebrian-Silla, A., Guerrero-Cazares, H., Garcia-Verdugo, J.M., Quiñones-Hinojosa, A., 2014. Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone: Astrocytic and Ependymal Cells in the Aged SVZ. *Glia* 62, 790–803. <https://doi.org/10.1002/glia.22642>
- Capstick, M.H., Kuehn, S., Berdinas-Torres, V., Gong, Y., Wilson, P.F., Ladbury, J.M., Koepke, G., McCormick, D.L., Gauger, J., Melnick, R.L., Kuster, N., 2017. A Radio Frequency Radiation Exposure System for Rodents Based on Reverberation Chambers. *IEEE Trans. Electromagn. Compat.* 59, 1041–1052. <https://doi.org/10.1109/TEMC.2017.2649885>
- Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., Reiner, O., 2000. Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Human Molecular Genetics* 9, 2205–2213. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.hmg.a018911>
- Cavaliere, F., Benito-Muñoz, M., Panicker, M., Matute, C., 2013. NMDA modulates oligodendrocyte differentiation of subventricular zone cells through PKC activation. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00261>
- Cavaliere, F., Urra, O., Alberdi, E., Matute, C., 2012. Oligodendrocyte differentiation from adult multipotent stem cells is modulated by glutamate. *Cell Death Dis* 3, e268–e268. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.144>
- Cavanagh, J.B., Hopewell, J.W., 1972. Mitotic activity in the subependymal plate of rats and the long-term consequences of X-irradiation. *Journal of the Neurological Sciences* 15, 471–482. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(72\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0022-510X(72)90172-4)
- Cayre, M., Canoll, P., Goldman, J.E., 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Progress in Neurobiology* 88, 41–63. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.001>
- Cederquist, G.Y., Luchniak, A., Tischfield, M.A., Peeva, M., Song, Y., Menezes, M.P., Chan, W.-M., Andrews, C., Chew, S., Jamieson, R.V., Gomes, L., Flaherty, M., Grant, P.E., Gupta, M.L., Engle, E.C., 2012. An inherited TUBB2B mutation alters a kinesin-binding site and causes polymicrogyria, CFEOM and axon dysinnervation. *Human Molecular Genetics* 21, 5484–5499. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds393>
- Chen, C., Ma, Q., Liu, C., Deng, P., Zhu, G., Zhang, L., He, M., Lu, Y., Duan, W., Pei, L., Li, M., Yu, Z., Zhou, Z., 2015. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells. *Sci Rep* 4, 5103. <https://doi.org/10.1038/srep05103>

- Chen, N., Murphy, T.H., Raymond, L.A., 2000. Competitive Inhibition of NMDA Receptor–Mediated Currents by Extracellular Calcium Chelators. *Journal of Neurophysiology* 84, 693–697. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.2.693>
- Chojnacki, A.K., Mak, G.K., Weiss, S., 2009. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci* 10, 153–163. <https://doi.org/10.1038/nrn2571>
- Christ, A., Gosselin, M.-C., Christopoulou, M., Kühn, S., Kuster, N., 2010a. Age-dependent tissue-specific exposure of cell phone users. *Phys. Med. Biol.* 55, 1767–1783. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/7/001>
- Christ, A., Gosselin, M.-C., Kühn, S., Kuster, N., 2010b. Impact of pinna compression on the RF absorption in the heads of adult and juvenile cell phone users. *Bioelectromagnetics* 31, 406–412. <https://doi.org/10.1002/bem.20575>
- Christ, A., Kainz, W., Hahn, E.G., Honegger, K., Zefferer, M., Neufeld, E., Rascher, W., Janka, R., Bautz, W., Chen, J., Kiefer, B., Schmitt, P., Hollenbach, H.-P., Shen, J., Oberle, M., Szczerba, D., Kam, A., Guag, J.W., Kuster, N., 2010c. The Virtual Family—development of surface-based anatomical models of two adults and two children for dosimetric simulations. *Phys. Med. Biol.* 55, N23–N38. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/2/N01>
- Cobb, B.L., Jauchem, J.R., Mason, P.A., Dooley, M.P., Miller, S.A., Ziriaux, J.M., Murphy, M.R., n.d. Neural and behavioral teratological evaluation of rats exposed to ultra-wideband electromagnetic fields 14.
- Colak, D., Mori, T., Brill, M.S., Pfeifer, A., Falk, S., Deng, C., Monteiro, R., Mummery, C., Sommer, L., Gotz, M., 2008. Adult Neurogenesis Requires Smad4-Mediated Bone Morphogenic Protein Signaling in Stem Cells. *Journal of Neuroscience* 28, 434–446. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4374-07.2008>
- Cole, A.E., Murray, S.S., Xiao, J., 2016. Bone Morphogenetic Protein 4 Signalling in Neural Stem and Progenitor Cells during Development and after Injury. *Stem Cells International* 2016, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2016/9260592>
- Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.-M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Alvarez-Buylla, A., 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3, 1091–1097. <https://doi.org/10.1038/80606>
- Corotto, F.S., Henegar, J.R., Maruniak, J.A., 1994. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61, 739–744. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90397-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90397-2)
- Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelsø, C., Holtas, S., van Roon-Mom, W.M.C., Bjork-Eriksson, T., Nordborg, C., Frisen, J., Dragunow, M., Faull, R.L.M., Eriksson, P.S., 2007.

- Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension. *Science* 315, 1243–1249. <https://doi.org/10.1126/science.1136281>
- Curtis, M.A., Penney, E.B., Pearson, J., Dragunow, M., Connor, B., Faull, R.L.M., 2005. The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain. *Neuroscience* 132, 777–788. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.051>
- Dasdag, S., Akdag, M.Z., Ulukaya, E., Uzunlar, A.K., Ocağ, A.R., 2009. Effect of Mobile Phone Exposure on Apoptotic Glial Cells and Status of Oxidative Stress in Rat Brain. *Electromagnetic Biology and Medicine* 28, 342–354. <https://doi.org/10.3109/15368370903206556>
- De Biase, L.M., Kang, S.H., Baxi, E.G., Fukaya, M., Pucak, M.L., Mishina, M., Calabresi, P.A., Bergles, D.E., 2011. NMDA Receptor Signaling in Oligodendrocyte Progenitors Is Not Required for Oligodendrogenesis and Myelination. *Journal of Neuroscience* 31, 12650–12662. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2455-11.2011>
- Del Bigio, M.R., 2010. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 55–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0624-y>
- Del Bigio, M.R., 1995. The ependyma: A protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1002/glia.440140102>
- Del Vecchio, G., Giuliani, A., Fernandez, M., Mesirca, P., Bersani, F., Pinto, R., Ardoino, L., Lovisolo, G.A., Giardino, L., Calzà, L., 2009. Continuous exposure to 900MHz GSM-modulated EMF alters morphological maturation of neural cells. *Neuroscience Letters* 455, 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.061>
- Delgehyr, N., Meunier, A., Faucourt, M., Bosch Grau, M., Strehl, L., Janke, C., Spassky, N., 2015. Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 19–35. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.004>
- D'Gama, A.M., Woodworth, M.B., Hossain, A.A., Bizzotto, S., Hatem, N.E., LaCoursiere, C.M., Najm, I., Ying, Z., Yang, E., Barkovich, A.J., Kwiatkowski, D.J., Vinters, H.V., Madsen, J.R., Mathern, G.W., Blümcke, I., Poduri, A., Walsh, C.A., 2017. Somatic Mutations Activating the mTOR Pathway in Dorsal Telencephalic Progenitors Cause a Continuum of Cortical Dysplasias. *Cell Reports* 21, 3754–3766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.106>
- Di Giorgi-Gerevini, V., Melchiorri, D., Battaglia, G., Ricci-Vitiani, L., Ciceroni, C., Busceti, C.L., Biagioni, F., Iacovelli, L., Canudas, A.M., Parati, E., De Maria, R., Nicoletti, F., 2005. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ* 12, 1124–1133. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401639>

- Dimbylow, P., Bolch, W., 2007. Whole-body-averaged SAR from 50 MHz to 4 GHz in the University of Florida child voxel phantoms. *Phys. Med. Biol.* 52, 6639–6649. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/22/006>
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22, 391–397. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01401-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01401-0)
- Divan, H.A., Kheifets, L., Obel, C., Olsen, J., 2012. Cell phone use and behavioural problems in young children. *J Epidemiol Community Health* 66, 524–529. <https://doi.org/10.1136/jech.2010.115402>
- Divan, H.A., Kheifets, L., Obel, C., Olsen, J., 2008. Prenatal and Postnatal Exposure to Cell Phone Use and Behavioral Problems in Children. *Epidemiology* 19, 523–529. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318175dd47>
- Divan, H.A., Kheifets, L., Olsen, J., 2011. Prenatal cell phone use and developmental milestone delays among infants. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 37, 341–348.
- Doetsch, F., Alvarez-Buylla, A., 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14895–14900. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14895>
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1997. Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J. Neurosci.* 17, 5046–5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997>
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.-M., Alvarez-Buylla, A., 2002. EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron* 36, 1021–1034. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01133-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01133-9)
- Dolado, I., Nebreda, A.R., 2008. AKT and Oxidative Stress Team Up to Kill Cancer Cells. *Cancer Cell* 14, 427–429. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.006>
- Domenichini, F., Terrié, E., Arnault, P., Harnois, T., Magaud, C., Bois, P., Constantin, B., Coronas, V., 2018. Store-Operated Calcium Entries Control Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain Subventricular Zone: SOCE and Neural Stem Cells. *Stem Cells* 36, 761–774. <https://doi.org/10.1002/stem.2786>
- D'Souza, B., Miyamoto, A., Weinmaster, G., 2008. The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27, 5148–5167. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.229>
- Eghlidospour, M., Ghanbari, A., Mortazavi, S.M.J., Azari, H., 2017. Effects of radiofrequency exposure emitted from a GSM mobile phone on proliferation, differentiation, and apoptosis of neural stem cells. *Anat Cell Biol* 50, 115. <https://doi.org/10.5115/acb.2017.50.2.115>
- El Waly, B., Macchi, M., Cayre, M., Durbec, P., 2014. Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00145>

- Elliott, P., Toledano, M.B., Bennett, J., Beale, L., de Hoogh, K., Best, N., Briggs, D.J., 2010. Mobile phone base stations and early childhood cancers: case-control study. *BMJ* 340, c3077–c3077. <https://doi.org/10.1136/bmj.c3077>
- Enwere, E., 2004. Aging Results in Reduced Epidermal Growth Factor Receptor Signaling, Diminished Olfactory Neurogenesis, and Deficits in Fine Olfactory Discrimination. *Journal of Neuroscience* 24, 8354–8365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2751-04.2004>
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Essers, M.A.G., Weijzen, S., de Vries-Smits, A.M.M., Saarloos, I., de Ruiter, N.D., Bos, J.L., Burgering, B.M.T., 2004. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* 23, 4802–4812. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600476>
- Faigle, R., Song, H., 2013. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 2435–2448. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.002>
- Fan, H., Gao, J., Wang, W., Li, X., Xu, T., Yin, X., 2012. Expression of NMDA Receptor and its Effect on Cell Proliferation in the Subventricular Zone of Neonatal Rat Brain. *Cell Biochem Biophys* 62, 305–316. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9302-5>
- Farag, H., Froehler, S., Oexle, K., Ravindran, E., Schindler, D., Staab, T., Huebner, A., Kraemer, N., Chen, W., Kaundl, A.M., 2013. Abnormal centrosome and spindle morphology in a patient with autosomal recessive primary microcephaly type 2 due to compound heterozygous WDR62 gene mutation. *Orphanet J Rare Dis* 8, 178. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-178>
- Feng, S., Ma, S., Jia, C., Su, Y., Yang, S., Zhou, K., Liu, Y., Cheng, J., Lu, D., Fan, L., Wang, Y., 2016. Sonic hedgehog is a regulator of extracellular glutamate levels and epilepsy. *EMBO Rep* 17, 682–694. <https://doi.org/10.15252/embr.201541569>
- Finnie, J.W., Blumbergs, P.C., Cai, Z., Manavis, J., Kuchel, T.R., 2006a. Neonatal mouse brain exposure to mobile telephony and effect on blood-brain barrier permeability. *Pathology* 38, 262–263. <https://doi.org/10.1080/00313020600699284>
- Finnie, J.W., Blumbergs, P.C., Cai, Z., Manavis, J., Kuchel, T.R., 2006b. Effect of mobile telephony on blood-brain barrier permeability in the fetal mouse brain. *Pathology* 38, 63–65. <https://doi.org/10.1080/00313020500459607>
- Finnie, J.W., Blumbergs, P.C., Manavis, J., Utteridge, T.D., Gebiski, V., Davies, R.A., Vernon-Roberts, B., Kuchel, T.R., 2002. Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* 34, 344–347. <https://doi.org/10.1080/003130202760120517>

- Finnie, J.W., Cai, Z., Manavis, J., Helps, S., Blumbergs, P.C., 2010. Microglial activation as a measure of stress in mouse brains exposed acutely (60 minutes) and long-term (2 years) to mobile telephone radiofrequency fields. *Pathology* 42, 151–154. <https://doi.org/10.3109/00313020903494086>
- Ford, E.C., Achanta, P., Purger, D., Armour, M., Reyes, J., Fong, J., Kleinberg, L., Redmond, K., Wong, J., Jang, M.H., Jun, H., Song, H.-J., Quinones-Hinojosa, A., 2011. Localized CT-Guided Irradiation Inhibits Neurogenesis in Specific Regions of the Adult Mouse Brain. *Radiation Research* 175, 774–783. <https://doi.org/10.1667/RR2214.1>
- Fotuhi, M., Standaert, D.G., Testa, C.M., Penney, J.B., Young, A.B., 1994. Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat. *Molecular Brain Research* 21, 283–292. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)90259-3](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90259-3)
- Fuentealba, L.C., Obernier, K., Alvarez-Buylla, A., 2012. Adult Neural Stem Cells Bridge Their Niche. *Cell Stem Cell* 10, 698–708. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.012>
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., Alvarez-Buylla, A., 2015. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161, 1644–1655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.041>
- Fukuda, S., Kondo, T., Takebayashi, H., Taga, T., 2004. Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway. *Cell Death Differ* 11, 196–202. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401332>
- Gabriel, C., 1996. Compilation of the Dielectric Properties of Body Tissues at RF and Microwave Frequencies.: Defense Technical Information Center, Fort Belvoir, VA. <https://doi.org/10.21236/ADA303903>
- Gajera, C.R., Emich, H., Lioubinski, O., Christ, A., Beckervordersandforth-Bonk, R., Yoshikawa, K., Bachmann, S., Christensen, E.I., Götz, M., Kempermann, G., Peterson, A.S., Willnow, T.E., Hammes, A., 2010. LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. *Journal of Cell Science* 123, 1922–1930. <https://doi.org/10.1242/jcs.065912>
- Gogtay, N., Giedd, J.N., Lusk, L., Hayashi, K.M., Greenstein, D., Vaituzis, A.C., Nugent, T.F., Herman, D.H., Clasen, L.S., Toga, A.W., Rapoport, J.L., Thompson, P.M., 2004. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 8174–8179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402680101>
- Gogtay, N., Thompson, P.M., 2010. Mapping gray matter development: Implications for typical development and vulnerability to psychopathology. *Brain and Cognition* 72, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2009.08.009>

- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., Gage, F.H., 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabé de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S., Mohier, E., 2003. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* 130, 1391–1402. <https://doi.org/10.1242/dev.00374>
- Greter, M., Merad, M., 2013. Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia* 61, 121–127. <https://doi.org/10.1002/glia.22408>
- Grondona, J.M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., López-Ávalos, M.D., 2013. A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochem Cell Biol* 139, 205–220. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1008-2>
- Gross, R.E., Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zang, Z., Santschi, L., Kessler, J.A., 1996. Bone Morphogenetic Proteins Promote Astroglial Lineage Commitment by Mammalian Subventricular Zone Progenitor Cells. *Neuron* 17, 595–606. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80193-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80193-2)
- Guerrini, R., Dobyns, W.B., 2014. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *The Lancet Neurology* 13, 710–726. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70040-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70040-7)
- Guler, G., Tomruk, A., Ozturk, E., Seyha, N., 2010. The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in non-pregnant and pregnant rabbits and their newborns. *gpb* 29, 59–60. https://doi.org/10.4149/gpb_2010_01_59
- Ha, M., Im, H., Lee, M., Kim, H.J., Kim, B.-C., Gimm, Y.-M., Pack, J.-K., 2007. Radio-Frequency Radiation Exposure from AM Radio Transmitters and Childhood Leukemia and Brain Cancer. *American Journal of Epidemiology* 166, 270–279. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm083>
- Haarala, C., Bergman, M., Laine, M., Revonsuo, A., Koivisto, M., Hämäläinen, H., 2005. Electromagnetic field emitted by 902 MHz mobile phones shows no effects on children's cognitive function. *Bioelectromagnetics* 26, S144–S150. <https://doi.org/10.1002/bem.20142>
- Hack, M.A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P.-M., Götz, M., 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8, 865–872. <https://doi.org/10.1038/nn1479>
- Hadjem, A., Lautru, D., Dale, C., Man Fai Wong, Hanna, V.F., Wiart, J., 2005. Study of specific absorption rate (SAR) induced in two child head models and in adult heads using mobile phones. *IEEE Trans. Microwave Theory Techn.* 53, 4–11. <https://doi.org/10.1109/TMTT.2004.839343>

- Haghani, M., Shabani, M., Moazzami, K., 2013. Maternal mobile phone exposure adversely affects the electrophysiological properties of Purkinje neurons in rat offspring. *Neuroscience* 250, 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.07.049>
- Hand, J.W., Li, Y., Thomas, E.L., Rutherford, M.A., Hajnal, J.V., 2006. Prediction of specific absorption rate in mother and fetus associated with MRI examinations during pregnancy. *Magn. Reson. Med.* 55, 883–893. <https://doi.org/10.1002/mrm.20824>
- Hauri, D.D., Spycher, B., Huss, A., Zimmermann, F., Grotzer, M., von der Weid, N., Spoerri, A., Kuehni, C.E., Rösli, M., for the Swiss National Cohort and the Swiss Paediatric Oncology Group, 2014. Exposure to Radio-Frequency Electromagnetic Fields From Broadcast Transmitters and Risk of Childhood Cancer: A Census-based Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* 179, 843–851. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt442>
- Haverfield, E.V., Whited, A.J., Petras, K.S., Dobyns, W.B., Das, S., 2009. Intragenic deletions and duplications of the LIS1 and DCX genes: a major disease-causing mechanism in lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 17, 911–918. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.213>
- Hogan, P.G., Lewis, R.S., Rao, A., 2010. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 491–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132550>
- Höglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I., Hirsch, E.C., 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 726–735. <https://doi.org/10.1038/nn1265>
- Holmberg, J., 2005. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes & Development* 19, 462–471. <https://doi.org/10.1101/gad.326905>
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Grayer Wolf, S., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J., Reiner, O., 1999. Doublecortin, a Stabilizer of Microtubules. *Human Molecular Genetics* 8, 1599–1610. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.9.1599>
- Hu, H., Yang, Y., Eade, A., Xiong, Y., Qi, Y., 2007. Breaches of the pial basement membrane and disappearance of the glia limitans during development underlie the cortical lamination defect in the mouse model of muscle-eye-brain disease. *J. Comp. Neurol.* 501, 168–183. <https://doi.org/10.1002/cne.21238>
- Hussain, M.S., Baig, S.M., Neumann, S., Nürnberg, G., Farooq, M., Ahmad, I., Alef, T., Hennies, H.C., Technau, M., Altmüller, J., Frommolt, P., Thiele, H., Noegel, A.A., Nürnberg, P., 2012. A Truncating Mutation of CEP135 Causes Primary Microcephaly and Disturbed Centrosomal Function. *The American Journal of Human Genetics* 90, 871–878. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.016>
- Hussain, M.S., Baig, S.M., Neumann, S., Peche, V.S., Szczepanski, S., Nürnberg, G., Tariq, M., Jameel, M., Khan, T.N., Fatima, A., Malik, N.A., Ahmad, I., Altmüller, J., Frommolt, P., Thiele, H., Höhne, W., Yigit, G., Wollnik,

- B., Neubauer, B.A., Nürnberg, P., Noegel, A.A., 2013. CDK6 associates with the centrosome during mitosis and is mutated in a large Pakistani family with primary microcephaly. *Human Molecular Genetics* 22, 5199–5214. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt374>
- Huttenlocher, P.R., Dabholkar, A.S., n.d. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex 12.
- Ibrani, M., Ahma, L., Hamiti, E., Haxhibeqiri, J., 2011. DERIVATION OF ELECTROMAGNETIC PROPERTIES OF CHILD BIOLOGICAL TISSUES AT RADIO FREQUENCIES. *PIER Letters* 25, 87–100. <https://doi.org/10.2528/PIERL11052002>
- Imayoshi, I., Kageyama, R., 2014. bHLH Factors in Self-Renewal, Multipotency, and Fate Choice of Neural Progenitor Cells. *Neuron* 82, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.018>
- Jacquet, B.V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J.D., Dykstra, M., Campbell, K., Ostrowski, L.E., Brody, S.L., Ghashghaei, H.T., 2009. FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development* 136, 4021–4031. <https://doi.org/10.1242/dev.041129>
- Jansson, L.C., Åkerman, K.E., 2014. The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm* 121, 819–836. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1174-6>
- Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Peel, A., Mao, X.O., Batteur, S., Greenberg, D.A., 2003. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24, 171–189. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00159-3)
- Jin, Y.-B., Lee, H.-J., Seon lee, J., Pack, J.-K., Kim, N., Lee, Y., 2011. One-year, simultaneous combined exposure of CDMA and WCDMA radiofrequency electromagnetic fields to rats. *International Journal of Radiation Biology* 87, 416–423. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.537428>
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., Frisén, J., 1999. Identification of a Neural Stem Cell in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Cell* 96, 25–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80956-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80956-3)
- Jones, K.S., Connor, B., n.d. Intrinsic regulation of adult subventricular zone neural progenitor cells and the effect of brain injury 11.
- Jorge-Mora, T., Misa-Agustiño, M.J., Rodríguez-González, J.A., Jorge-Barreiro, F.J., Ares-Pena, F.J., López-Martín, E., 2011. The Effects of Single and Repeated Exposure to 2.45 GHz Radiofrequency Fields on c-Fos Protein Expression in the Paraventricular Nucleus of Rat Hypothalamus. *Neurochem Res* 36, 2322–2332. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0557-4>
- Kaplan, M., Hinds, J., 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092–1094. <https://doi.org/10.1126/science.887941>

- Kaplan, M.S., 2001. Environment complexity stimulates visual cortex neurogenesis: death of a dogma and a research career. *Trends in Neurosciences* 24, 617–620. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01967-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01967-6)
- Katz, M., Amit, I., Yarden, Y., 2007. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773, 1161–1176. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.002>
- Kazanis, I., 2009. The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the centre of the brain: How plastic is adult neurogenesis? Opportunities for therapy and questions to be addressed. *Brain* 132, 2909–2921. <https://doi.org/10.1093/brain/awp237>
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A.L.M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., Ang, S.-L., 2006. Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495–505. <https://doi.org/10.1242/dev.02223>
- Kempermann, G., Wiskott, L., Gage, F.H., 2004. Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.001>
- Kesari, K.K., Behari, J., Kumar, S., 2010. Mutagenic response of 2.45 GHz radiation exposure on rat brain. *International Journal of Radiation Biology* 86, 334–343. <https://doi.org/10.3109/09553000903564059>
- Keshvari, J., Lang, S., 2005. Comparison of radio frequency energy absorption in ear and eye region of children and adults at 900, 1800 and 2450 MHz. *Phys. Med. Biol.* 50, 4355–4369. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/18/008>
- Kielar, M., Tuy, F.P.D., Bizzotto, S., Lebrand, C., de Juan Romero, C., Poirier, K., Oegema, R., Mancini, G.M., Bahi-Buisson, N., Olaso, R., Le Moing, A.-G., Boutourlinsky, K., Boucher, D., Carpentier, W., Berquin, P., Deleuze, J.-F., Belvindrah, R., Borrell, V., Welker, E., Chelly, J., Croquelois, A., Francis, F., 2014. Mutations in Eml1 lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat Neurosci* 17, 923–933. <https://doi.org/10.1038/nn.3729>
- Klotz, L.-O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., Monsalve, M., 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biology* 6, 51–72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>
- Knickmeyer, R.C., Gouttard, S., Kang, C., Evans, D., Wilber, K., Smith, J.K., Hamer, R.M., Lin, W., Gerig, G., Gilmore, J.H., 2008. A Structural MRI Study of Human Brain Development from Birth to 2 Years. *Journal of Neuroscience* 28, 12176–12182. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3479-08.2008>
- Kolodziejczyk, K., Saab, A.S., Nave, K.-A., Attwell, D., 2010. Why do oligodendrocyte lineage cells express glutamate receptors? *F1000 Biol Rep* 2. <https://doi.org/10.3410/B2-57>

- Kong, J.H., Yang, L., Dessaud, E., Chuang, K., Moore, D.M., Rohatgi, R., Briscoe, J., Novitch, B.G., 2015. Notch Activity Modulates the Responsiveness of Neural Progenitors to Sonic Hedgehog Signaling. *Developmental Cell* 33, 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.005>
- Kopan, R., Ilagan, M.X.G., 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Kriska, J., Honsa, P., Dzamba, D., Butenko, O., Kolenicova, D., Janeckova, L., Nahacka, Z., Andera, L., Kozmik, Z., Taketo, M.M., Korinek, V., Anderova, M., 2016. Manipulating Wnt signaling at different subcellular levels affects the fate of neonatal neural stem/progenitor cells. *Brain Research* 1651, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.026>
- Kuge, A., Takemura, S., Kokubo, Y., Sato, S., Goto, K., Kayama, T., 2009. Temporal profile of neurogenesis in the subventricular zone, dentate gyrus and cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *Neurological Research* 31, 969–976. <https://doi.org/10.1179/174313209X383312>
- Kühnlein, A., Heumann, C., Thomas, S., Heinrich, S., Radon, K., 2009. Personal exposure to mobile communication networks and well-being in children-A statistical analysis based on a functional approach. *Bioelectromagnetics* 30, 261–269. <https://doi.org/10.1002/bem.20477>
- Kumlin, T., Iivonen, H., Miettinen, P., Juvonen, A., van Groen, T., Puranen, L., Pitkäaho, R., Juutilainen, J., Tanila, H., 2007. Mobile Phone Radiation and the Developing Brain: Behavioral and Morphological Effects in Juvenile Rats. *Radiation Research* 168, 471–479. <https://doi.org/10.1667/RR1002.1>
- Kuribayashi, M., Wang, J., Fujiwara, O., Doi, Y., Nabae, K., Tamano, S., Ogiso, T., Asamoto, M., Shirai, T., 2005. Lack of effects of 1439 MHz electromagnetic near field exposure on the blood-brain barrier in immature and young rats. *Bioelectromagnetics* 26, 578–588. <https://doi.org/10.1002/bem.20138>
- Lai, Q., Hu, P., Li, Q., Li, Xinyu, Yuan, R., Tang, X., Wang, W., Li, Xiaoquan, Fan, H., Yin, X., 2016. NMDA receptors promote neurogenesis in the neonatal rat subventricular zone following hypoxic-ischemic injury. *Molecular Medicine Reports* 13, 206–212. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4501>
- Laval, L., Leveque, P., Jecko, B., n.d. A New InVitro Exposure Device for the Mobile Frequency of 900 MHz 9.
- Lazarini, F., Mouthon, M.-A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Lamarque, S., Abrous, D.N., Boussin, F.D., Lledo, P.-M., 2009. Cellular and Behavioral Effects of Cranial Irradiation of the Subventricular Zone in Adult Mice. *PLoS ONE* 4, e7017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007017>
- Lee, H.-J., Jin, Y.B., Lee, J.-S., Choi, S.Y., Kim, T.-H., Pack, J.-K., Choi, H.D., Kim, N., Lee, Y.-S., 2011. Lymphoma development of simultaneously combined exposure to two radiofrequency signals in AKR/J mice. *Bioelectromagnetics* 32, 485–492. <https://doi.org/10.1002/bem.20655>

- Lenroot, R.K., Gogtay, N., Greenstein, D.K., Wells, E.M., Wallace, G.L., Clasen, L.S., Blumenthal, J.D., Lerch, J., Zijdenbos, A.P., Evans, A.C., Thompson, P.M., Giedd, J.N., 2007. Sexual dimorphism of brain developmental trajectories during childhood and adolescence. *NeuroImage* 36, 1065–1073. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.03.053>
- Leone, L., Cuccurazzu, B., Podda, M.V., Piacentini, R., Riccardi, E., Ripoli, C., Azzena, G.B., Grassi, C., 2011. P22.22 Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Clinical Neurophysiology* 122, S162. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(11\)60583-X](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(11)60583-X)
- Leone, L., Fusco, S., Mastrodonato, A., Piacentini, R., Barbati, S.A., Zaffina, S., Pani, G., Podda, M.V., Grassi, C., 2014. Epigenetic Modulation of Adult Hippocampal Neurogenesis by Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields. *Mol Neurobiol* 49, 1472–1486. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8650-8>
- Leuchtmann, E.A., Ratner, A.E., Vijitruth, R., Qu, Y., McDonald, J.W., 2003. AMPA receptors are the major mediators of excitotoxic death in mature oligodendrocytes. *Neurobiology of Disease* 14, 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.07.004>
- Lewis, R.S., 2011. Store-Operated Calcium Channels: New Perspectives on Mechanism and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a003970–a003970. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003970>
- Lim, D.A., Alvarez-Buylla, A., 2016. The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a018820. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>
- Lim, D.A., Alvarez-Buylla, A., 2014. Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences* 37, 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2000. Noggin Antagonizes BMP Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis. *Neuron* 28, 713–726. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00148-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00148-3)
- Lira-Diaz, E., Gonzalez-Perez, O., 2016. Emerging roles of microglia cells in the regulation of adult neural stem cells. *NN* 3, 204. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2016.32>
- Liu, Yu-xiao, Tai, J., Li, G., Zhang, Z., Xue, J., Liu, H., Zhu, H., Cheng, J., Liu, Yuan-ling, Li, A., Zhang, Y., 2012. Exposure to 1950-MHz TD-SCDMA Electromagnetic Fields Affects the Apoptosis of Astrocytes via Caspase-3-Dependent Pathway. *PLoS ONE* 7, e42332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042332>
- Lledo, P., Carleton, A., Desmaisons, D., Salin, P., Vincent, J., 1998. Mémoire olfactive et migration neuronale chez l'adulte. *Med Sci (Paris)* 14, 771. <https://doi.org/10.4267/10608/1135>

- Lois, C., Alvarez-Buylla, A., 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 2074–2077. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2074>
- Loughran, S.P., Benz, D.C., Schmid, M.R., Murbach, M., Kuster, N., Achermann, P., 2013. No increased sensitivity in brain activity of adolescents exposed to mobile phone-like emissions. *Clinical Neurophysiology* 124, 1303–1308. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2013.01.010>
- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6, 603–614. <https://doi.org/10.1038/nrn1726>
- Luo, J., Shook, B.A., Daniels, S.B., Conover, J.C., 2008. Subventricular Zone-Mediated Ependyma Repair in the Adult Mammalian Brain. *Journal of Neuroscience* 28, 3804–3813. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0224-08.2008>
- Macas, J., Nern, C., Plate, K.H., Momma, S., 2006. Increased Generation of Neuronal Progenitors after Ischemic Injury in the Aged Adult Human Forebrain. *Journal of Neuroscience* 26, 13114–13119. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4667-06.2006>
- Marthiens, V., Rujano, M.A., Pennetier, C., Tessier, S., Paul-Gilloteaux, P., Basto, R., 2013. Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol* 15, 731–740. <https://doi.org/10.1038/ncb2746>
- Martineau, F.S., Sahu, S., Plantier, V., Buhler, E., Schaller, F., Fournier, L., Chazal, G., Kawasaki, H., Represa, A., Watrin, F., Manent, J.-B., 2018. Correct Laminar Positioning in the Neocortex Influences Proper Dendritic and Synaptic Development. *Cerebral Cortex* 28, 2976–2990. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy113>
- Martínez-Búrdalo, M., Martín, A., Anguiano, M., Villar, R., 2004. Comparison of FDTD-calculated specific absorption rate in adults and children when using a mobile phone at 900 and 1800 MHz. *Phys. Med. Biol.* 49, 345–354. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/2/011>
- Maskey, D., Kim, H.-J., Kim, H.G., Kim, M.J., 2012. Calcium-binding proteins and GFAP immunoreactivity alterations in murine hippocampus after 1 month of exposure to 835MHz radiofrequency at SAR values of 1.6 and 4.0W/kg. *Neuroscience Letters* 506, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.025>
- Maskey, D., Kim, M., Aryal, B., Pradhan, J., Choi, I.-Y., Park, K.-S., Son, T., Hong, S.-Y., Kim, S.B., Kim, H.G., Kim, M.J., 2010a. Effect of 835 MHz radiofrequency radiation exposure on calcium binding proteins in the hippocampus of the mouse brain. *Brain Research* 1313, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.079>
- Maskey, D., Pradhan, J., Aryal, B., Lee, C.-M., Choi, I.-Y., Park, K.-S., Kim, S.B., Kim, H.G., Kim, M.J., 2010b. Chronic 835-MHz radiofrequency exposure to mice hippocampus alters the distribution of calbindin and GFAP immunoreactivity. *Brain Research* 1346, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.045>

- Matsumoto, N., Leventer, R., Kuc, J., Mewborn, S., Dudliceck, L.L., Ramocki, M.B., Pilz, D.T., Mills, P.L., Das, S., Ross, M.E., Ledbetter, D.H., Dobyns, W.B., 2001. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 9, 5–12. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200548>
- Matsuzawa, J., 2001. Age-related Volumetric Changes of Brain Gray and White Matter in Healthy Infants and Children. *Cerebral Cortex* 11, 335–342. <https://doi.org/10.1093/cercor/11.4.335>
- McIntyre, R.E., Lakshminarasimhan Chavali, P., Ismail, O., Carragher, D.M., Sanchez-Andrade, G., Forment, J.V., Fu, B., Del Castillo Velasco-Herrera, M., Edwards, A., van der Weyden, L., Yang, F., Sanger Mouse Genetics Project, Ramirez-Solis, R., Estabel, J., Gallagher, F.A., Logan, D.W., Arends, M.J., Tsang, S.H., Mahajan, V.B., Scudamore, C.L., White, J.K., Jackson, S.P., Gergely, F., Adams, D.J., 2012. Disruption of Mouse Cenpj, a Regulator of Centriole Biogenesis, Phenocopies Seckel Syndrome. *PLoS Genet* 8, e1003022. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003022>
- Mendoza, M.C., Er, E.E., Blenis, J., 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., Alvarez-Buylla, A., 2006. Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *Journal of Neuroscience* 26, 7907–7918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006>
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 17528–17532. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407893101>
- Merzenich, H., Schmiedel, S., Bennack, S., Bruggemeyer, H., Philipp, J., Blettner, M., Schuz, J., 2008. Childhood Leukemia in Relation to Radio Frequency Electromagnetic Fields in the Vicinity of TV and Radio Broadcast Transmitters. *American Journal of Epidemiology* 168, 1169–1178. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn230>
- Ming, G., Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2008. Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.004>
- Moalic, V., Mercier, B., Ferec, C., 2004. Technologie Luminex™ : principe, applications, et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 19, 181–187. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(04\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(04)00057-2)
- Moffat, S.D., Zonderman, A.B., Resnick, S.M., 2001. Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task. *Neurobiology of Aging* 22, 787–796. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00251-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00251-2)

- Morrens, J., Van Den Broeck, W., Kempermann, G., 2012. Glial cells in adult neurogenesis. *Glia* 60, 159–174. <https://doi.org/10.1002/glia.21247>
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., van der Kooy, D., 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071–1082. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90046-9)
- Myshrall, T.D., Moore, S.A., Ostendorf, A.P., Satz, J.S., Kowalczyk, T., Nguyen, H., Daza, R.A.M., Lau, C., Campbell, K.P., Hevner, R.F., 2012. Dystroglycan on Radial Glia End Feet Is Required for Pial Basement Membrane Integrity and Columnar Organization of the Developing Cerebral Cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 71, 1047–1063. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318274a128>
- Nagai, R., Tsunoda, S., Hori, Y., Asada, H., 2000. Selective vulnerability to radiation in the hippocampal dentate granule cells. *Surgical Neurology* 53, 503–507. [https://doi.org/10.1016/S0090-3019\(00\)00214-7](https://doi.org/10.1016/S0090-3019(00)00214-7)
- Nagaoka, T., Togashi, T., Saito, K., Takahashi, M., Ito, K., Ueda, T., Osada, H., Ito, H., Watanabe, S., n.d. An Anatomically Realistic Voxel Model of the Pregnant Woman and Numerical Dosimetry for a Whole-Body Exposure to RF Electromagnetic Fields 5.
- Nagaoka, T., Togashi, T., Saito, K., Takahashi, M., Ito, K., Watanabe, S., 2007. An anatomically realistic whole-body pregnant-woman model and specific absorption rates for pregnant-woman exposure to electromagnetic plane waves from 10 MHz to 2 GHz. *Phys. Med. Biol.* 52, 6731–6745. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/22/012>
- Nakamura, F., Stossel, T.P., Hartwig, J.H., 2011. The filamins: Organizers of cell structure and function. *Cell Adhesion & Migration* 5, 160–169. <https://doi.org/10.4161/cam.5.2.14401>
- Narayanan, S.N., Kumar, R.S., Paval, J., Kedage, V., Bhat, M.S., Nayak, S., Bhat, P.G., 2013. Analysis of emotionality and locomotion in radio-frequency electromagnetic radiation exposed rats. *Neurol Sci* 34, 1117–1124. <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1189-4>
- Nieto-Estévez, V., Defterali, Ç., Vicario-Abejón, C., 2016. IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain. *Front. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00052>
- Nikolova, T., Czyz, J., Rolletschek, A., Blyszczuk, P., Fuchs, J., Jovtchev, G., Schulderer, J., Kuster, N., Wobus, A.M., 2005. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB j.* 19, 1686–1688. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3549fje>
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Kriegstein, A.R., 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 508, 28–44. <https://doi.org/10.1002/cne.21669>

- Nottebohm, F., 2002. Why Are Some Neurons Replaced in Adult Brain? *J. Neurosci.* 22, 624–628. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00624.2002>
- Ohata, S., Alvarez-Buylla, A., 2016. Planar Organization of Multiciliated Ependymal (E1) Cells in the Brain Ventricular Epithelium. *Trends in Neurosciences* 39, 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.05.004>
- Oliva, C.A., Vargas, J.Y., Inestrosa, N.C., 2013. Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00224>
- Olmo, I.G., Ferreira-Vieira, T.H., Ribeiro, F.M., 2016. Dissecting the Signaling Pathways Involved in the Crosstalk between Metabotropic Glutamate 5 and Cannabinoid Type 1 Receptors. *Mol Pharmacol* 90, 609–619. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104372>
- O'Malley, K.L., Jong, Y.-J.I., Gonchar, Y., Burkhalter, A., Romano, C., 2003. Activation of Metabotropic Glutamate Receptor mGlu5 on Nuclear Membranes Mediates Intranuclear Ca²⁺ Changes in Heterologous Cell Types and Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 278, 28210–28219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300792200>
- Orlova, K.A., Parker, W.E., Heuer, G.G., Tsai, V., Yoon, J., Baybis, M., Fenning, R.S., Strauss, K., Crino, P.B., 2010. STRAD α deficiency results in aberrant mTORC1 signaling during corticogenesis in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1591–1602. <https://doi.org/10.1172/JCI41592>
- Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., Dimou, L., Chichung Lie, D., Schroeder, T., Berninger, B., 2013. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 15, 602–613. <https://doi.org/10.1038/ncb2736>
- Ortega, J.A., Radonjić, N.V., Zecevic, N., 2013. Sonic hedgehog promotes generation and maintenance of human forebrain Olig2 progenitors. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00254>
- Palmer, T.D., Takahashi, J., Gage, F.H., 1997. The Adult Rat Hippocampus Contains Primordial Neural Stem Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 8, 389–404. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0595>
- Park, S., Ha, M., Im, H.-J., 2004. Ecological study on residences in the vicinity of AM radio broadcasting towers and cancer death: preliminary observations in Korea. *Int Arch Occup Environ Health* 77. <https://doi.org/10.1007/s00420-004-0512-7>
- Parrini, E., Conti, V., Dobyns, W.B., Guerrini, R., 2016. Genetic Basis of Brain Malformations. *Mol Syndromol* 7, 220–233. <https://doi.org/10.1159/000448639>
- Paulraj, R., Behari, J., 2006a. Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 596, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.12.006>

- Paulraj, R., Behari, J., 2006b. Protein Kinase C Activity in Developing Rat Brain Cells Exposed to 2.45 GHz Radiation. *Electromagnetic Biology and Medicine* 25, 61–70. <https://doi.org/10.1080/15368370600581939>
- Petanjek, Z., Judaš, M., Šimić, G., Rašin, M.R., Uylings, H.B.M., Rakic, P., Kostović, I., 2011. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 13281–13286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105108108>
- Peyman, A., 2011. Dielectric properties of tissues; variation with age and their relevance in exposure of children to electromagnetic fields; state of knowledge. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 434–438. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2011.08.007>
- Peyman, A., Gabriel, C., Grant, E.H., Vermeeren, G., Martens, L., 2010. Variation of the dielectric properties of tissues with age: the effect on the values of SAR in children when exposed to walkie-talkie devices. *Phys. Med. Biol.* 55, 5249–5249. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/17/5249>
- Peyman, A., Holden, S.J., Watts, S., Perrott, R., Gabriel, C., 2007. Dielectric properties of porcine cerebrospinal tissues at microwave frequencies: *in vivo*, *in vitro* and systematic variation with age. *Phys. Med. Biol.* 52, 2229–2245. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/8/013>
- Peyman, A., Rezazadeh, A.A., Gabriel, C., n.d. Changes in the dielectric properties of rat tissue as a function of age at microwave frequencies 3.
- Piacentini, R., Ripoli, C., Mezzogori, D., Azzena, G.B., Grassi, C., 2008. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote *in vitro* neurogenesis via upregulation of Ca_v1 -channel activity. *J. Cell. Physiol.* 215, 129–139. <https://doi.org/10.1002/jcp.21293>
- Piccin, D., Tufford, A., Morshead, C.M., 2014. Neural stem and progenitor cells in the aged subependyma are activated by the young niche. *Neurobiology of Aging* 35, 1669–1679. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.026>
- Pineda, J.R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii Felice, K., Garcia-Verdugo, J.M., Boussin, F.D., Mouthon, M., 2013. Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol Med* 5, 548–562. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202197>
- Platel, J.C., Bordey, A., 2016. The multifaceted subventricular zone astrocyte: From a metabolic and pro-neurogenic role to acting as a neural stem cell. *Neuroscience* 323, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.053>
- Platel, J.-C., Heintz, T., Young, S., Gordon, V., Bordey, A., 2008. Tonic activation of GLU_{K5} kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone: GLU_{K5} receptor effect on

- SVZ neuroblast migration. *The Journal of Physiology* 586, 3783–3793. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155879>
- Platel, J.-C., Lacar, B., Bordey, A., 2007. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Hist* 38, 303–311. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9103-8>
- Platel, J.-C., Stambouliau, S., Nguyen, I., Bordey, A., 2010. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Research Reviews* 63, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.004>
- Prakriya, M., 2009. The molecular physiology of CRAC channels. *Immunological Reviews* 231, 88–98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00820.x>
- Preece, A.W., Goodfellow, S., Wright, M.G., Butler, S.R., Dunn, E.J., Johnson, Y., Manktelow, T.C., Wesnes, K., 2005. Effect of 902 MHz mobile phone transmission on cognitive function in children. *Bioelectromagnetics* 26, S138–S143. <https://doi.org/10.1002/bem.20128>
- Prochnow, N., Gebing, T., Ladage, K., Krause-Finkeldey, D., El Ouardi, A., Bitz, A., Streckert, J., Hansen, V., Dermietzel, R., 2011. Electromagnetic Field Effect or Simply Stress? Effects of UMTS Exposure on Hippocampal Longterm Plasticity in the Context of Procedure Related Hormone Release. *PLoS ONE* 6, e19437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019437>
- Reynolds, B., Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- Ribierre, T., Deleuze, C., Bacq, A., Baldassari, S., Marsan, E., Chipaux, M., Muraca, G., Roussel, D., Navarro, V., Leguern, E., Miles, R., Baulac, S., 2018. Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *Journal of Clinical Investigation* 128, 2452–2458. <https://doi.org/10.1172/JCI99384>
- Rice, D., Barone, S., 2000. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives* 108, 511. <https://doi.org/10.2307/3454543>
- Rocheftort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-D., Lledo, P.-M., 2002. Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb and Improves Odor Memory. *J. Neurosci.* 22, 2679–2689. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02679.2002>
- Roman, D.D., Sperduto, P.W., 1995. Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 31, 983–998. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)00550-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)00550-8)

- Rushing, G., Ihrie, R.A., 2016. Neural stem cell heterogeneity through time and space in the ventricular-subventricular zone. *Front. Biol.* 11, 261–284. <https://doi.org/10.1007/s11515-016-1407-1>
- Ryskalin, L., Lazzeri, G., Flaibani, M., Biagioni, F., Gambardella, S., Frati, A., Fornai, F., 2017. mTOR-Dependent Cell Proliferation in the Brain. *BioMed Research International* 2017, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/7082696>
- Sahoo, S.S., Hota, M.K., Barik, K.K., n.d. 5G Network a New Look into the Future: Beyond all Generation Networks. *American Journal of Systems and Software* 5.
- Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., Marks, A.R., 2017. Intracellular calcium release channels: an update: RyRs vs . IP₃ Rs. *J Physiol* 595, 3041–3051. <https://doi.org/10.1113/JP272781>
- Saran, A., Pazzaglia, S., Mancuso, M., Rebessi, S., Majo, V.D., Tanori, M., Lovisolo, G.A., Pinto, R., Marino, C., 2007. Effects of Exposure of Newborn Patched1 Heterozygous Mice to GSM, 900 MHz. *Radiation Research* 168, 733–740.
- Saunders, N.R., Dreifuss, J.-J., Dziegielewska, K.M., Johansson, P.A., Habgood, M.D., MÅllgÅrd, K., Bauer, H.-C., 2014. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00404>
- Saunders, N.R., Liddelow, S.A., Dziegielewska, K.M., 2012. Barrier Mechanisms in the Developing Brain. *Front. Pharmacol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00046>
- Schaar, B.T., Kinoshita, K., McConnell, S.K., 2004. Doublecortin Microtubule Affinity Is Regulated by a Balance of Kinase and Phosphatase Activity at the Leading Edge of Migrating Neurons. *Neuron* 41, 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00843-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00843-2)
- Sherafat, M.A., Heibatollahi, M., Mongabadi, S., Moradi, F., Javan, M., Ahmadiani, A., 2012. Electromagnetic Field Stimulation Potentiates Endogenous Myelin Repair by Recruiting Subventricular Neural Stem Cells in an Experimental Model of White Matter Demyelination. *J Mol Neurosci* 48, 144–153. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9791-8>
- Shingo, T., 2003. Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin. *Science* 299, 117–120. <https://doi.org/10.1126/science.1076647>
- Shirai, T., Ichihara, T., Wake, K., Watanabe, S., Yamanaka, Y., Kawabe, M., Taki, M., Fujiwara, O., Wang, J., Takahashi, S., Tamano, S., 2007. Lack of promoting effects of chronic exposure to 1.95-GHz W-CDMA signals for IMT-2000 cellular system on development of N-ethylnitrosourea-induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics* 28, 562–572. <https://doi.org/10.1002/bem.20324>
- Shirai, T., Kawabe, M., Ichihara, T., Fujiwara, O., Taki, M., Watanabe, S., Wake, K., Yamanaka, Y., Imaida, K., Asamoto, M., Tamano, S., 2005. Chronic exposure to a 1.439 GHz electromagnetic field used for cellular

- phones does not promote N-ethylnitrosourea induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics* 26, 59–68. <https://doi.org/10.1002/bem.20079>
- Shook, B.A., Manz, D.H., Peters, J.J., Kang, S., Conover, J.C., 2012. Spatiotemporal Changes to the Subventricular Zone Stem Cell Pool through Aging. *Journal of Neuroscience* 32, 6947–6956. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5987-11.2012>
- Sidorov, M.S., Kaplan, E.S., Osterweil, E.K., Lindemann, L., Bear, M.F., 2015. Metabotropic glutamate receptor signaling is required for NMDA receptor-dependent ocular dominance plasticity and LTD in visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 12852–12857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512878112>
- Silva-Vargas, V., Crouch, E.E., Doetsch, F., 2013. Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Current Opinion in Neurobiology* 23, 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.004>
- Sir, J.-H., Barr, A.R., Nicholas, A.K., Carvalho, O.P., Khurshid, M., Sossick, A., Reichelt, S., D'Santos, C., Woods, C.G., Gergely, F., 2011. A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. *Nat Genet* 43, 1147–1153. <https://doi.org/10.1038/ng.971>
- Somasundaram, A., Shum, A.K., McBride, H.J., Kessler, J.A., Feske, S., Miller, R.J., Prakriya, M., 2014. Store-Operated CRAC Channels Regulate Gene Expression and Proliferation in Neural Progenitor Cells. *Journal of Neuroscience* 34, 9107–9123. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0263-14.2014>
- Sommer, A.M., Grote, K., Reinhardt, T., Streckert, J., Hansen, V., Lerchl, A., 2009. Effects of Radiofrequency Electromagnetic Fields (UMTS) on Reproduction and Development of Mice: A Multi-generation Study. *Radiation Research* 171, 89–95. <https://doi.org/10.1667/RR1460.1>
- Sonmez, O.F., Odaci, E., Bas, O., Kaplan, S., 2010. Purkinje cell number decreases in the adult female rat cerebellum following exposure to 900MHz electromagnetic field. *Brain Research* 1356, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.103>
- Spassky, N., 2005. Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *Journal of Neuroscience* 25, 10–18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005>
- Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24, 417–463. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2)
- Streit, W.J., Xue, Q.-S., 2009. Life and Death of Microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 371–379. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9163-5>
- Suzuki, S.O., Goldman, J.E., 2003. Multiple Cell Populations in the Early Postnatal Subventricular Zone Take Distinct Migratory Pathways: A Dynamic Study of Glial and Neuronal Progenitor Migration. *J. Neurosci.* 23, 4240–4250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04240.2003>

- Tada, E., Yang, C., Gobbel, G.T., Lamborn, K.R., Fike, J.R., 1999. Long-Term Impairment of Subependymal Repopulation Following Damage by Ionizing Irradiation. *Experimental Neurology* 160, 66–77. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7172>
- Takahashi, S., Imai, N., Nabae, K., Wake, K., Kawai, H., Wang, J., Watanabe, S., Kawabe, M., Fujiwara, O., Ogawa, K., Tamano, S., Shirai, T., 2010. Lack of Adverse Effects of Whole-Body Exposure to a Mobile Telecommunication Electromagnetic Field on the Rat Fetus. *Radiation Research* 173, 362–372. <https://doi.org/10.1667/RR1615.1>
- Tanaka, A., Watanabe, Y., Kato, H., Araki, T., 2007. Immunohistochemical changes related to ageing in the mouse hippocampus and subventricular zone. *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.01.002>
- Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E., n.d. Estrogen Stimulates a Transient Increase in the Number of New Neurons in the Dentate Gyrus of the Adult Female Rat 10.
- Tau, G.Z., Peterson, B.S., 2010. Normal Development of Brain Circuits. *Neuropsychopharmacol* 35, 147–168. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.115>
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., Doetsch, F., 2008. A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.025>
- Terro, F., Magnaudeix, A., Crochetet, M., Martin, L., Bourthoumieu, S., Wilson, C.-M., Yardin, C., Leveque, P., 2012. GSM-900MHz at low dose temperature-dependently downregulates α -synuclein in cultured cerebral cells independently of chaperone-mediated-autophagy. *Toxicology* 292, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.12.003>
- Thoma, E.C., Wischmeyer, E., Offen, N., Maurus, K., Sirén, A.-L., Scharf, M., Wagner, T.U., 2012. Ectopic Expression of Neurogenin 2 Alone is Sufficient to Induce Differentiation of Embryonic Stem Cells into Mature Neurons. *PLoS ONE* 7, e38651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038651>
- Thomas, S., Heinrich, S., von Kries, R., Radon, K., 2010. Exposure to radio-frequency electromagnetic fields and behavioural problems in Bavarian children and adolescents. *Eur J Epidemiol* 25, 135–141. <https://doi.org/10.1007/s10654-009-9408-x>
- Thomas, S., Kühnlein, A., Heinrich, S., Pram, G., von Kries, R., Radon, K., 2008. Exposure to mobile telecommunication networks assessed using personal dosimetry and well-being in children and adolescents: the German MobilEe-study. *Environ Health* 7, 54. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-54>
- Tillmann, T., Ernst, H., Streckert, J., Zhou, Y., Taugner, F., Hansen, V., Dasenbrock, C., 2010. Indication of cocarcinogenic potential of chronic UMTS-modulated radiofrequency exposure in an ethylnitrosourea

mouse model. *International Journal of Radiation Biology* 86, 529–541. <https://doi.org/10.3109/09553001003734501>

Tofilon, P.J., Fike, J.R., 2000. The Radioresponse of the Central Nervous System: A Dynamic Process. *Radiation Research* 153, 357–370. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0357:TROTCN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0357:TROTCN]2.0.CO;2)

Toledo, E.M., Colombres, M., Inestrosa, N.C., 2008. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Progress in Neurobiology* 86, 281–296. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.08.001>

Toner, C.K., Pirogovsky, E., Kirwan, C.B., Gilbert, P.E., 2009. Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. *Learning & Memory* 16, 338–342. <https://doi.org/10.1101/lm.1315109>

Tong, C.K., Alvarez-Buylla, A., 2014. SnapShot: Adult Neurogenesis in the V-SVZ. *Neuron* 81, 220–220.e1. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.004>

Tong, C.K., Fuentealba, L.C., Shah, J.K., Lindquist, R.A., Ihrie, R.A., Guinto, C.D., Rodas-Rodriguez, J.L., Alvarez-Buylla, A., 2015. A Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem Cell Reports* 5, 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.08.013>

Toth, A.B., Shum, A.K., Prakriya, M., 2016. Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell Calcium* 59, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.011>

Tsai, J.-W., Chen, Y., Kriegstein, A.R., Vallee, R.B., 2005. LIS1 RNA Interference Blocks Neural Stem Cell Division, Morphogenesis, and Motility at Multiple Stages. *The Journal of Cell Biology* 170, 935–945.

UrbÄjn, N., Guillemot, F., 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front. Cell. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00396>

Vrijheid, M., Martinez, D., Forns, J., Guxens, M., Julvez, J., Ferrer, M., Sunyer, J., 2010. Prenatal Exposure to Cell Phone Use and Neurodevelopment at 14 Months. *Epidemiology* 21, 259–262. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181cb41e0>

Wang, L., Zhou, K., Fu, Z., Yu, D., Huang, H., Zang, X., Mo, X., 2017. Brain Development and Akt Signaling: the Crossroads of Signaling Pathway and Neurodevelopmental Diseases. *J Mol Neurosci* 61, 379–384. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0872-y>

Wang, Y., Qin, Z., 2010. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15, 1382–1402. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0481-0>

Watilliaux, A., Edeline, J.-M., L  v  que, P., Jay, T.M., Mallat, M., 2011. Effect of Exposure to 1,800 MHz Electromagnetic Fields on Heat Shock Proteins and Glial Cells in the Brain of Developing Rats. *Neurotox Res* 20, 109–119. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9225-8>

- Wegner, M., 2011. SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes & Development* 25, 2423–2428. <https://doi.org/10.1101/gad.181487.111>
- Wiat, J., Hadjem, A., Wong, M.F., Bloch, I., 2008. Analysis of RF exposure in the head tissues of children and adults. *Phys. Med. Biol.* 53, 3681–3695. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/13/019>
- Willer, T., Lee, H., Lommel, M., Yoshida-Moriguchi, T., de Bernabe, D.B.V., Venzke, D., Cirak, S., Schachter, H., Vajsar, J., Voit, T., Muntoni, F., Loder, A.S., Dobyns, W.B., Winder, T.L., Strahl, S., Mathews, K.D., Nelson, S.F., Moore, S.A., Campbell, K.P., 2012. ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. *Nat Genet* 44, 575–580. <https://doi.org/10.1038/ng.2252>
- Wu'illner, U., Standaert, D.G., Testa, C.M., Landwehrmeyer, G.B., Catania, M.V., Penney, J.B., Young, A.B., 1994. Glutamate receptor expression in rat striatum: Effect of deafferentation. *Brain Research* 647, 209–219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91320-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91320-X)
- Wu, D., Shamsi, S., Chen, J., Kainz, W., 2006. Evaluations of Specific Absorption Rate and Temperature Increase Within Pregnant Female Models in Magnetic Resonance Imaging Birdcage Coils. *IEEE Trans. Microwave Theory Techn.* 54, 4472–4478. <https://doi.org/10.1109/TMTT.2006.884655>
- Xu, S., Zhou, Z., Zhang, L., Yu, Z., Zhang, W., Wang, Y., Wang, X., Li, M., Chen, Y., Chen, C., He, M., Zhang, G., Zhong, M., 2010. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. *Brain Research* 1311, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.062>
- Zeni, O., Sannino, A., Sarti, M., Romeo, S., Massa, R., Scarfi, M.R., 2012. Radiofrequency radiation at 1950 MHz (UMTS) does not affect key cellular endpoints in neuron-like PC12 cells. *Bioelectromagnetics* 33, 497–507. <https://doi.org/10.1002/bem.21712>
- Zhang, C.-L., Zou, Y., He, W., Gage, F.H., Evans, R.M., 2008. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* 451, 1004–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06562>
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Zhang, L., Chopp, M., 2001. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105, 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00117-8)
- Zhang, X., Zhang, L., Cheng, X., Guo, Y., Sun, X., Chen, G., Li, H., Li, P., Lu, X., Tian, M., Qin, J., Zhou, H., Jin, G., 2014. IGF-1 Promotes Brn-4 Expression and Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells via the PI3K/Akt Pathway. *PLoS ONE* 9, e113801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113801>

- Ziabreva, I., Perry, E., Perry, R., Minger, S.L., Ekonomou, A., Przyborski, S., Ballard, C., 2006. Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Psychosomatic Research* 61, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2006.07.017>
- Ziemann, C., Brockmeyer, H., Reddy, S.B., Vijayalaxmi, Prihoda, T.J., Kuster, N., Tillmann, T., Dasenbrock, C., 2009. Absence of genotoxic potential of 902 MHz (GSM) and 1747 MHz (DCS) wireless communication signals: In vivo two-year bioassay in B6C3F1 mice. *International Journal of Radiation Biology* 85, 454–464. <https://doi.org/10.1080/09553000902818907>

Camille MOUGIN

Impact d'expositions aux champs électromagnétiques du téléphone portable sur les processus cellulaires de maturation et de plasticité cérébrales et identification de biomarqueurs d'effets cérébraux

Au cours des dernières décennies, l'exposition aux champs électromagnétiques radiofréquences (CEM-RF) a fortement augmenté en raison du développement rapide des technologies. Les effets possibles des CEM-RF sur la santé des organismes immatures soulèvent des questions, notamment sur les risques de tumeur et sur un neurodéveloppement perturbé. Nous avons cherché à déterminer les effets des niveaux environnementaux et des niveaux élevés d'expositions CEM-RF sur l'intégrité et la différenciation des cellules souches neurales (NSCs) murines. Des cultures in vitro de NSCs ont été réalisées à partir de souris C57BL/6Jrj. Les NSCs ont été exposées dans un système par Wire Patch Cell avec un signal mobile GSM 900 MHz (1/8 Duty-cycle 216 Hz) à 0, 0,083 ou 2 W/kg pendant 3 ou 7 jours. La génotoxicité, la prolifération et la viabilité cellulaire ont été évaluées. La différenciation cellulaire a été évaluée à l'aide de marqueurs spécifiques ainsi que la croissance cellulaire. Enfin, une approche moléculaire a été réalisée par une analyse transcriptomique. Nos résultats indiquent une augmentation du nombre de cassures d'ADN double brin sur les cellules exposées aux CEM-RF par rapport aux cellules non exposées. Nos données suggèrent une réduction de la croissance cellulaire et de la viabilité cellulaire sur les cellules exposées aux CEM-RF par rapport aux cellules non exposées. Aucun effet des CEM-RF n'a été montré sur la différenciation des NSCs en progéniteurs intermédiaires. Cependant un effet des CEM-RF a été montré sur la différenciation des progéniteurs intermédiaires en cellules cérébrales avec notamment une réduction du nombre d'astrocytes. Par ailleurs un phénomène d'apoptose a été observé ainsi qu'une augmentation des progéniteurs d'oligodendrocytes proliférants. Les résultats de transcriptomique mettent en évidence un changement dans les profils d'expression avec notamment la dérégulation de gènes en lien avec la différenciation cellulaire de la neurogenèse, l'homéostasie calcique, le transport d'ion et de neurotransmetteur ou encore la réponse à un stress oxydatif. Certaines voies perturbées suggèrent une atteinte au niveau locomoteur. Ces données suggèrent donc que les NSCs peuvent souffrir et modifier leur différenciation en réponse aux expositions CEM-RF. Une prolifération d'oligodendrocytes plus élevée avec une génotoxicité accrue ainsi qu'un nombre réduit d'astrocytes pourraient être des mécanismes potentiels sous-jacents, respectivement, aux effets cancérogènes et aux anomalies neurodéveloppementales. Ces données confirment la fragilité soupçonnée des cellules immatures en réponse aux expositions CEM-RF.

Mots clé : Radiofréquence, Cellules Souches Neutrales, Zone ventriculaire-sous-ventriculaire, Stress génotoxique, Différenciation Cellulaire, Transcriptomique

Impact of mobile phone electromagnetic field exposures on cellular processes of brain maturation and plasticity and identification of brain biomarkers

In recent decades, exposure to radio frequency electromagnetic fields (RF-EMF) has increased sharply due to the rapid development of technologies. The potential effects of EMF-RF on the health of immature organisms raise questions, including the risk of tumours and impaired neurodevelopment. We sought to determine the effects of environmental levels and high levels of EMF-RF exposures on the integrity and differentiation of murine neural stem cells (NSCs). In vitro cultures of NSCs were conducted from C57BL/6Jrj mice. The NSCs were exposed in a system by Wire Patch Cell with a 900 MHz GSM mobile signal (1/8 Duty-cycle 216 Hz) at 0, 0.083 or 2 W/kg for 3 or 7 days. Genotoxicity, proliferation and cell viability have been evaluated. Cell differentiation was evaluated using specific markers as well as cell growth. Finally, a molecular approach was carried out by a transcriptomic analysis. Our results indicate an increase in the number of double-strand DNA breaks in cells exposed to RF-EMF compared to cells not exposed. Our data suggest a reduction in cell growth and cell viability in cells exposed to RF-EMF compared to those not exposed. No effect of RF-EMF has been shown on the differentiation of SBNs into intermediate progenitors. However an effect of RF-EMF has been shown on the differentiation of intermediate progenitors in brain cells with a reduction in the number of astrocytes. In addition, an apoptosis phenomenon was observed as well as an increase in offspring of proliferating oligodendrocytes. Transcriptomic results show a change in expression patterns including gene deregulation related to cell differentiation of neurogenesis, calcium homeostasis, ion and neurotransmitter transport or the response to oxidative stress. Some disturbed pathways suggest damage to the locomotor system. These data therefore suggest that NSCs may suffer and alter their differentiation in response to RF-EMF exposures. A higher proliferation of oligodendrocytes with increased genotoxicity and a reduced number of astrocytes could be potential underlying mechanisms, respectively, for carcinogenic effects and neurodevelopmental abnormalities. These data confirm the suspected fragility of immature cells in response to EMF-RF exposures.

Keywords: Radiofrequency, Neural Stem Cells, Ventricular-sub-ventricular zone, Genotoxic stress, Cell differentiation, Transcriptomic

Institut national de l'environnement industriel et des risques INERIS

Rue Jacques Taffanel, 60550 Verneuil-en-Halatte

Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaire INEM

UMR7355 CNRS

3B, Rue de la Férollerie, 45071 Orléans

