UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED414)

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives

THÈSE présentée par :

Aurélie BONELLI-SALVADORI

soutenue le : **03 décembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

Sensibilité aux ondes électromagnétiques (4G) du cerveau de rat à différents âges : impact sur la persistance d'un souvenir spatial et sur l'expression des gènes

THÈSE dirigée par :

Mme PEREIRA DE VASCONCELOS Anne	Chercheur INSERM, Université de Strasbourg
Mme BOUTILLIER Anne-Laurence	Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme VILLEGIER Anne Sophie	Chercheur INERIS, Unité de Toxicologie Expérimentale, Verneuil-en-Halatte
M. LE DREAN Yves	Maître de Conférences des Universités, Université de Rennes 1

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Examinateur externe

M. DORE Jean François	Directeur de Recherche INSERM Emérite, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Examinateur interne

M. LARMET Yves	Professeur des Universités, Strasbourg

A toutes celles et ceux que la science et la médecine n'ont pu sauver …

Remerciements

Je tiens à remercier, en premier lieu, les membres de mon jury : Anne Sophie Villégier, Yves Le Drean, Jean François Doré et Yves Larmet d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Merci à IT'IS Foundation pour leur collaboration sur ce projet et plus particulièrement Niels Kuster et Myles Capstick.

Je remercie Jean-Christophe Cassel de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du LNCA.

Anne, merci de m'avoir fait confiance il y a trois ans pour travailler sur cette thèse. Cela n'a pas toujours était simple, surtout au démarrage. Merci pour votre disponibilité en toute circonstance que cela concerne la thèse ou non. Merci pour ces longues conversations rassurantes dans votre bureau afin que je retombe sur mes pieds. Et surtout je tiens à vous remercier pour ces longues heures, journées voire semaines de correction qui m'ont permises de finir mon manuscrit dans les temps.

Laurette, les manips en biologie moléculaire n'ont pas été de tout repos : entre les échecs en Western Blot, les nombreuses amorces commandées et les séquençages à analyser et re-analyser un nombre incalculable de fois. Mais à chaque moment de doute, vous avez su me remettre sur le bon chemin pour que je puisse extraire le meilleur de toutes ces données. Encore merci pour ces longs moments dans votre bureau à parler résultats et interprétations, qui ont souvent débordé tard le soir. Et enfin un grand merci pour tout le temps que vous avez accordé à la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier Brigitte, merci pour ton aide inconditionnelle tout au long de ces 3 ans et pour tout ce temps que tu as passé avec moi et mes "petits" ratons dans cette petite pièce de radiofréquences.

Merci Marie-Muguet pour ton aide surtout au début de ma thèse, pour avoir mis en place les radiofréquences, préparer les plannings, les réservations et les tableaux de résultats

après mon accident. Grâce à toi, j'ai pu garder ma thèse et continuer mes manips plus sereinement.

Je tiens à remercier Karine, Monique et Sophie Reibel pour leurs conseils en matière de bien-être et de santé animale. J'ai appris beaucoup de chose à vos côtés.

Merci au bureau 109e pour ces moments de partage, de rigolades. Peu importe les départs et les arrivées de nouveaux membres, ce bureau est toujours resté le même : le meilleur !

Merci à Openlab et tous ces membres, des organisateurs aux doctorants. J'ai découvert grâce vous l'enseignement avec des collègues au top !

Thank you Rafael for the patience you showed during our conversations in English. With you I have been able to progress orally, even if there is still a lot of work.

Je remercie également tout le LNCA pour son accueil et son sens du travail d'équipe, ainsi que toutes les personnes qui ont travaillé de près ou de loin sur mon projet de thèse : Laura, Rémy, Sophie, Julia, Marion, Lola, …

Merci à ma famille, mes parents et ma sœur pour votre soutien inébranlable pendant ces trois ans. Grâce à vous j'ai pu me concentrer sur ma thèse car je me savais soutenue chaque jour.

Enfin, un GRAND MERCI à ma femme, qui m'a toujours soutenue surtout pendant ces 3 années si éprouvantes à de nombreux niveaux, avec des hauts, des bas et de nombreux doutes. Merci pour les corrections et l'aide que tu m'as apportée pour l'écriture de ce mémoire. Je n'y serai jamais arrivée sans toi, je t'aime …

Et un petit merci bonus à ma fille, le fait de te sentir bouger chaque jour, m'a permis de tenir durant cette dernière ligne droite. J'ai hâte de te serrer dans mes bras …

Table des matières

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

PUBLICATIONS

POSTERS

LISTE DES ABREVIATIONS

GLOSSAIRE

INTRODUCTION 1

INTRODUCTION GENERALE 3

CHAPITRE 1 : LES RADIOFREQUENCES 5

I. Généralités et physique des ondes électromagnétiques (EM) 5

I.1. Le champ électromagnétique (CEM) 5

I.1.1. Le champ électrique (E) 5

I.1.2. Le champ magnétique (CM) 5

I.2. Caractérisation d'une onde électromagnétique 5

I.2.1. La fréquence, période et longueur d'onde 6

I.2.2. Intensité et densité de puissance 6

I.3. Le spectre électromagnétique 7

I.3.1. Rayonnements ionisants 7

I.3.2. Rayonnements non-ionisants 8

II. Les radiofréquences (RF) : la téléphonie mobile 8

II.1. Généralités 8

II.2. Téléphonie mobile : évolution des réseaux 9

II.2.1. Fonctionnement du téléphone mobile 9

II.2.2. Le réseau cellulaire et les antennes relais 10

II.2.3. Evolution du réseau cellulaire : de la première (1G) à la quatrième génération (4G) 10

III. Effets biologiques et mesures 12

III.1. Interaction entre les ondes EM et la matière vivante 12

III.2. Distinction effets thermiques et non thermiques 13

III.2.1. Les effets thermiques 13

III.2.2. Les effets non thermiques 13

III.3. Dosimétrie et réglementation ***14***

III.3.1. Définitions et généralités *14*

III.3.2. Méthodes d'évaluation du DAS *15*

III.3.3. Normes et législation *18*

IV. Effets des RF sur le Système Nerveux Central (SNC) **19**

IV.1. Sommeil et veille (étude par Electroencéphalogramme ou EEG) ***19***

IV.1.1. Effet des RF sur le sommeil *20*

IV.1.2. Effet des RF sur l'état de veille *22*

IV.2. Cognition et mémoire ***24***

IV.3. Barrière Hématoencéphalique (BHE) ***26***

IV.4. Astrocytes, microglies : entre inflammation et cognition ***28***

IV.5. Stress et mort cellulaire ***30***

CHAPITRE 2 : LES SYSTEMES DE MEMOIRE **33**

I. Définitions et classifications de la mémoire **33**

I.1. Définitions générales ***33***

I.2. Classification des systèmes de mémoire ***33***

I.2.1. Différents types de mémoire *33*

I.2.2. La mémoire sensorielle *34*

I.2.3. La mémoire à court terme (MCT) *34*

I.2.4. La mémoire à long terme (MLT) *35*

I.2.5. Consolidation d'un souvenir *38*

II. Le cas particulier de la mémoire spatiale **42**

II.1. Définition ***42***

II.2. Stratégies et représentations spatiales ***43***

II.2.1. Informations égocentriques *43*

II.2.2. Informations allocentriques *43*

II.3. Une structure clé : l'hippocampe ***44***

II.3.1. Organisation anatomique *44*

II.3.2. Connexions de l'hippocampe *46*

II.3.3. Codage neuronal de l'environnement *46*

II.4. Le relai à long terme : le cortex préfrontal médian ***47***

II.4.1. Organisation anatomique *47*

II.4.2. Connexions du CPFm *48*

II.4.3. Implication du CPFm dans la mémoire *49*

CHAPITRE 3 : MODIFICATIONS MOLECULAIRES EN LIEN AVEC LA PLASTICITE CEREBRALE ET LA MEMOIRE **51**

I. Régulations de l'expression des gènes **51**

I.1. ADN et structure ***51***

I.2. Machinerie transcriptionnelle et synthèse d'ARN ***52***

II. Gènes précoces, facteurs de transcription et voies de signalisation associés à la mémoire **54**

II.1. Les gènes immédiats précoces *54*
II.2. Facteurs de transcription et facteurs impliqués dans les processus mnésiques *56*
II.2.1. CREB (c-AMP-responsive element binding protein) *56*
II.2.2. NF-κB (nuclear factor kappa B) *57*
II.2.3. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) *57*
II.2.4. La voie ERK/MAPK et mémoire *58*
III. Régulations épigénétiques et mémoire **59**

CHAPITRE 4 : EFFETS DES RADIOFREQUENCES SUR LA MEMOIRE ET LA PLASTICITE CEREBRALE **63**

I. Effets des RF sur les systèmes de mémoire **63**
I.1. RF et mémoire à court terme ***64***
I.2. RF et mémoire à long terme ***66***
I.2.1. Mémoire spatiale *66*
I.2.2. Mémoire non spatiale *68*
I.2.3. RF et potentialisation à long terme ou PLT, forme de mémoire au niveau cellulaire *72*
I.2.4. Impact des RF sur des modèles Alzheimer *73*
II. Effets des RF sur les systèmes moléculaires **74**
II.1. Etude de l'expression des gènes sur l'intégralité du génome (approche "genome wide") ***74***
II.2. Gènes précoces, mémoire et voies de signalisation ***76***
II.3. Gène en lien avec la neurotransmission glutamatergique, GABAergique, cholinergique, sérotoninergique et dopaminergique ***77***

MATERIELS & METHODES **83**

I. Animaux **85**
II. Exposition aux radiofréquences (RF) **85**
II.1. Installation ***85***
II.2. La dosimétrie ***87***
II.3. Protocole d'exposition ***89***
III. Tests comportementaux **90**
III.1. Le labyrinthe en croix surélevé ***90***
III.1.1. Description du dispositif *90*
III.1.2. Principe de la tâche *91*
III.1.3. Déroulement du test *92*
III.2. L'actographie en cage d'élevage ***92***
III.3. Piscine de Morris ***93***
III.3.1. Description du dispositif *93*
III.3.2. Principe de la tâche *94*
III.3.3. Protocole d'acquisition *95*
III.3.4. Test de rappel (probe) *97*
IV. Mise à mort des animaux et prélèvement des cerveaux **98**
IV.1. Perfusion intracardiaque ***98***

IV.2. Décapitation pour microdissection sur tissu frais 98
V. Analyse de l'expression des gènes 99
V.1. Préparation des ARN totaux 100
V.2. Séquençage d'ARN ou RNA-seq 100
V.2.1. Préparation des librairies 100
V.2.2. Analyses du séquençage et statistiques 101
V.3. Validation par RT-qPCR 101
V.3.1. Rétrotranscription 101
V.3.2. Synthèse des amorces 102
V.3.3. qPCR 102
V.3.4. Quantification/ Expression des résultats 103
VI. Analyses statistiques 104
VI.1. Tests comportementaux 104
VI.2. Analyses en biologie moléculaire 105

CONTRIBUTIONS EXPERIMENTALES 107

PARTIE 1 : EXPOSITIONS AU SIGNAL 4G ET DONNEES BIOLOGIQUES 109

I. Evaluation du poids corporel 109
I.1. Groupes des rats "Ados" 109
I.1.1. Au cours de l'exposition 109
I.1.2. Après l'exposition 111
I.2. Groupes des rats "Adultes" 112
I.2.1. Pendant l'exposition 112
I.2.2. Après l'exposition 113
I.3. Groupe des rats "Agés" 115
I.3.1. Pendant l'exposition 115
I.3.2. Après l'exposition 116
II. Evaluation de la température 117
II.1. Groupes des rats "Ados" 117
II.2. Groupes des rats "Adultes" 121
II.3. Groupes des rats "âgés" 125
III. Mortalité au sein des différents groupes d'âge 129

PARTIE 2 : EFFET D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE A UN SIGNAL RF DE TYPE 4G SUR LE COMPORTEMENT 131

I. Effet des RF sur l'anxiété 131
I.1. Groupe des rats "Ados" 131
I.2. Groupe des rats "Adultes" 133
I.3. Groupe des rats "Agés" 135
II. Effet des RF sur l'activité locomotrice … 137

II.1. Groupe des rats "Ados" ... ***138***
II.2. Groupe des rats "Adultes" ... ***139***
II.3. … chez le rat âgé ... ***141***
III. Effet des RF sur l'apprentissage et la mémoire spatiale à long terme … ... **143**
III.1. … chez le groupe "Ados" … ... ***144***
III.1.1. … lors de l'apprentissage ... *144*
III.1.2. … lors du rappel (mémoire récente et ancienne) ... *146*
III.2. … chez le groupe "Adultes" … ... ***148***
III.2.1. … lors de l'apprentissage ... *149*
III.2.2. … lors du rappel (mémoire récente et ancienne) ... *151*
III.3. … chez le groupe "Agés" … ... ***154***
III.3.1. … lors de l'apprentissage ... *154*
III.3.2. … lors du rappel (mémoire récente et ancienne) ... *156*

PARTIE 3 : EFFET DU SIGNAL 4G SUR LES ANALYSES BIOMOLECULAIRES ... **161**

I. Le groupe des "Adultes" ... **162**
I.1. Effet des RF sur le génome entier : séquençage des ARN messagers ... ***162***
I.1.1. Hippocampe dorsal ... *163*
I.1.2. CPFm ... *174*
I.1.3. Bilan et sélection de gènes ... *190*
I.2. Validation par RT-qPCR dans le groupe des "Adultes" ... ***193***
I.2.1. Hippocampe dorsal ... *193*
I.2.2. CPFm ... *194*
I.3. Etude de l'expression des gènes par RT-qPCR dans deux autres groupes d'âge "Ados" et "Agés" ... ***197***
II. RF et apprentissage ... **199**
II.1. Effet des RF sur l'activité neuronale (c-fos, Egr1) ... ***199***
II.1.1. Dans l'Hip dorsal ... *199*
II.1.2. Dans le CPFm ... *201*
II.2. Effet des RF sur les autres gènes induits par l'apprentissage ... ***204***
II.2.1. Dans l'Hip dorsal ... *204*
II.2.2. Dans le CPFm ... *208*

DISCUSSION ... **213**

L'exposition aux RF (choix du protocole) ... **216**

CHAPITRE 1 : EFFETS DES RF SUR LA PHYSIOLOGIE, LE COMPORTEMENT ET LA MEMOIRE ... **219**

I. RF et Croissance corporelle ... **219**
II. RF et température ... **221**
III. RF, anxiété et activité locomotrice ... **223**
IV. Les RF impactent-elle la mémoire à long terme ? ... **226**

CHAPITRE 2 : EFFETS DES RF SUR L'EXPRESSION DES GENES EN CONDITION BASALE ET DE MEMOIRE 231

I. RF et approches génétiques : toute une histoire 232

I.1. Des résultats de RNA-seq dans l'Hip dorsal en "demi-teinte" 232

I.2. La validation par RT-qPCR 234

I.3. Le comportement et la génétique pas toujours en accord 235

II. Effets des RF sur le génome 235

II.1. En condition "Basal" dans l'Hip dorsal 235

II.2. En condition "Apprentissage" et "LT-Apprentissage" dans le CPFm 237

II.3. Comparaison entre l'Hip dorsal et le CPFm 238

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES 241

Conclusions 243

Perspectives 243

ANNEXES 245

ANNEXE 1 : MISES AU POINT EN PISCINE DE MORRIS 247

ANNEXE 2 : EVOLUTION DU POIDS CORPOREL PAR AGE ET PAR GROUPE 255

I. Groupes des rats "Ados" 255

I.1. Au cours de l'exposition 255

I.2. Après l'exposition 257

II. Groupes des rats "Adultes" 258

II.1. Pendant l'exposition 258

II.2. Après l'exposition 260

III. Groupe des rats "Agés" 261

III.1. Pendant l'exposition 261

III.2. Après l'exposition 262

ANNEXE 3 : EVALUATION DE LA TEMPERATURE POUR TOUS LES AGES (SECONDE LOT) 265

I. Groupes des rats "Ados" 265

II. Groupes des rats "Adultes" 268

III. Groupes des rats "Agés" 272

ANNEXE 4 : SUIVI DES COHORTES DE RATS "AGES" 275

ANNEXE 5 : ANXIETE : ANALYSES DES REDRESSEMENTS ET TOILETTAGE (LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE) 277

I. Groupes des rats "Ados" 277

II. Groupe des rats "Agés" 278

ANNEXE 7 : LISTES DES AMORCES UTILISEES EN RT-QPCR 281

ANNEXE 8 : RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES (ANOVA A DEUX FACTEURS DELAI ET GROUPE) POUR LES VALIDATIONS RT-QPCR 283

ANNEXE 9 : RAPPORT POUR LE RNA-SEQ DE L'HIPPOCAMPE DORSAL 287

ANNEXE 10 : RAPPORT POUR LE RNA-SEQ DU CPFM 301

ANNEXE 11 : RAPPORT POUR LE RNA-SEQ DU CPFM (LONG TERME) 319

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 335

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique d'une onde électromagnétique. 6

Figure 2 : Spectre électromagnétique (ANSES 2013). 7

Figure 3 : Représentation schématique de la répartition du réseau cellulaire 10

Figure 4 : Evaluation numérique du DAS chez la souris (A : 900 MHz, B : 1900 MHz) et chez le rat (C : 900 MHz, D : 1900 MHz), adapté d'après Capstick et al. 2017. 16

Figure 5 : Mesure du DAS chez l'Homme, grâce à un modèle SAM (pour une mesure à la tête). 16

Figure 6 : Famille virtuelle, développée par IT'IS Foundation (Zurich, Suisse) pour une mesure numérique du DAS. 17

Figure 7 : Rat (gauche) et souris (droite) en gel pour l'étude des variations de température (d'après Capstick et al. 2017) 18

Figure 8 : Représentation schématique du modèle proposé par Atkinson et Shiffrin 1968. 34

Figure 9 : Représentation hiérarchique des sous-systèmes de mémoire à long terme et des structures cérébrales sur lesquelles elles reposent, adaptée de Henke, 2010. 36

Figure 10 : La potentialisation à long terme. Le glutamate libéré dans la fente synaptique active les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartique) et AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) en post-synaptique. 40

Figure 11 : Représentation et orientation de l'hippocampe au sein d'un cerveau de rat. 45

Figure 12 : Représentations du cortex préfrontal médian au sein d'un cerveau de rat. 48

Figure 13 : Représentation schématique du nucléosome. 51

Figure 14 : Initiation de la transcription par recrutement des différents facteurs de transcription : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH et Pol II., adapté de C. M. Alberini 2009 53

Figure 15 : Exemples de systèmes d'exposition utilisés dans les études sur les effets des RF. 64

Figure 16 : Test du conditionnement de peur. 68

Figure 17 : Test de reconnaissance d'objets. 70

Figure 18 : Test d'évitement passif. 71

Figure 19 : Rats Long Evans mâles, âgés d'un mois, avec leur buchette, en cage d'élevage... 85

Figure 20 : Chambre réverbérante construite par IT'IS Foundation, avec rack et cages en plastique (Maxi-Miser®)..... 87

Figure 21 : la sensibilité du DAS en fonction du poids selon les 2 modèles "Random plane waves" et "12 plane wave approximation"..... 88

Figure 22 : Evolution du DAS en fonction du poids des rats..... 88

Figure 23. Courbes de température enregistrées chez deux modèles fantômes. P = Phantom 89

Figure 24 : Frise chronologique pour les études comportementales. 90

Figure 25 : Labyrinthe en croix surélevé, bras Nord et Sud fermés et bras Est et Ouest ouverts 91

Figure 26 : Test d'actographie en cage d'élevage. 93

Figure 27 : Piscine de Morris 94

Figure 28 : Définition des différentes zones ou quadrants virtuels (A) et exemples de tracés au cours de l'apprentissage (B)..... 95

Figure 29 : Représentation schématique des différents points de lâcher pour le jour d'habituation, au cours de l'acquisition et lors du rappel..... 97

Figure 30 : Frise chronologique pour les études en biologie moléculaire. 99

Figure 31 : Evolution du poids corporel pour les rats du groupe "Ados". 110

Figure 32 : Evolution du poids après la fin de l'exposition pour les deux lots de rats "Ados". 111

Figure 33 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Adultes". 113

Figure 34 : Evolution du poids après l'exposition pour les deux lots de rats "Adultes". 114

Figure 35 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Agés". 115

Figure 36 : Evolution du poids après la fin de l'exposition pour le premier lot de rats "Agés". 116

Figure 37 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le premier lot de rats "Ados". 118

Figure 38 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le premier lot de rats "Adultes". 122

Figure 39 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le premier lot de rats "Agés". 126

Figure 40 : Evaluation de l'anxiété chez le groupe de rats "Ados". 132

Figure 41 : Evaluation de l'anxiété chez le groupe de rats "Adultes". 134

Figure 42 : Evaluation de l'anxiété chez le groupe de rats "Agés". 136

Figure 43 : Activité locomotrice en cage d'élevage pour le groupe des "Ados". 138

Figure 44 : Activité locomotrice en cage d'élevage pour le groupe des "Adultes". 140

Figure 45 : Activité locomotrice en cage d'élevage pour le groupe des "Agés". 142

Figure 46 : Paramètres étudiés lors de l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale (Piscine de Morris) chez les rats "Ados". 145

Figure 47 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale chez les "Ados" : récente (1 jour) et ancienne (25 jours). 147

Figure 48 : Paramètres étudiés lors de l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale (Piscine de Morris) chez les rats "Adultes". 150

Figure 49 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale chez les "Adultes" : récente (1 jour) et ancienne (25 jours). 152

Figure 50 : Paramètres étudiés lors de l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale (Piscine de Morris) chez les rats "Agés". 155

Figure 51 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale chez les "Agés" : récente (1 jour et 8 jours). 157

Figure 52 : Courbes d'apprentissage (distance parcourue) pour tous les groupes d'âge pour les conditions apprentissage et persistance. 162

Figure 53 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons au sein de l'hippocampe dorsal en condition 1. 164

Figure 54 : Analyse des composantes principales (Principal Component ou PC) pour le groupe "HC" (A) et "Appr" (B) pour les échantillons de l'Hip dorsal en condition 1. .. 165

Figure 55 : Relation fonctionnelle entre les 347 gènes surexprimés pour la comparaison RF vs Sham en basal. 170

Figure 56 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 347 gènes surexprimés issus de la comparaison HC-RF vs HC-Sham (nombre de gènes). 171

Figure 57 : Relation fonctionnelle entre les 77 gènes surexprimés pour la comparaison Sham vs Témoin après apprentissage. 172

Figure 58 : Relation fonctionnelle entre des 361 gènes sous-exprimés pour la comparaison "Sham vs Témoin" après apprentissage. 173

Figure 59 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 361 gènes sous-exprimés issus de la comparaison "Appr-Sham vs Appr-Témoin". 173

Figure 60 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons au sein du CPFm en condition 1. 175

Figure 61 : Analyse des composantes principales (Principal Component ou PC) pour le groupe 176

Figure 62 : Relation fonctionnelle entre les 47 gènes surexprimés pour la comparaison "RF vs Sham" en "Basal". 178

Figure 63 : Relation fonctionnelle entre des 33 gènes sous-exprimés pour la comparaison "RF vs Sham" en condition "Basal" 179

Figure 64 : Comparaison entre les 52 gènes surexprimés ("HC-Sham vs HC-Témoin") et les 33 gènes sous-exprimés ("HC-RF vs HC-Sham"). 180

Figure 65 : Relation fonctionnelle entre les 55 gènes sous-exprimés pour la comparaison "RF vs Sham" pendant l'apprentissage. 181

Figure 66 : Comparaison entre les 33 gènes sous-exprimés (HC-RF vs HC-Sham) et les 55 gènes sous-exprimés (Appr-RF vs Appr-Sham). 182

Figure 67 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons au sein du CPFm en condition 2 (long terme). 183

Figure 68 : Analyse des composantes principales (Principal Component ou PC) pour les échantillons du CPFm en condition 2 (long terme) 184

Figure 69 : Relation fonctionnelle entre les 261 gènes sous-exprimés pour la comparaison "RF vs Sham" (effets à long terme après l'apprentissage). 187

Figure 70 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 261 gènes sous-exprimés issus de la comparaison "RF vs Sham". 188

Figure 71 : Comparaison entre les 55 gènes sous-exprimés (Appr-RF vs Appr-Sham) et 261 gènes sous-exprimés (LT-Appr-RF vs LT-Appr-Sham). 189

Figure 72 : Validation par RT-qPCR de gènes modulés, issus du séquençage d'ARN dans l'hippocampe dorsal (n = 6/groupe). 194

Figure 73 : Expression des gènes (RT-qPCR) liés à l'activité neuronale (c-fos et Egr1/Zif268) dans l'Hip dorsal chez les 3 groupes d'âge : "Ados" (A), "Adultes" (B) et "Agés" (C) étudiée par RT-qPCR. 200

Figure 74 : Expression des gènes de l'activité neuronale (c-fos et Egr1/Zif268) dans le CPFm chez les 3 groupes d'âge : "Ados" (A), "Adultes" (B) et "Agés" (C). 202

Figure 75 : Gènes communs surexprimés (A) ou sous-exprimés (B) après un apprentissage chez les trois groupes (Témoins, Sham et RF) dans l'Hip dorsal chez les rats "Adultes". 205

Figure 76 : Relation fonctionnelle entre les 500 gènes les plus surexprimés par l'apprentissage, dans l'Hip dorsal (groupe Sham) chez l'Adulte. 206

Figure 77 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 500 gènes surexprimés issus de la comparaison "Appr-Sham vs HC-Sham" chez l'Adulte. 206

Figure 78 : Relation fonctionnelle entre les 500 gènes les plus sous-exprimés par l'apprentissage, dans l'Hip dorsal (groupe Sham) du rat "Adulte". 207

Figure 79 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 500 gènes sous-exprimés issus de la comparaison "Appr-Sham vs HC-Sham" chez le rat "Adulte". 208

Figure 80 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 500 gènes surexprimés pour le groupe Témoin (A), Sham (B), et RF (C) dans le CPFm chez le rat "Adulte". 209

Figure 81 : Gènes communs surexprimés (A) ou sous-exprimés (B) après un apprentissage chez les trois groupes (Témoins, Sham et RF) dans le CPFm chez les rats "Adultes". . 210

Figure 82 : Relation fonctionnelle entre des 418 gènes surexprimés communs entre les trois groupes après l'apprentissage, dans le CPFm chez le rat Adulte. 211

Figure 83 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 418 gènes surexprimés communs entre les trois groupes après l'apprentissage. 211

Figure 84 : Evaluation du ratio dorsal/ventral dans l'Hip dorsal. 233

Figure 85 : Comparaison entre les 347 gènes surexprimés ("HC-RF vs HC-Sham") et les 500 gènes les plus surexprimés ("Appr-Sham vs HC-Sham"). 236

Figure 86 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 200 gènes communs surexprimés chez les RF en "Basal" et chez les Sham après l'apprentissage. 236

Figure 87 : Comparaison entre les 347 gènes surexprimés ("HC-RF vs HC-Sham") et les 261 gènes sous-exprimés ("LT-Appr-RF vs LT-Appr-Sham"). 239

Figure 87 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale pour les groupes G1 à G4 : récente (1 jour) et ancienne (25 jours). 248

Figure 88 : Pièce de la piscine de Morris avec les indices classiques(A) et les nouveaux indices (B). 249

Figure 89 : Nouveaux groupes de rats de 4-5 mois et 9-10 mois pour la seconde expérience de mise en point du protocole en piscine de Morris. 251

Figure 90 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale pour les groupes G5 à G10 : récente (1 jour) et ancienne (25 jours). 252

Figure 91 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Ados". 256

Figure 92 : Evolution du poids après l'exposition pour les deux lots de rats "Ados". 257

Figure 93 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "adultes". 259

Figure 94 : Evolution du poids après l'exposition pour les deux lots de rats "Adultes". 260

Figure 95 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Agés". 261

Figure 96 : Evolution du poids après l'exposition pour le premier lot de rats "Agés". 263

Figure 97 : Nombre de redressements et de toilettages pour le groupe des "Ados" 277

Figure 98 : Nombre de redressements et de toilettages pour le groupe des "Agés"..... 278

Figure 99 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale : récente (1 jour) et ancienne (25 jours)..... 279

Tableau 1 : Mortalité et survie pour les trois groupes d'âge (Ados, Adultes et Agés). 129

Tableau 2 : Nombre de gènes significativement modulés sur 18 échantillons dans l'hippocampe dorsal. 166

Tableau 3: Nombre de gènes significativement modulés sur 15 échantillons dans l'hippocampe dorsal. 167

Tableau 4 : Nombre de gènes significativement modulés sur 15 échantillons dans l'hippocampe dorsal avec des critères de significativité plus restrictifs. 168

Tableau 5 : Tableau des gènes modulés, dans l'hippocampe dorsal, en basal..... 169

Tableau 6 : Tableau des gènes modulés, dans l'hippocampe dorsal, pendant l'apprentissage. 171

Tableau 7 : Tableau des gènes surexprimés pendant l'apprentissage pour la comparaison RF vs Sham. 172

Tableau 8 : Nombre de gènes significativement modulés dans le CPFm sur 18 échantillons. 177

Tableau 9 : Nombre de gènes significativement modulés dans le CPFm sur 18 échantillons. 177

Tableau 10 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm, en condition "Basal"..... 178

Tableau 11 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm, pendant l'apprentissage. 180

Tableau 12 : Tableau des gènes surexprimés pendant l'apprentissage pour la comparaison "Appr-RF vs Appr-Sham". 181

Tableau 13 : Nombre de gènes significativement modulés sur 18 échantillons du CPFm en condition 2 (long terme). 185

Tableau 14 : Nombre de gènes significativement modulés sur 15 échantillons du CPFm en condition 2 (long terme). 185

Tableau 15 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm, en basal (persistance des effets des RF)..... 186

Tableau 16 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm (effet des RF à long terme après un apprentissage). 187

Tableau 17 : Tableau des gènes sous-exprimés après un apprentissage (effets à long terme) pour la comparaison "RF vs Témoin". 188

Tableau 18 : Gènes pré-sélectionnés (A) et définitivement sélectionnés (B) pour les validations par RT-qPCR dans l'hippocampe dorsal. 191

Tableau 19 : Gènes pré-sélectionnés (A) et définitivement sélectionnés (B) pour les validations par RT-qPCR dans le CPFm en conditions "Basal" et "Apprentissage". 192

Tableau 20 : Gènes définitivement sélectionnés pour les validations par RT-qPCR dans le CPFm en condition 2 (effets à long terme). 193

Tableau 21 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage dans le CPFm en condition "Basal (HC)" et "Apprentissage (Appr)" chez le groupe "Adultes". 195

Tableau 22 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage dans le CPFm en condition "Basal (LT-HC)" et "Apprentissage (LT-Appr) chez le groupe "Adultes". 196

Tableau 23 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage dans l'Hip dorsal en condition "Basal (HC)" et "Apprentissage (Appr)" chez les rats des groupes "Ados" et les "Agés". 197

Tableau 24 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage des rats "Adultes" dans le CPFm en condition "Basal (HC)" et "Apprentissage (Appr)" chez les rats "Ados" et les "Agés" 198

Tableau 25 : Bilan des gènes modulés par l'apprentissage observés en RNA-seq pour l'Hip dorsal et le CPFm chez l'Adulte. 204

Tableau 26 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Ados", le matin. 265

Tableau 27 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Ados", l'après-midi. 267

Tableau 28 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Adultes", le matin. 269

Tableau 29 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Adultes", l'après-midi. 270

Tableau 30 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Agés", le matin. 272

Tableau 31 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Agés", l'après-midi. 273

Tableau 32 : Résumé des différentes pathologies observées avec le traitement tenté ou réalisé ainsi que les résultats de l'autopsie. 275

Tableau 33 : Pathologies rencontrées chez les rats "Agés". 276

Publications

Bonelli-Salvadori A, Klein MM, Cosquer B, Kuster N, Capstick M, Boutillier AL, Pereira de Vasconcelos A. Effects of chronic radiofrequency electromagnetic fields on spatial memory and genetic/epigenetic regulations in the Rat at various ages. *Scientific Report.*

Article en cours d'écriture

Aurélie Bonelli-Salvadori, Sophie Reibel-Foisset, Brigitte Cosquer, Monique Majchrzak, Anne Pereira de Vasconcelos

Article sur le bien-être animal, avec des données physiologiques et d'observation des pathologies liées à l'âge sur une partie des rats Long Evans mâles. *STAL*

Article en cours d'écriture

Posters

Salvadori A, Klein MM, Cassel JC, Kuster N, Capstick M, Boutillier AL, Pereira de Vasconcelos A. *Sensibilité aux ondes électromagnétiques (4G) du cerveau de rat à différents âges : persistance d'un souvenir spatial et mécanismes épigénétiques associés.* Rencontre doctorants-masters, doctoneuro (Strasbourg) : 16 septembre 2016 (présentation du poster).

Salvadori A, Klein MM, Capstick M, Boutillier AL, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A. *Electromagnetic fields and recent vs. remote spatial memory in young and adult rats.* Congrès de la société française des Neurosciences, NeuroFrance 2017 (Bordeaux, France), 17-19 Mai 2017 (présentation du poster).

Pereira de Vasconcelos A, Salvadori A, Klein MM, Capstick M, Kuster N, Cassel JC, Boutillier AL. *Electromagnetic fields and recent vs. remote memory in young, adult and aged rat.***,** 47th congrès de l'European Behavior and Brain Society (EBBS, Bilbao, Espagne), 8-11 septembre 2017 (participation au poster**).**

Pereira de Vasconcelos A, Salvadori A, Klein MM, Cosquer B, Kuster N, Capstick M, Boutillier AL *Brain sensitivity to electromagnetic fields (4G) at various ages in the Rat: memory persistence and associated genetic mechanisms***.** BioEMS Joint Meeting (Portoroz, Slovénie), 24-29 juin 2018 (participation au poster).

Bonelli-Salvadori A, Klein MM, Cosquer B, Capstick M, Boutillier AL, Pereira de Vasconcelos A. *Electromagnetic fields and spatial memory in adult rats: behavior and biomolecular approaches***.** 11th FENS Forum of Neurosciences (Berlin, Allemagne), 7-11 Juillet 2018 (présentation du poster).

Liste des abréviations

µT	microtesla
1G	1ère génération
2G	2ème génération
3G	3ème génération
4G	4ème génération
5G	5ème génération
AchE	Acétylcholine estérase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique/ desoxyribonucleic acid
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AP-1	Activator Protein 1
Appr	Apprentissage
ARC	Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein
ARNm	Acide Ribonucléique messager
Asp	Acide aspartique
ATF	Activating Transcription Factor
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
c	Vitesse de la lumière
CA	Corne d'Ammon
CaM	Calmoduline
CaMK	Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase
CaMKII	Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II
CBP	CREB-binding protein (également appelée CREBBP (cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein) ou KAT3A)
CCA	Cortex Cingulaire Antérieur
CDMA	Code Division Multiple Access
CE	Commission européenne

CEM	Champ ElectroMagnétique
CENELEC	Comité Européen de Normalisation ELEctrotechnique
C-G	Dimère Cytosine-Guanine (aussi appelés îlots CpG)
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation ou immunoprécipitation de la chromatine
CM	Champ magnétique
Cp	Capacité calorifique spécifique
CPFm	Cortex PréFrontal médian
CRE	cAMP Response Elements
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
CREM	cAMP Response Elements Modulator
CSP	Nanosphère de carbone
CTPB	N-(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)-2-ethoxybenzamide
DAG	Diacylglycérol
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DAS	Débit d'Absorption Spécifique/Specific Absorption Rate (SAR en anglais)
DAVID	database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DLT	Dépression à Long Terme
DNMT	DNA Méthyltransférase
DPE	Downstream Promotor Element
E	Champ électrique
EDGE	Enhanced Data rates for GSM Evolution
EEG	Electroencéphalogramme
Egr	Early growth response
Elk-1	E twenty-six-like transcription factor
EM	Electromagnétique
EPM	Elevated Plus Maze ou labyrinthe en croix surélevé
ERK	Extracellular signal Regulated protein Kinase
F	Fréquence
FDTD	Finite Difference Time Domain
FT	Facteur de Transcription
GAP	GTPase-Activating Protein
GCN5	General Control of amino acid synthesis 5
GD	Gyrus Denté

GEF	Guanyl nucleotide Exchange Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GHz	GigaHertz
Glu	Glutamate
Gly	Glycine
GNAT	Gen5-related N-acetyltransferase
GPRS	General Packet Radio Service
GPS	Global Positioning System
H	Histone
HC	Home Cage
HDAC	Histone déAcétylase
HDTV	Télévision en haute qualité
Hip	Hippocampe
HSC	Heat Shock Chaperonne
HSP	Heat Shock Protein
Hz	Hertz
IBiD	Interferon response-Binding Domain
ICNIRP	International commission on non-ionizing radiation protection/Commission internationale de protection contre les rayonnements non ionisants
IEEE	Institute of Electrical and Electronics Engineers
IEG	Immediate Early Gene
iGluR	ionotropic Glutamate Receptor
IL	Cortex Infralimbique
IL-1β	InterLeukine 1 β
IP	IntraPéritonéale
IP3	Inositol-triphosphate
IRM	Imagerie à Résonnance Magnétique
K	Résidu lysine
kbps	kilobits par seconde
kDa	KiloDalton
kH	KiloHertz
KO	Knock-Out

LPS	Lipopolysaccharide
LTE	Long Term Evolution
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCT	Mémoire à Court Terme
MDA	Malonedialdéhyde
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MEK	MAPK/ERK Kinase
mGluR	metabotropic Glutamate Receptor
MHz	MégaHertz
mkp-1	mitogen-activated protein kinase phosphatase-1
MLT	Mémoire à Long Terme
MMS	Multimedia Messaging Service
MRE	MEF2 binding site
N1	Onde négative associée à la phase de traitement auditif précoce lors d'une surveillance EEG
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
nm	Nanomètre
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NT	Neurotrophine
OF	Open Field ou champ ouvert
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P1	Onde positive associée à la discrimination auditive lors d'une surveillance EEG
P300	Adenovirus early region 1A (également appelée E1A)
PCAF	p300/CBP-Associated Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET Scan	Positron-Emission Tomography scan
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIC	Picrotoxine
PK	Protéine Kinase
PL	Cortex Prélimbique

PLCγ	Phospholipase C γ
PLT	Potentialisation à Long Terme
PP	Protéine Phosphatase
R	Arginine
RF	Radiofréquence
RT-qPCR	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
S	Densité de puissance ou puissance volumique
SAM	S-adénosylméthionine
SARE	Synaptic-Activity Responsive Element
SCENIHR	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks / Comité scientifique sur les risques émergents et nouveaux
Seq	Sequencing
SIM	Subscriber Identity Module
SMS	Short Message Service
SNC	Système Nerveux Central
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum-Response Factor
T	Tesla
TCF	Ternary Complex Factor
TDMA	Time Division Multiple Access (téléphonie japonaise)
TFIIB	B recognition element
TNT	Télévision Numérique Terrestre
TR	Temps de Réaction
TRE	Tetradecanoyl phorbol acetate Response Element
TrkB	Tropomyosin-related kinase B
UMTS	Universal Mobile Telecommunications System
V	Volt
VGAT	Vesicular GABA Transporter
VGLUT1	Vesicular Glutamate Transporter
W	Watt
WB	Western Blot
W-CDMA	Wideband Code Division Multiple Access
WT	Wild Type

Y	Tyrosine
Z	Impédance caractéristique du milieu
γ	Masse volumique (exprimée en kg/m3)
λ	Longueur d'onde
ρ	Rayonnement gamma
σ	Conductivité

Glossaire

ARCEP : Autorité de régulation des communications électroniques et des postes.

Barrière hémato-encéphalique : Interface entre le sang et le tissu cérébral, permettant de protéger ce dernier d'agents potentiellement neurotoxiques.

Capacité calorifique spécifique : Quantité de chaleur fournie pour élever la température d'1°C.

Cellules de bordure : Neurones qui s'activent à proximité d'une paroi ou à la limite de l'environnement

Cellules de grille : Neurones qui s'activent en plusieurs points de l'environnement (formant une grille).

Cellules de lieu : "Neurones codant pour un endroit précis de l'espace et dont l'activité dépend de la position de l'animal dans son environnement" (J. O'Keefe et Dostro*v*sky 1971).

Cellules d'orientation de la tête : Population de neurones qui ne s'activent que lorsque la tête de l'animal bouge.

Champ électrique : Correspond à une force qui s'exerce sur une charge électrique (ex : ion, électron).

Champ électromagnétique : Correspond à l'influence, à distance, que peut exercer un objet sur son environnement (Maxwell 1865).

Champ magnétique : Force qui s'exerce sur une masse magnétique (ex : aimant) ou sur une charge électrique en mouvement. L'intensité du champ magnétique s'exprime en ampère par mètre (A/m).

***Chunk* :** Unité structurée de découpage de l'information intervenant dans la mise en mémoire à court terme.

Conductivité : 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

Connexion extrinsèque : Communication entre plusieurs régions cérébrales.

Connexion intrinsèque : Communication entre des sous-parties d'une même région cérébrale.

Consolidation synaptique : Processus de consolidation s'appuyant sur la synthèse de protéines et la création de nouvelles connexions synaptiques.

Consolidation systémique : Processus de consolidation s'appuyant sur des réorganisations structurelles et fonctionnelles des circuits neuronaux

Dépression à long terme : Désensibilisation de la synapse induisant une diminution des échanges au niveau de la jonction synaptique.

Dosimétrie : Mesure du dépôt d'énergie dans une matière traversée par un rayonnement.

Euchromatine : Forme très ouverte de la chromatine permettant la transcription des gènes.

Habituation : Phénomène lié à une diminution de l'intensité d'une réponse à la suite d'un stimulus répété ou prolongé.

Hétérochromatine : Forme très fermée de la chromatine dont le niveau de compaction empêche la transcription des gènes.

Informations allocentriques : Repères spatiaux (visuels, olfactifs, tactiles et auditifs) reliés entre eux afin de former un réseau sous forme de carte cognitive, soit une représentation/un codage de l'environnement.

Informations égocentriques : Informations centrées sur l'individu et notamment sur la position et le déplacement de son propre corps.

Mémoire à court terme : Mémoire permettant de retenir un faible nombre d'informations pendant un délai court (quelques minutes).

Mémoire à long terme : Stockage des informations de plusieurs jours jusqu'à plusieurs années, voire toute la vie.

Mémoire de travail : Forme de mémoire à court terme.

Mémoire épisodique : Ensemble des souvenirs issus des expériences personnelles d'un individu.

Mémoire explicite ou déclarative : Stockage et récupération des informations dont un individu se rappelle consciemment et exprime par le langage.

Mémoire procédurale (ou mémoire des habiletés) : Permet le rappel des savoir-faire et des automatismes, comme par exemple faire du vélo ou conduire une voiture, mais aussi les routines cognitives.

Mémoire sémantique : Ensemble des souvenirs concernant les connaissances générales comme les règles de calculs mathématiques, les conjugaisons ou encore les grandes villes de France.

Mémoire sensorielle : Première étape, extrêmement courte (moins d'une seconde) pour l'encodage d'une information.

Mémoire spatiale : Mémoire des lieux, des espaces, ou encore des parcours que l'on apprend pour nous déplacer.

Mémoire spatiale de référence : Stockage à long terme des informations spatiales.

Mémoire : Ensemble des activités mentales qui permettent d'enregistrer, de stocker et de se rappeler des informations passées.

Nucléosome : Octamère d'histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4) autour duquel s'enroulent 146 paires de base d'ADN

Onde électromagnétique : Variation de champs magnétique et électrique dans le temps, pouvant ainsi se propager dans le vide ou dans l'air.

Permittivité : Capacité d'un matériau à transformer l'énergie électromagnétique en énergie de frottement ou énergie thermique (polarisation).

Phénomène d'amorçage : Faculté à rappeler un souvenir en fonction d'une information stockée précédemment.

Potentialisation à long terme : Facilitation des échanges au niveau de la fente synaptique entre les éléments pré- et post-synaptiques.

Radiofréquences (8,3 KHz à 300 GHz) : Domaine le plus vaste du spectre électromagnétique, avec des longueurs d'onde de quelques centimètres à plusieurs kilomètres. Elles peuvent être naturelles (soleil, attraction terrestre, orages, ...) ou artificielles (radio, télévision, téléphone, système d'alarme, ...).

Rayonnements ionisants : Radiations dont l'énergie est suffisante pour arracher des électrons à la matière, comme les rayonnements gamma (γ) et les rayons X.

Rayonnements non-ionisants : Rayonnements dont l'énergie n'est pas suffisante pour provoquer des modifications des molécules et produire une ionisation directe.

Sensibilisation : Phénomène entrainant une augmentation de la réponse après un stimulus récurrent.

Spectre électromagnétique : Fréquences de quelques Hz à 1018 GHz pour des longueurs d'onde de plusieurs milliers de km à quelques dixièmes de µm. Il permet de séparer deux grands types de rayonnements ionisants et non-ionisants.

Thigmotaxie : Temps passé le long des parois.

Introduction

Introduction générale

Depuis l'utilisation du premier téléphone mobile en 1973 par l'ingénieur Martin Cooper, le téléphone portable n'a cessé d'évoluer et sa commercialisation d'augmenter.

En effet, le nombre de cartes Subscriber Identity Module (SIM), et donc de lignes téléphoniques portatives en service en France atteignait, en juin 2018, 75 millions. Le réseau mobile de 3ème génération (3G) est encore très utilisé avec 57 millions d'utilisateurs, alors que la 4ème génération (4G) ne cesse de croitre et atteint les 43 millions mi-2018 (ARCEP 2018).

Cette croissance importante de l'utilisation de téléphones portables s'accompagne de nombreuses préoccupations liées à la santé des utilisateurs à tout âge. Des précautions d'utilisation ainsi que la modification des normes d'exposition sont alors mises en place par les pouvoirs publics.

Afin de veiller à ces normes et à leur respect, il existe de nombreuses organisations sur le plan national et international : l'*International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP), l'Agence Nationale des Fréquences (ANFR), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la Commission Européenne (CE), l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), la communauté scientifique, les industriels, les médias, les consommateurs et les gouvernements.

Le principal sujet sensible, qui inquiète les consommateurs, est l'impact de ces ondes électromagnétiques sur leur santé, quel que soit leur 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).

C'est sur cet enjeu de santé publique que sera développée ma thèse, et plus précisément sur l'impact des radiofréquences, représentant une partie des ondes électromagnétiques, sur le cerveau et plus précisément sur la mémoire spatiale chez le rat. L'influence de l'âge sera également étudiée par l'utilisation d'animaux d'âges différents.

Au cours de ce manuscrit, nous ferons, dans une première partie, l'état de la littérature actuelle des radiofréquences tout en définissant les termes utilisés pour les caractériser. Puis,

après avoir parcouru les différents types de mémoire et leurs particularités, nous nous intéresserons à leur versant moléculaire en posant les bases de la transcription et sa régulation. Enfin, dans un dernier chapitre, nous ferons un résumé des travaux de la littérature sur les effets des radiofréquences sur le comportement et la mémoire, ainsi que l'expression des gènes et des protéines cérébrales. Une seconde et une troisième partie présenteront les méthodes utilisées lors de cette thèse et les résultats qui seront discutés dans une dernière partie incluant le développement des hypothèses. Enfin, les dernières pages permettront de conclure sur l'intégralité du travail réalisé et d'avancer des perspectives sur la poursuite du sujet.

Chapitre 1 : Les radiofréquences

I. Généralités et physique des ondes électromagnétiques (EM)

I.1. Le champ électromagnétique (CEM)

Par définition, le champ électromagnétique correspond à l'influence, à distance, que peut exercer un objet sur son environnement (Maxwell 1865). Le CEM se compose d'un champ électrique et d'un champ magnétique qui sont intimement liés entre eux. Le champ électromagnétique est soit naturel, soit d'origine humaine (voir § ci-dessous). Ces deux champs, électrique et magnétique, se propagent dans l'espace de manière rectiligne et perpendiculaire l'un à l'autre, tout en transportant une certaine quantité d'énergie.

I.1.1. Le champ électrique (E)

Le champ électrique correspond à une force qui s'exerce sur une charge électrique (ex : ion, électron). Plus cette charge est importante, plus le champ est fort, par conséquent plus on s'en éloigne plus le champ est faible. L'intensité du champ électrique se caractérise par la tension en volt (V) par rapport à la distance de la source, ce qui se traduit par la formule suivante E = V/m.

I.1.2. Le champ magnétique (CM)

Le champ magnétique est une force qui s'exerce sur une masse magnétique (ex : aimant) ou sur une charge électrique en mouvement. L'intensité du champ magnétique s'exprime en ampère par mètre (A/m).

Cependant, dans l'usage courant, l'unité de mesure utilisée est le tesla (T) et le plus souvent sa sous-unité le microtesla (µT). Dans l'air, comme dans la plupart des milieux, 1 A/m = 1,25 µT.

I.2. Caractérisation d'une onde électromagnétique

Une onde électromagnétique est une variation de champs magnétique et électrique dans le temps (Figure 1), pouvant ainsi se propager dans le vide ou dans l'air. La vitesse de propagation des ondes dépend donc du milieu dans lequel elles se déplacent.

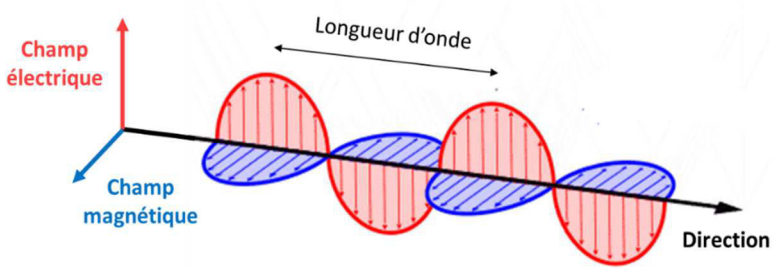


Figure 1 : Représentation schématique d'une onde électromagnétique. *(Adapté de https://www.researchgate.net/post/How_electromagnetic_fields_are_generated)*

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

I.2.1. La fréquence, période et longueur d'onde

Les variations d'intensité d'un CEM présentent un caractère répétitif avec des cycles d'une durée constante ; la fréquence est le nombre de fois qu'un cycle ou oscillation se produit pendant 1 seconde. Elle s'exprime en hertz (Hz) et se note f. Pendant un cycle, l'onde parcourt une distance que l'on appelle longueur d'onde exprimée en nanomètre (nm) et notée λ. Cette dernière et la fréquence sont liées par la vitesse de propagation du milieu. Dans le vide, la fréquence respecte donc l'équation suivante, avec la vitesse de la lumière (c) en km/s :

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

Par conséquent, plus la longueur d'onde est petite, plus la fréquence est élevée et inversement.

I.2.2. Intensité et densité de puissance

L'intensité du champ électrique (E), comme décrite précédemment, est exprimée en V/m. Elle est liée à la densité de puissance S également appelée puissance volumique ; elle correspond à la quantité de puissance emmagasinable par un système physique donné, divisée par le volume de ce système. Elle est exprimée en watts par mètre carré (W/m²), par la formule : S =E²/377 où 377 est l'impédance dans l'air en Ohm. La puissance globale contenue dans le champ électromagnétique s'exprime quant à elle en W. Elle représente la quantité d'énergie fournie en un temps donné. Quand il existe une relation de proportionnalité entre les 2 composantes électrique et magnétique du CEM (soit quand la distance est grande par rapport à la source d'émission, que les composantes E et CM du CEM sont perpendiculaires et donc que l'onde est plane, Figure 1), alors ces 2 composantes sont liées par la relation de

proportionnalité E/CM = Z, où Z est l'impédance caractéristique du milieu. On exprime ainsi l'intensité du CEM par celle de son champ électrique en V/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.

I.3. Le spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique regroupe des fréquences de 0 Hz à 10^{18} GHz pour des longueurs d'onde de plusieurs milliers de km à quelques dixièmes de µm. Il permet de séparer deux grands types de rayonnements ionisants et non-ionisants (Figure 2).

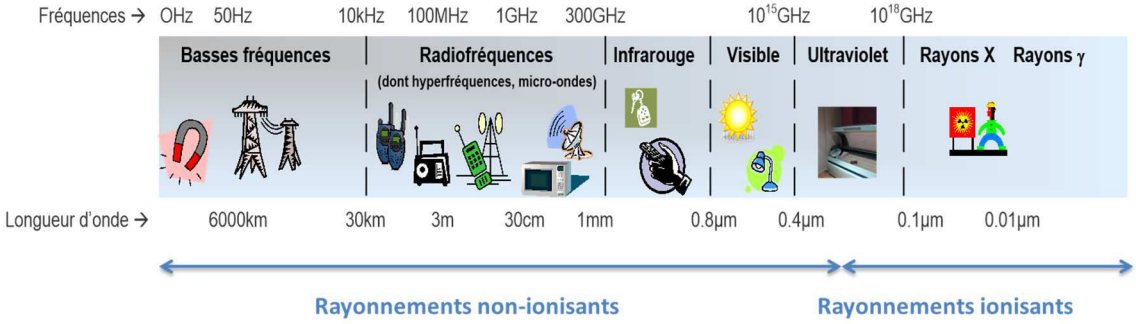


Figure 2 : Spectre électromagnétique (ANSES 2013).

I.3.1. Rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants sont des radiations dont l'énergie est suffisante pour arracher des électrons à la matière, comme les rayonnements gamma (γ) et les rayons X. Ils sont caractérisés par des fréquences très élevées et des longueurs d'onde par conséquent très faibles.

Les rayonnements γ sont la conséquence de radiations émises par des éléments radioactifs. Pouvant facilement traverser la matière, ils sont dangereux pour les cellules vivantes. Leur application reste donc principalement dans le domaine de la physique nucléaire. 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 très énergétiques. Ils traversent plus ou moins aisément les corps matériels et cellulaires. Ils sont très utilisés en médecine pour les radiographies. Les rayons X ont des longueurs comprises entre 10^{-12} m et 10^{-8} m.

I.3.2. Rayonnements non-ionisants

Les champs électromagnétiques non-ionisants constituent les rayonnements dont l'énergie n'est pas suffisante pour provoquer des modifications des molécules et produire une ionisation directe.

Les rayons ultraviolets sont considérés en partie comme non-ionisants, cependant, ils sont assez énergétiques, pouvant être ainsi nocifs pour la peau. La majorité d'entre eux sont stoppés par la couche d'ozone atmosphérique, qui agit comme un protecteur naturel pour les cellules. Leur fréquence est comprise entre 10^{15} et 10^{18} GHz et leur longueur d'onde entre 10^{-8} et 4.10^{-7} m.

Entre 8.10^{-7} et 4.10^{-7} m, se trouve le domaine du visible, c'est-à-dire la seule partie du spectre électromagnétique que l'œil humain peut percevoir. Entre 4.10^{5} et $7{,}7.10^{5}$ GHz, on peut distinguer toutes les couleurs, du bleu au rouge (arc-en-ciel).

L'infrarouge est compris entre les longueurs d'ondes 8.10^{-7} et 10^{-3} m, avec des fréquences allant de 3.10^{2} et 4.10^{5} GHz. Ce rayonnement possède toutes les propriétés de la lumière (propagation, réflexion, réfraction, diffusion, …) mais fait partie du domaine invisible pour l'œil humain.

En descendant dans les fréquences, on trouve les radiofréquences (8,3 KHz à 300 GHz) dont le domaine est le plus vaste du spectre électromagnétique (Union Internationale des Télécommunications UIT 2012). Avec des longueurs d'onde de quelques centimètres à plusieurs kilomètres, les radiofréquences englobent les ondes de la téléphonie mobile et les ondes radios pour la transmission de l'information (radio, télévision, téléphone) dans les gammes de fréquences 8,3 kHz à 6 GHz.

Enfin, en-dessous de 3 kHz et avec des longueurs d'ondes supérieures à 30 km, on a les basses fréquences (ex : antennes relais et réseaux électriques).

II. Les radiofréquences (RF) : la téléphonie mobile

II.1. Généralités

Les radiofréquences sont divisées en deux groupes : celles qui sont naturelles, ne dépendant pas de l'influence humaine, et les autres dites artificielles, qui découlent de l'Homme et de ses besoins et développements technologiques.

Dans le groupe des RF naturelles, on retrouve le champ magnétique statique terrestre, mais aussi les rayonnements de la Terre, du Soleil ou de l'espace. A la différence des

radiofréquences artificielles, les sources naturelles ont un spectre très étendu et les signaux plus intenses restent majoritairement de nature impulsionnelle dont la durée est courte, cas de l'éclair.

Les radiofréquences artificielles sont utilisées depuis longtemps, au départ pour de la diffusion (radio et télévision) puis, avec le développement des technologies sans fil, pour la téléphonie mobile en France (2G [GSM 900 et 1800 MHz], 3G [UMTS, 900 et 2100 MHz], 4G [LTE, 700, 800, 1800 et 2600 MHz]), les réseaux internet (Wi-Fi, 2400 MHz) ou encore des connexions sans fil comme le Bluetooth. Au sein d'une maison, les sources de radiofréquences sont nombreuses et ne dépendent pas uniquement des nouvelles technologies numériques citées précédemment ; une ampoule basse consommation, un four micro-ondes ou encore des plaques à induction sont également des sources importantes émettrices de RF et contribuent donc au CEM de l'environnement. Contrairement à la nature plutôt impulsionnelle des RF naturelles, les signaux RF issus des technologies de l'information et de la communication sont modulés ou pulsés.

La téléphonie mobile s'insère dans les radiofréquences avec une fréquence comprise entre 800 kHz et 3 GHz en France.

II.2. Téléphonie mobile : évolution des réseaux

II.2.1. Fonctionnement du téléphone mobile

Le téléphone mobile se base sur un principe d'émission/réception pour transmettre la voix (ondes sonores) et la convertir en un signal analogique (signal variant de manière continue dans le temps). Pour une transmission sur le réseau, le signal est tout d'abord converti en signal numérique, qui varie de façon discontinue dans le temps. Cette conversion est faite directement au niveau du téléphone en mesurant l'amplitude du signal pour lui attribuer une valeur en bits (langage informatique de type binaire 0 ou 1). Lorsque le signal est numérique, il est transformé en ondes électromagnétiques *via* l'antenne du téléphone. Lors de l'émission et la réception de ces dernières, le téléphone transforme un signal électrique en onde électromagnétique et inversement. Ces ondes circulent entre le téléphone mobile et l'antenne relais la plus proche.

II.2.2. Le réseau cellulaire et les antennes relais

Le réseau cellulaire est représenté en "cellules" ou "nid d'abeilles". Chaque cellule est entourée par 6 autres cellules (Figure 3). Lorsque le nombre d'utilisateurs est important sur une surface donnée, la taille des cellules diminue afin d'augmenter leur nombre (ex : les grandes villes). A l'inverse, lorsqu'il y a peu de consommateurs (ex : zone rurale), le nombre de cellules diminue mais leur taille augmente. Chaque cellule possède en son centre une antenne permettant la réception et l'envoi de données pour les téléphones mobiles. La disponibilité de la bande passante (gamme de fréquences pouvant être traitées par un système téléphonique) dépend donc du nombre d'utilisateurs utilisant l'antenne, ainsi que du nombre de communications en simultané. Ceci détermine le nombre d'antennes à installer dans une zone donnée. Les antennes principalement utilisées sont dites "macro-cellulaires". Ces dernières, également appelées "antennes panneaux" ont la forme d'un parallélépipède rectangle en position verticale. La taille et les performances de ces antennes dépendent du signal à émettre, par exemple pour un signal GSM de 900 MHz, la hauteur est comprise entre 1,5 et 3 m. Selon le signal, la puissance varie entre 1 et quelques dizaines de watts et la portée entre 1 et 10 m (Rapport "Antennes relais de téléphonie mobile", janvier 2017).

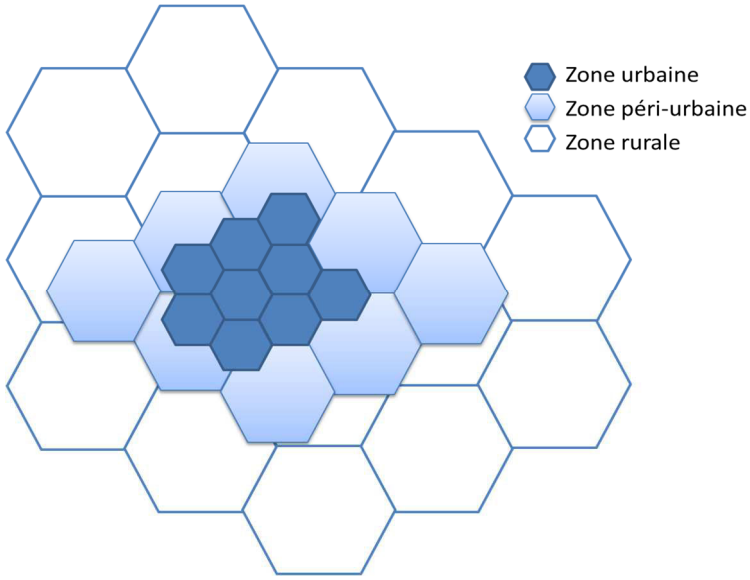


Figure 3 : Représentation schématique de la répartition du réseau cellulaire

(Adaptée de "champs électromagnétiques et téléphonie mobile" ISSEP 2003)

II.2.3. Evolution du réseau cellulaire : de la première (1G) à la quatrième génération (4G)

La première génération (1G) de téléphonie mobile est apparue au début des années 80s. Le signal est alors uniquement analogique et ne transmet que la voix *via* une fréquence de 150 MHz. De plus, il a une faible capacité, des liaisons vocales médiocres et surtout

aucune sécurité, car les appels passent par des tours radios, ils peuvent donc être interceptés par des tierces parties (Sahoo *et al.* 2014).

La deuxième génération (2G) apparait à la fin des années 80s et est toujours en cours. La transmission du signal devient numérique et passe d'une vitesse de 2,4 kbps (kilo bits par seconde) à 64 kbps dont les bandes passantes sont 900 MHz et 1800 MHz. Avec ce réseau GSM (Global System for Mobile Communication), on voit apparaitre la possibilité d'envoyer des messages écrits ou SMS (Short Message Service) dans un premier temps, puis des MMS (Multimedia Messaging Service) avec le développement amélioré de la 2G : appelée 2,5G. Cette génération intermédiaire entre la 2G et la 3G voit sa vitesse augmenter et passer à 144 kbps. De nouvelles technologies entrent alors en jeu telles que le GPRS (General Packet Radio Service) ou encore l'EDGE (Enhanced Data Rates for GSM Evolution), qui visent à augmenter le débit de transfert des données mobiles et ainsi se connecter à internet, *via* les données mobiles (Sahoo *et al.* 2014).

La troisième génération (3G) apparaît à la fin des années 90s. La vitesse de transmission dépasse les 100 kbps et peut atteindre 2 Mbps. Ce système cellulaire permet certes des communications plus rapides, mais également le visionnage de vidéos, émissions de télévision, la visiophonie ou encore le GPS (Global Positioning System). La 3G repose sur la technologie UMTS (Universal Mobile Telecommunications System) utilisant un codage W-CDMA (Wideband Code Division Multiple Access). Cette technique d'accès permet aux utilisateurs de se différencier par un code unique afin de retrouver leurs données au milieu de celles d'autres utilisateurs. Ainsi, pour un même opérateur, les fréquences des stations sont conservées. Le signal passe sur des bandes de 2100 MHz et plus récemment sur du 900 MHz, qui possède de meilleures propriétés de propagation des ondes radios, même à travers les bâtiments (Sahoo *et al.* 2014).

La quatrième génération (4G) est le réseau cellulaire le plus rapide actuellement avec une vitesse de 100 Mbps, pouvant atteindre 1 Gbps ponctuellement. Elle arrive en France au début des années 2010, on parlera alors de signal LTE pour Long Term Evolution. Cette technologie permet de réunir les conversations téléphoniques et internet et par conséquent ne divise plus le débit, garantissant ainsi un transfert de données de meilleure qualité. La possibilité de regarder la télévision en haute qualité (HDTV) est aussi une innovation depuis la 3G (Sahoo *et al.* 2014).

En France, la 4G utilise les fréquences de 2600 MHz, demandées pour cette nouvelle génération, et 800 MHz, libérées par l'arrêt de la télévision hertzienne analogique (remplacée par la Télévision Numérique Terrestre, TNT), mais aussi 700 et 1800 MHz.

Une **cinquième génération (5G)** est prévue pour 2020 en France avec un débit annoncé dix fois supérieur à celui de la 4G. D'après les premiers tests réalisés, la 5G pourra suivre chaque smartphone jusqu'à la lisière du périmètre, contrairement à la 4G où le signal décline lorsque l'on s'éloigne de l'antenne. Les fréquences proposées en France : les bandes 700 et 3500 MHz dans un premier temps (horizon 2022) (Sahoo *et al.* 2014).

III. Effets biologiques et mesures

III.1. Interaction entre les ondes EM et la matière vivante

De manière générale, une onde électromagnétique se divise en deux au contact de la matière. Une partie est réfléchie et ne traverse donc pas le tissu, la seconde, appelée onde transmise, pénètre à travers la matière. C'est cette dernière qui est le paramètre le plus significatif pour quantifier l'énergie dissipée au sein de la matière et qui serait *a priori* à l'origine d'effets biologiques.

La pénétration de l'onde ainsi que ses interactions avec le tissu dépendent de la gamme de fréquences de la longueur d'onde et des caractéristiques de la matière. Le rayonnement qui pénètre dans le tissu sera plus ou moins vite absorbé en fonction de la permittivité de la matière traversée. La permittivité relative ou constante diélectrique se définit par la capacité de polarisation du tissu et donc indirectement par sa capacité à transformer l'énergie électromagnétique reçue en énergie de frottement, et potentiellement en énergie thermique (rapport ANSES 2016).

De plus, l'angle de pénétration est également très important, car celui-ci changera à chaque fois qu'il rencontrera un nouveau composant du corps ; par exemple, entre la peau et les muscles ou entre les os et les muscles. Donc une fois que l'onde électromagnétique aura pénétré dans le corps, son comportement sera complexe suite à l'hétérogénéité des tissus (orientation et contenu en eau variables).

L'interaction entre le CEM et le corps humain est notamment dépendante de la fréquence. Si les fréquences sont basses (< 10 MHz), les effets biologiques seront principalement localisés au niveau des tissus excitables tels que le système cardiovasculaire,

les muscles et le système nerveux central. Ces tissus ont une géométrie très complexe pouvant accentuer la réflexion des ondes EM à l'intérieur de l'organe (Rapport OMS 2014).

A l'inverse, plus les fréquences sont hautes (à partir de 100 kHz) plus elles engendrent un échauffement des tissus avec une pénétration faible (travaux de l'ICNIRP). A l'échelle du tissu, il y a donc deux types d'effet : thermique et non thermique.

III.2. Distinction effets thermiques et non thermiques

III.2.1. Les effets thermiques

Ils apparaissent avec des CEM relativement intenses et typiquement pour des fréquences hautes, supérieures à 100 kHz (Israel *et al.* 2013). Ils sont bien connus et utilisés notamment en thérapeutique, comme le traitement du cancer (Yadamani *et al.* 2018). Par définition, un effet thermique est causé par un échauffement des tissus biologiques, de minimum 1°C chez l'Homme. Ce dernier est directement lié à la dissipation de l'énergie électromagnétique sous forme de chaleur au cours de son absorption à l'intérieur de la matière. Il devient mesurable lorsque la densité de puissance est supérieure à 500 W/m² et dépend de la teneur en eau des tissus : plus un tissu est riche en eau (muscles, peau), plus l'effet thermique est important.

Les lésions résultant de l'échauffement peuvent être localisées en surface mais aussi en profondeur, entrainant à ce moment un retard dans la perception des brûlures. Dans ce cas, une coagulation des protéines, des cataractes ou encore des lésions testiculaires peuvent être observées. Lorsque l'hyperthermie est globale, la personne peut déclencher des crises convulsives.

III.2.2. Les effets non thermiques

Le développement des nouvelles technologies dont la téléphonie mobile soulève de nouvelles questions sur leur impact au niveau de la santé. Ainsi, depuis plus de 30 ans, ces effets non thermiques (plus difficile à voir et identifier) sont au cœur des recherches sur les CEM.

Les effets non thermiques ou athermiques sont observés sur les systèmes, alors que la quantité d'énergie absorbée est trop faible (< 500 W/m²) pour induire une élévation de la température. Ils apparaissent à des niveaux d'exposition où le système de thermorégulation de l'organisme est capable de réguler la température et de dissiper l'éventuel échauffement (Israel *et al.* 2013).

Ces effets sont encore très mal connus, le plus souvent controversés dans une littérature très hétérogène et sont loin de faire l'unanimité chez les scientifiques. Plusieurs hypothèses attribueraient ces effets à des micro-échauffements locaux, des changements de conformation moléculaire, ou encore des perturbations enzymatiques. Ainsi, les principaux effets non thermiques seraient d'origine cellulaire (développement de cancer par exemple), endocriniens, immunologiques, neurobiologiques ou encore génotoxiques (apparition de lésions dans l'ADN). A ce jour, les téléphones mobiles, mais aussi le Wi-Fi, restent une source d'inquiétude de la population vis-à-vis de la santé, de par leur utilisation par un large public et surtout du manque de données cohérentes expliquant ces effets (Voir par exemple, rapports ANSES, 2013, 2016 ; Comité scientifique sur les risques émergents et nouveaux ou SCENIHR 2015).

III.3. Dosimétrie et réglementation

III.3.1. Définitions et généralités

La traversée de la matière par un rayonnement conduit à un dépôt d'énergie dans cette matière ; lorsque l'on mesure cette énergie, on parle de dosimétrie. Cette évaluation de l'exposition s'appuie sur deux grandeurs caractéristiques du champ électromagnétique : le champ électrique (E) et le débit d'absorption spécifique (DAS). En fonction de la distance par rapport à la source, plus on est proche de celle-ci, plus le calcul du champ électrique E (champ éloigné) est complexe, il faut alors avoir recours au DAS (champ proche).

Par conséquent, à une distance lointaine de la source de radiofréquences (ex : une antenne relais) on utilisera le champ électrique (E), exprimé en V/m. A l'inverse, à proximité de la source de radiofréquences (ex : téléphone mobile), on utilisera le DAS, exprimé en W/kg. Le DAS se calcule avec la formule suivante (Laval *et al.* 2000):

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

E^2 est le carré de la valeur du champ électrique, σ la conductivité et ρ la masse volumique (kg/m3) de l'élément en question.

De plus E est lié à l'échauffement ΔT, provoqué par le passage d'un courant et Cp la capacité calorifique spécifique (quantité de chaleur fournie pour élever la température d'1°C). On obtient alors cette équation :

$$E^2 = \frac{\Delta T}{\Delta t} . \frac{Cp . \rho}{\sigma}$$

Le débit d'absorption spécifique est donc proportionnel à une augmentation de la température de l'élément exposé, ce qui permet de calculer ce paramètre par la formule :

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

Ainsi, le DAS peut être évalué soit par mesure du champ électrique généré à la source, soit par mesure de l'échauffement émis par l'élément exposé.

III.3.2. Méthodes d'évaluation du DAS

La mesure du DAS de façon directe est complexe, car elle nécessite une sonde intrusive, ce qui est relativement compliqué chez les êtres vivants.

Le DAS ne peut être mesuré directement, il est donc estimé par des techniques de simulations numériques ou par mesures expérimentales.

L'approche numérique s'appuie sur une modélisation des tissus humain ou animal. Cependant, chaque système biologique est composé de plusieurs tissus dont les caractéristiques électromagnétiques telles que la permittivité (définie par la capacité de polarisation du matériau et donc sa capacité à transformer l'énergie électromagnétique en énergie de frottement ou énergie thermique) et la conductivité (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, (définitions issues du rapport enfants, ANSES 2016) sont très différentes, ce qui rend ces modèles très complexes. Le plus souvent ils sont réalisés à partir d'images d'IRM (Images à Résonnance Magnétique) (Simunic *et al.* 1996). Cependant, la méthode d'évaluation du DAS la plus utilisée est la 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), exemple avec la dosimétrie pour 900 et 1800 MHz chez deux modèles de rongeurs (Figure 4).

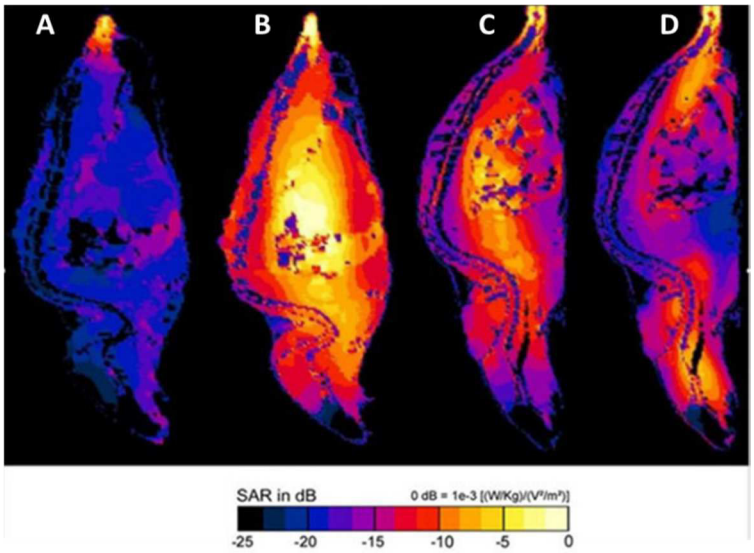


Figure 4 : Evaluation numérique du DAS chez la souris (A : 900 MHz, B : 1900 MHz) et chez le rat (C : 900 MHz, D : 1900 MHz), adapté d'après Capstick et al. 2017.

On peut visualiser sur ces animaux l'énergie absorbée et sa répartition sur le corps entier de l'animal grâce au gradient de couleur (énergie importante = couleur chaude), le DAS (ou SAR en anglais) pour les deux fréquences testées (900 et 1900 MHz).

La mesure du DAS est également réalisée chez l'Homme, au niveau de la tête, grâce au modèle SAM (Figure 5), mais aussi sur le corps entier, grâce par exemple à la famille développée par la fondation IT'IS (Figure 6).

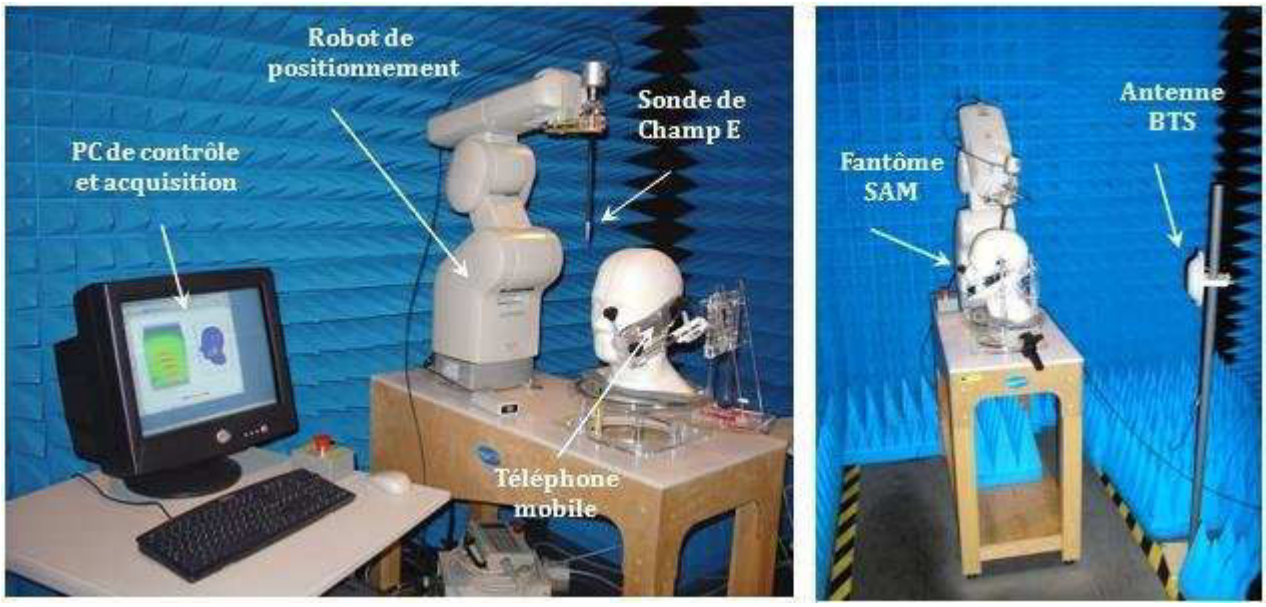


Figure 5 : Mesure du DAS chez l'Homme, grâce à un modèle SAM (pour une mesure à la tête).
Ce dispositif est constitué principalement d'un robot à six axes et un ou plusieurs modèles (tête ou corps). Le robot déplace une sonde qui mesure le champ électrique dans le liquide du fantôme. Un logiciel permet par la suite de récupérer les valeurs du champ électrique mesuré dans le liquide simulant le corps ou la tête et de calculer le DAS. Deux modèles de fantôme sont utilisés (Messaoudi et Aguili 2018).

L'approche expérimentale se base sur des modèles expérimentaux dit "fantômes ", c'est-à-dire représentatifs du corps humain (Figure 6) ou encore des animaux de laboratoire

(Figure 7) (Capstick *et al.* 2017). En effet, ces modèles sont fabriqués de manière à ce que les matériaux utilisés représentent au mieux les propriétés physico-chimiques du corps humain ou animal.

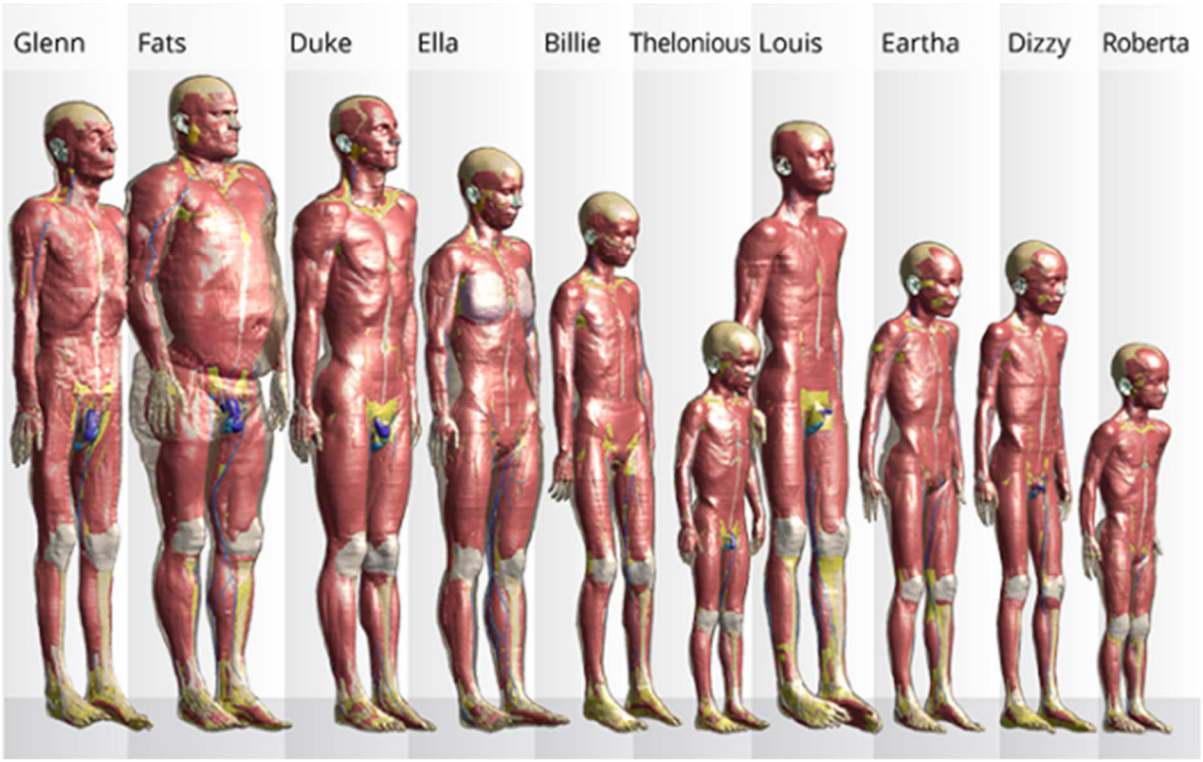


Figure 6 : Famille virtuelle, développée par IT'IS Foundation (Zurich, Suisse) pour une mesure numérique du DAS.
Cette famille fut créée sur la base d'images issues d'IRM chez des volontaires. Les différents membres de la famille sont représentatifs de la population, afin de mesurer le DAS en fonction de la taille, l'âge ou encore le poids (IT'IS Foundation).

Ils sont conçus pour rendre la mesure des champs électriques et des températures possibles. Cependant, ces mesures du DAS ne restent que des estimations du fait de la composition complexe des êtres vivants : peau, muscles, os, système sanguin, nerfs, etc. 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.

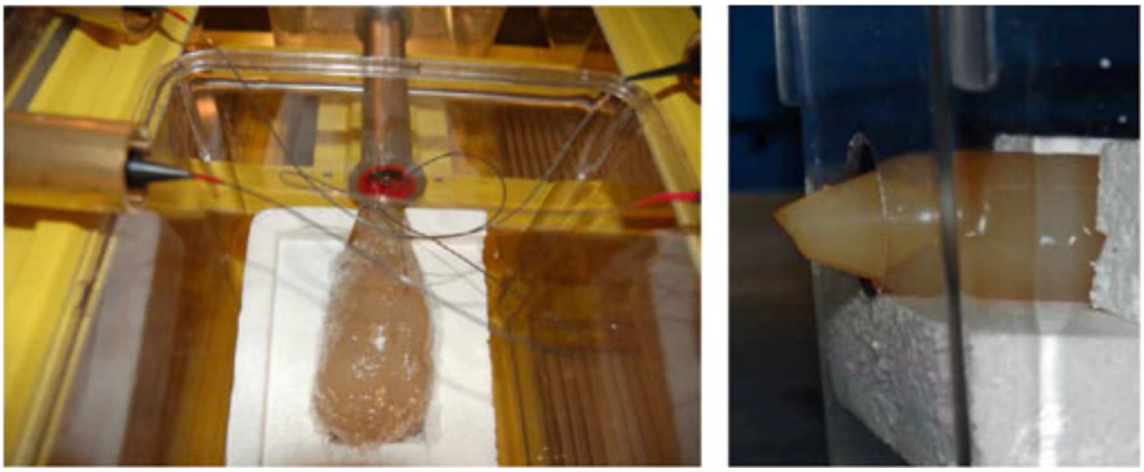


Figure 7 : Rat (gauche) et souris (droite) en gel pour l'étude des variations de température (d'après Capstick et al. 2017)

III.3.3. Normes et législation

En 1998, la Commission internationale de protection contre les rayonnements non ionisants (ICNIRP) propose des valeurs limites d'exposition des personnes aux champs électromagnétiques. Les scientifiques de cette commission évaluent les risques et effets à court terme (principalement des phénomènes d'échauffement des tissus) et y appliquent un facteur de sécurité de 50. Cette valeur 50 fois supérieure permet de couvrir les incertitudes et les erreurs scientifiques pouvant exister.

Ces limites de l'ICNIRP sont retenues au niveau européen dans la recommandation du conseil de l'Union Européenne le 12 juillet 1999 (1999/519/CE).

En exposition en champ lointain (environnement : les antennes) et concernant le champ électrique, les valeurs limites proposées dépendent du type de réseau cellulaire (2G, 3G ou 4G) et de la fréquence du signal (900 MHz ou 1800 MHz). Pour la 2G à 900 MHz, le seuil est de 41 V/m, alors qu'il atteint 58 V/m pour une fréquence de 1800 MHz. Pour la 3G (signal UMTS, 900 MHz) et la 4G (LTE, 2600 et 800 MHz) la limite autorisée est de 61 V/m.

Pour l'exposition en champ proche, le DAS, quant à lui, dépend de la partie du corps concernée. Pour les membres, le DAS local est limité à 4 W/kg, alors que pour la tête il est de 2 W/kg au maximum. Lorsque l'on considère le corps entier, sa valeur moyenne autorisée est de 0,08 W/kg.

Il faut cependant noter que ces seuils sont établis pour la population générale, ceux calculés pour les travailleurs sont légèrement supérieurs.

La recommandation européenne de 1999 est transposée dans le droit français par le décret n° 2002-775 du 3 mai 2002. Un arrêté d'octobre 2003 fixe les spécifications techniques applicables aux nouveaux équipements radioélectriques tels que les téléphones mobiles avec notamment un DAS ne pouvant pas dépasser les 2 W/kg au niveau de la tête.

Ces valeurs sont périodiquement discutées par le comité scientifique sur les risques émergents et nouveaux (SCENIHR), et n'ont pas été remis en cause lors des rapports de 2009 et 2015. Les travaux de l'ICNIRP proposant les nouvelles lignes directives pour l'exposition aux CEM (100kHZ- 300 GHz) sont actuellement en consultation publique jusqu'au 9 octobre 2018.

IV. Effets des RF sur le Système Nerveux Central (SNC)

Dans cette partie, nous aborderons quelques études représentatives des effets biologiques des RF au niveau du SNC de manière générale et non exhaustive qui montrent la grande hétérogénéité des travaux (types, durées d'exposition, espèces, tests réalisés variables) et des résultats obtenus chez l'Homme ou l'animal. Les effets des RF sur la mémoire et l'expression des gènes dans le cerveau seront abordés dans le chapitre 4.

IV.1. Sommeil et veille (étude par Electroencéphalogramme ou EEG)

L'EEG permet de mesurer l'activité électrique cérébrale et notamment les fluctuations du potentiel électrique ou ondes cérébrales. L'intensité de cette activité est caractérisée par la fréquence des ondes en Hz. On note aussi l'amplitude des ondes qui correspond à la puissance des impulsions électriques du cerveau. Il existe cinq familles d'ondes cérébrales : alpha, bêta, gamma, delta, et thêta.

Les **ondes alpha** se rapportent à l'état d'éveil mais relaxé, c'est-à-dire lorsque la personne est au repos avec les yeux fermés, mais consciente. Leurs fréquences sont basses (8-12 Hz) et leur amplitude faible (25 à 60 µV). Ces ondes disparaissent une fois les yeux ouverts. Les **ondes bêta** sont visibles en état d'éveil. Leurs fréquences sont plus élevées (12 à 30 Hz) mais d'amplitude basse (10 à 30 µV). La personne a donc les yeux ouverts et est attentive. Les **ondes gamma** se rapportent à un état d'hypervigilance ou lors d'exercices cérébraux comme des tâches de mémoire. Leurs fréquences dépassent les 40 Hz avec une amplitude comprise entre les ondes alpha et béta. Les **ondes delta** se rapportent à l'état de

sommeil lent et profond avec des mouvements oculaires rapides. Leurs fréquences sont très faibles (< 4 Hz), mais avec une forte amplitude (jusqu'à 200 µV). Les **ondes thêta** sont visibles dans l'état de demi-sommeil, permettant d'accéder au subconscient comme lors d'une séance d'hypnose et pendant le sommeil paradoxal (rêves). Leurs fréquences sont basses (4-8 Hz) mais de grande amplitude (50-100 µV) (van Rongen *et al.* 2009).

IV.1.1. Effet des RF sur le sommeil

Pendant le sommeil, l'EEG varie selon les différentes phases où l'on retrouve un type d'onde en particulier. Ainsi, pendant le sommeil paradoxal, on trouvera les ondes semblables à l'éveil (thêta) associées à des mouvements oculaires rapides. Pour le sommeil lent, on aura les ondes lentes delta et les spindles (11-16 Hz). Ces deux phases de 90 min se répètent tout au long de la nuit (environ 5 cycles).

L'impact des RF sur l'EEG de sommeil est étudié chez l'Homme comme chez l'animal. Chez le sujet sain (homme de 26 ans d'âge moyen), aucun effet des RF (900 MHz, < 100 W/m², DAS compris entre 0,3 et 0,6 W/kg), n'a été observé sur le sommeil, après une exposition de 8h (Wagner *et al.* 1998, 2000).

En 1999, Borbély et collaborateurs (Borbély *et al.* 1999) ont étudié le sommeil en exposant des sujets à un signal GSM (900 MHz et un DAS = 1 W/kg) en alternance 15 min "on" et 15 min "off" pendant une nuit de 8h. Ils ont montré une augmentation du temps de sommeil, un nombre réduit d'épisodes d'éveil après l'endormissement et des changements dans les spectres de puissance EEG, lors du premier épisode de sommeil lent de la nuit. De plus, l'augmentation maximale s'est produite dans les bandes de 10 ± 11 Hz et 13,5 ± 14 Hz pendant la partie initiale du sommeil.

Ces travaux ont été confirmés en partie par la même équipe (Huber *et al.* 2000) qui a observé, après une exposition aigüe (30 min, GSM 900 MHz DAS = 1 W/kg), une augmentation des ondes alpha. Cependant, ils n'ont montré aucune différence pour le temps d'endormissement, ni dans les stades de sommeil, ni dans l'éveil des sujets endormis. En 2003, ils ont confirmé ces résultats, avec la même exposition, mais de 3h avant le sommeil (Huber et al. 2003). En 2002 (Huber *et al.* 2002), ils ont montré, après une exposition à un signal modulé (identique à (Borbély *et al.* 1999), une augmentation de la bande des 12,25 – 13,5 Hz (lors de l'éveil).

Quant à Loughran et ses collaborateurs (Sarah P. Loughran *et al.* 2005), ils ont exposé des individus sains 30 min avec un signal GSM de 900 MHz (DAS = 0,11 W/kg) avec une

surveillance EEG sur une nuit de 8h. Ils ont mis en évidence une diminution de la latence du sommeil paradoxal, ainsi qu'une augmentation des ondes alpha, après l'endormissement. Quelques années plus tard, ils ont essayé de répliquer les expériences menées en 2005 (Sarah P. Loughran *et al.* 2012). Les mêmes volontaires de l'étude précédente ont de nouveau été exposés (dans les mêmes conditions qu'en 2005). Les auteurs ont alors mis en évidence des réponses individuelles variables à l'exposition dans la gamme de fréquences 11,5 - 12.25 Hz (onde alpha) en corrélation avec celles obtenues en 2005. Ils en ont conclu que les effets de l'exposition à un signal GSM de 900 MHz pouvaient différer d'un individu à l'autre. Cependant, ils restent constants et identiques chez un même individu.

Regel et ses collaborateurs (Regel, Tinguely, *et al.* 2007) ont étudié l'influence d'une exposition à un signal GSM de 900 MHz, avec un DAS de 0,2 W/kg et 5 W/kg, sur le sommeil et des tâches cognitives (voir paragraphe suivant sur la mémoire et l'EEG). Pour cela, ils ont exposé des sujets sains pendant 30 min avant de dormir. L'analyse de l'EEG pendant le sommeil a mis en évidence une augmentation de l'amplitude des fréquences 13,5 – 13,75 Hz sans mouvement oculaire avec le DAS de 5 W/kg. Ils ont conclu qu'il existe une relation entre l'intensité des CEM et leurs effets sur des changements dans l'EEG du sommeil.

En 2012, Schmid et collaborateurs (Schmid *et al.* 2012) ont mis en évidence une augmentation des puissances des ondes alpha, bêta, delta et thêta, sans affecter les différentes étapes du sommeil (macrostructure du sommeil) (900 MHz, DAS = 2 W/kg, pendant 30 min avant la nuit). En 2013, la même équipe (Lustenberger *et al.* 2013) a exposé des jeunes adultes à un signal modulé de 900 MHz avec un DAS de 1 W/kg (séquences de 18 min répétées sur les 8h de sommeil). Ils ont mis en évidence une augmentation de la puissance des ondes lentes (0,75 – 4,5 Hz) pendant l'exposition sans affecter les spindles qui pourraient être le reflet de modification de "renormalisation" de l'excitabilité corticale pendant le sommeil. En 2015, ils ont également montré une augmentation des ondes delta mais aussi des ondes thêta, sans différence dans les fréquences de ces ondes, après une exposition aigüe de 30 min avant la nuit (900 MHz, DAS = 2 W/kg) (Lustenberger *et al.* 2015). Enfin, contrairement aux données de Loughran, lors de 2 expositions chez le même sujet, la réponse EEG peut différer, montrant non seulement une variation inter-individus, mais également intra-individus.

Alors que chez le rat, Pelletier *et al.* (Pelletier *et al.* 2013) ont montré une augmentation de la durée totale du sommeil reflétant une augmentation du sommeil lent ainsi qu'une augmentation de la veille calme. Pour cela, ils ont exposé de jeunes rats mâles (3 semaines) à un signal de 900 MHz et un $DAS_{corps\ entier}$ compris entre 0,1 et 0,3 mW/kg,

23,5h/jour pendant 5 semaines. De manière intéressante, certains effets sont dépendants de la température ambiante (31°C) et ne sont pas observés à 28°C sauf pour le temps total de sommeil (24h).

Une autre étude menée chez le rat mâle (H.-J. Li *et al.* 2015) a montré, 14 jours après l'exposition (6 min, 2856 MHz, 5, 10, 20 ou 30 mW/cm²), une augmentation de l'amplitude et une diminution de la fréquence des ondes delta pour toutes les densités d'exposition. Ils ont tout de même noté que cette augmentation était plus importante pour le groupe de 30 mW/cm² par rapport aux autres groupes.

Plus récemment, la même équipe (Tan *et al.* 2017) a exposé des rats mâles pendant 6 min à différentes fréquences et densités (1500 ou 2856 MHz et 5 ou 10 mW/cm²). L'enregistrement de l'EEG est réalisé après une légère anesthésie, 7 jours après l'exposition. Ils ont montré qu'une seule exposition à un signal de 2856 MHz et 5 mW/cm² ne provoque aucun changement dans l'EEG. En revanche, une double exposition (2856 et 1500 MHz) à 5 mW/cm² a mis en évidence une diminution de la puissance de l'onde alpha, tout comme l'exposition à 10 mW/cm² (une seule exposition ou cumulée) qui montre une diminution de la puissance des ondes alpha, bêta et thêta.

IV.1.2. Effet des RF sur l'état de veille

Des études utilisant l'électro-encéphalogramme (EEG) ont été réalisées chez des hommes volontaires dès la fin des années 90s. Reiser *et al.* (Reiser *et al.* 1995) ont rapporté un effet des téléphones mobiles sur l'EEG de veille chez des volontaires sains après une exposition aiguë (un signal de 900 MHz pulsé à 217 Hz). Les auteurs ont observé une augmentation de la puissance de l'EEG dans les bandes de fréquences alpha et bêta dans la région occipitale, 15 min après l'exposition. Plus tard, Röschke et Mann (Röschke et Mann 1997) n'ont montré aucun changement au niveau de l'EEG en phase d'éveil chez des volontaires (hommes) exposés pendant 3,5 min à un signal RF 900 MHz (pulsé 217 MHz).

En 2000, Huber et collaborateurs (Huber *et al.* 2000) ont montré, après une exposition de 30 min (GSM 900 MHz, DAS = 1 W/kg), une diminution de la puissance de l'EEG de repos dans la gamme de fréquence de l'onde alpha (10,5 et 11 Hz). Dans leur étude de 2002 (Huber *et al.* 2002), ils ont confirmé ce résultat mais avec un signal modulé (15 min "on" et 15 min "off", 900 MHz, DAS = 1 W/kg).

Quant à Croft et ses collaborateurs (Rodney J. Croft *et al.* 2002), ils ont étudié l'effet d'un signal GSM de 900 MHz émis par un téléphone portable Nokia 5110 chez l'homme éveillé. Ils ont mis en évidence une augmentation de celle des ondes alpha (8 à 12 Hz).

Dans une étude de 2008, Croft et collaborateurs (R. J. Croft *et al.* 2008) ont exposé des hommes adultes à un téléphone GSM de 875 MHz avec un DAS = 0,11 W/kg, pendant 30 min. L'EEG a été enregistré au début et à la fin de l'exposition sur deux créneaux de 10 min. Ils ont observé une augmentation de la puissance des ondes alpha lors de l'exposition. Après l'exposition, les bandes alpha reviennent à la normale. Dans une étude plus récente, la même équipe (R. J. Croft *et al.* 2010) a étudié deux signaux différents (2G, 900 MHz, DAS = 0,7 W/kg, et 3G, 1900 MHz, DAS = 1,7 W/kg) et à des âges différents (adolescents, jeunes adultes, et âgés) pendant 50 min. Ils ont retrouvé l'augmentation de la puissance des ondes alpha avec une exposition à la 2G chez le jeune adulte, mais rien pour les autres groupes d'âge, ni avec une exposition à un signal 3G.

Vecchio et collaborateurs (Vecchio *et al.* 2007) ont évalué l'activité cérébrale par EEG chez des hommes volontaires, exposés au signal d'un téléphone GSM de 900 MHz (deux sessions de 45 min "on" et 45 min "off" séparées d'une semaine) et un DAS = 0,5 W/kg max. L'exposition a modifié la connectivité entre les deux hémisphères du cerveau au niveau des bandes alpha : elle augmente dans les régions temporales et diminue dans les régions frontales. En 2010, ce même groupe a montré une augmentation de la cohérence entre les deux hémisphères au niveau des bandes alpha chez des individus âgés et exposés par rapport aux témoins plus jeunes (Vecchio *et al.* 2010).

En 2007, Regel et ses collaborateurs ont testé l'effet d'une exposition de 30 min à un signal discontinu ou continu (900 MHz, DAS = 1 W/kg). Ils ont observé une augmentation de la puissance dans les bandes 10,5 - 11 Hz, 30 min après l'exposition discontinue, mais aucun impact de l'exposition aux ondes continues (Regel, Gottselig, *et al.* 2007).

Une étude plus récente sur de jeunes femmes a montré une modification des ondes alpha, bêta et gamma, après une exposition de 15 min à l'aide d'un smartphone 3G (1900 MHz, DAS = 0,69 W/kg) (Roggeveen *et al.* 2015).

Chez l'animal, peu d'études ont été menées et les résultats sont contradictoires. Certaines études montrent un effet des RF alors que d'autres l'absence d'effet. Une équipe en Russie (V. V. Vorobyov *et al.* 1997; V. Vorobyov *et al.* 2004; Vasily Vorobyov *et al.* 2010) a étudié l'effet des RF (945 MHz ou 915 MHz, 10 min avec 1 min "on", 1 min "off", DAS 0,7 mW/kg) sur l'EEG de rats vigiles. Les premiers résultats de 1997 montrent une asymétrie de l'EEG, sans effet RF. En 2004, puis 2010, les résultats montrent une augmentation des ondes béta (18-30 Hz) dans l'hypothalamus et le cortex, après une exposition répétée aux RF (3 x 10 min toutes les 10 min ou 10 min plusieurs fois/jour pendant 5 jours).

Une autre étude chez le rat (López-Martín *et al.* 2009) n'a montré aucun effet sur l'EEG d'une exposition de 2h à un signal GSM de 900 MHz avec un DAS de 0,2 W/kg.

Si la comparaison entre les études Hommes et animal s'avère difficile au vu du faible nombre d'études animales et de la diversité de la durée d'exposition (chronique *vs* aigüe chez l'Homme notamment), on peut noter la grande variabilité des effets observés chez l'Homme. Cependant, il apparaît qu'un effet des RF sur l'EEG chez l'Homme est probable, notamment sur la puissance de l'alpha (voir rapports ANSES, 2013, 2016). Ces effets sur l'activité électrique ne permettent pas de conclure à un effet biologique pouvant entrainer un effet sanitaire.

IV.2. Cognition et mémoire

Chez l'Homme, il existe différents tests afin d'évaluer l'attention et la mémoire :

- **Tests de vigilance** avec le test simple où le sujet doit réagir à un signal simple (étude du temps de réaction ou TR) ou le test du "tout" ou "rien" où le sujet doit soit réagir à un stimulus, soit inhiber sa réaction (étude de la fonction inhibitrice et du nombre d'erreurs), ou le test de choix de réaction où le sujet doit répondre à plusieurs stimuli de façon identique ou différente (étude du temps de réaction de choix).
- **Tests d'attention sélective** où le sujet doit trouver un objet ou un groupe d'objets précis au milieu de divers stimuli (étude du TR et du nombre d'erreurs).
- **Tests d'attention partagée** où deux stimuli (identiques ou de nature différente) sont présentés au sujet (étude du TR pour les deux tâches).

On peut aussi évaluer la **mémoire de travail**, pour cela on présente une liste d'images ou on récite une liste de mots et l'on demande à la personne d'en redonner le plus possible et dans le même ordre (étude du nombre d'erreurs). Une version de la piscine de Morris a également été développée afin de réaliser des tests de mémoire chez l'Homme (piscine virtuelle) (étude du temps de sortie). Il est possible aussi d'étudier la mise à jour de la mémoire de travail en donnant une liste d'items (en images ou oral) et en demandant au sujet si le dernier item donné était dans les trois précédents (test du n-back, étude du nombre d'erreurs et du TR). On peut noter que chez l'Homme, les tests de mémoire évaluent presque exclusivement la mémoire à court terme (quelques min ou heures). Dans certaines études, les tests cognitifs sont associés à une mesure des potentiels évoqués sur l'EEG cortical.

Koivisto et collaborateurs (Koivisto *et al.* 2000) ont exposé des hommes et des femmes pendant la durée des tests cognitifs (soit environ 1h) à un signal GSM de 900 MHz (0,25 W). Ils ont mis en évidence une diminution du temps de réaction (TR) dans plusieurs tâches de mémoire de travail (3-back) et dans des tests de vigilance pendant la condition 'on' (avec RF) *vs* la condition 'off' (sans exposition RF). Cette étude a été répliquée en 2003 (Haarala *et al.* 2003) sur un nombre d'individus plus important ainsi qu'avec un protocole d'exposition en double aveugle (simple aveugle en 2000). Dans cette étude plus solide scientifiquement, ils n'ont trouvé aucun effet sur les TR, ni sur la mémoire de travail (*accuracy*).

Une autre étude du même groupe (Haarala *et al.* 2005, 2007) n'a révélé aucune différence dans le TR dans une batterie de tests cognitifs chez de jeunes adolescents et adolescentes (10-14 ans), après une exposition à un téléphone mobile (GSM de 900 MHz (DAS = 1 ou 1,44 W/kg) pendant les 50 min de test. Ces mêmes résultats ont été retrouvés dans une étude sur des adultes (Haarala *et al.* 2007) (900 MHz, DAS = 1,1 W/kg).

Preece et ses collaborateurs (Preece et al., 1999) ont exposé des adultes à un signal de 915 MHz avec différents DAS (0; 0,125 et 1 W/kg) pendant les différents tests de cognition (rappel de mots, tests de vigilance, mémoire de travail), soit un temps d'environ 25-30 min. Ils ont observé une diminution du TR dans une tâche de choix uniquement, mais aucun impact de l'exposition sur les autres tests. Ensuite, cette même équipe a voulu répliquer ces résultats sur des enfants (10-12 ans) (Preece *et al.* 2005). Pour cela, ils les ont exposés au même signal qu'en 1999 et ont adapté les tests pour leur âge. Ils n'ont constaté qu'une tendance d'amélioration des performances pour les TR, mais sans significativité.

Regel et ses collaborateurs (Regel, Tinguely, *et al.* 2007) ont étudié l'influence d'une exposition à un signal GSM de 900 MHz, avec un DAS de 0,2 W/kg et 5 W/kg, 30 min avant le sommeil sur la réalisation de plusieurs taches cognitives (1,2,3-back test et test de choix de réaction). Ils n'ont trouvé aucun effet de l'exposition sur les résultats des tests, sauf pour le TR dans le 1-back test où la vitesse de réaction était diminuée en fonction de l'intensité du signal avec un effet plus important pour le DAS le plus élevé (5 W/kg). Ces effets étaient associés à une augmentation de la puissance des *spindles* du sommeil lent. Cette étude montrait pour la 1ère fois une relation entre l'intensité du CEM et ses effets sur la physiologie cérébrale.

Leung et collaborateurs (Leung *et al.* 2011) ont exposé des adolescents et des adultes à un signal de 2G à 900 MHz (2G, DAS = 0,7 W/kg) et/ou 3G à 1900 MHz (3G, DAS = 1,7 W/kg) pendant qu'ils réalisaient des taches cognitives (discrimination de stimuli auditifs et n-back tests). Pendant ces tests, les potentiels évoqués sont enregistrés par EEG. Ils ont montré

une augmentation de l'amplitude de N1 (onde négative associée à la phase de traitement auditif précoce) avec l'exposition à la 2G, sans effet sur la réponse comportementale (discrimination de stimuli auditifs), sans différence entre les groupes, mais aucun effet pour l'exposition 3G. Pour les tests n-back, les auteurs ont mis en évidence un retard des réponses impliquant les ondes alpha pour les 2 signaux 2G et 3G et des performances moins bonnes chez les sujets exposés aux 2 signaux en même temps.

Loughran et collaborateurs (S. P. Loughran *et al.* 2013) ont exposé des adolescents à un signal GSM de 900 MHz (DAS = 0,35 et 1,4 W/kg) pendant toute la durée des tâches cognitives (tests de vigilance et n-back tests). Ils n'ont trouvé aucune différence dans les résultats des tâches cognitives, quel que soit le DAS utilisé.

Verrender et collaborateurs (Verrender *et al.* 2016) ont exposé des adultes à un signal GSM-like de 920 MHz avec des DAS différents (0, 1 et 2 W/kg) et les ont soumis à des tests de performances cognitives (discrimination visuelle et mémoire de travail). Ils ont montré une diminution du TR pendant la tâche de mémoire de travail pour les deux DAS, montrant un effet non dose-dépendant.

Une étude plus récente de la même équipe (Dalecki et al. 2018) en double aveugle a montré, pendant une exposition de 30 min (920 MHz, DAS = 1 ou 2 W/kg) chez des sujets adultes, une diminution de l'amplitude de P1 (onde positive associée à la discrimination auditive) et une augmentation de la latence de N1 lors d'une tache de discrimination visuelle. Aucun autre effet sur les autres potentiels évoqués (PE), latence ou amplitude (56) n'ayant été montré, les auteurs proposent que les effets observés sur 2/56 PE pourraient être dus au hasard.

Les résultats des études de l'impact des RF sur l'EEG montrent des effets variables, avec une majorité mettant en évidence une augmentation des performances mnésiques ou alors l'absence d'effet.

IV.3. Barrière Hématoencéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une interface entre le sang et le tissu cérébral, permettant de protéger ce dernier d'agents potentiellement neurotoxiques. Elle est constituée de protéines transmembranaires formant des jonctions complexes serrées entre les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux cérébraux, les péricytes et les astrocytes. Elle a fait l'objet de nombreuses études depuis 30 ans et est considérée par certains comme une

cible potentielle des effets non thermiques des RF sur le cerveau, notamment par les associations telles que PRIARTEM et les personnes électrohypersensibles.

Au début des années 80s, Willams *et al.* (Williams *et al.* 1984) ont montré, avec une exposition RF à 2450 MHz avec un DAS de 4 W/kg, une augmentation de la température cérébrale et donc une augmentation de la perméabilité de la BHE dans des études chez l'animal.

Salford et collaborateurs (Salford *et al.* 1994) ont exposé des rats de 915 MHz avec un DAS variant de 0,016 à 5 W/kg pendant 2h sous anesthésie. La perméabilité de la BHE a été évaluée par la visualisation du passage de l'albumine (présence d'extravasations d'albumine sur des coupes coronales). Ils ont mis en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE indépendante du DAS si < 2,5 W/kg, mais augmentant fortement avec des DAS élevés, pour atteindre 46% avec un DAS = 5 W/kg.

D'autres études (Tsurita *et al.* 2000; J. W. Finnie *et al.* 2001) n'ont montré aucun effet des RF sur la BHE après une exposition chronique à un signal TDMA (téléphonie japonaise) ou GSM, chez le rongeur (1439 MHz ou 900 MHZ, avec un DAS variant de 0,25 à 4 W/kg). Des résultats similaires ont été également retrouvés en 2005, au sein du LNCA (Cosquer, Vasconcelos, *et al.* 2005), après une exposition aigüe de 45 min chez le rat (signal de 2.45 GHz et un DAS ~ 3 W/kg au niveau du cerveau), mis en évidence par l'absence de passage du colorant bleu Evans au niveau cérébral. Alors que la même année, Persson, Salford et collaborateurs (Persson *et al.* 2005) ont mis en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE (extravasation de l'albumine) avec une exposition sur des rats non anesthésiés, ni contraints (915 MHz, DAS = 0,2, 2, 20 ou 200 mW/kg). De plus, de manière surprenante, ils ont observé que cette dernière était d'autant plus importante que le DAS était faible.

En 2008, la même équipe de Salford (Grafström *et al.* 2008) a exposé à nouveau des rats à un signal GSM de 900 MHz et des DAS faibles (compris entre 0,6 et 60 mW/kg), 2h par semaine pendant 55 semaines. Ils n'ont montré aucun impact sur l'intégrité de la BHE chez les rats exposés par rapport aux rats contrôles, 5 à 7 semaines après la fin des expositions. Par contre, ils ont montré dans une autre expérience (exposition aigüe à un signal GSM de 900 MHz, DAS = 0, 0,12, 1,2 12 ou 120 mW/kg, 2h) une augmentation de la perméabilité de la BHE à 12 mW/kg (7 jours après l'exposition), avec une tendance à l'augmentation pour 0,12 et 120 W/kg (extravasation d'albumine) (Nittby *et al.* 2009). Ces résultats sont également retrouvés, toujours par la même équipe, avec un signal GSM de 900 MHz et un DAS de 0,4 mW/kg également en exposition aiguë (2h) (Nittby *et al.* 2011).

Des études plus récentes, comme celle de Tang *et al.* (Tang *et al.* 2015) ont montré une augmentation de la perméabilité chez le rat (étude du passage du bleu Evans) après une exposition de 3h/jour pendant 28 jours (900 MHz, DAS = 2 W/kg). Cette augmentation résulterait de l'activation de la voie mkp-1/ERK et causerait également des troubles cognitifs (voir chapitre cognition). Mais ces résultats ne sont pas retrouvés en 2017 (Poulletier de Gannes *et al.* 2017), lorsqu'ils exposent également des rats à un signal GSM de 1800 MHz (DAS = 2,6 W/kg), 2h/jour, 5j/semaine, pendant 4 semaines. Les seuls effets délétères ont été observés avec un DAS de 13 W/kg, soit plus de 5 fois la limite autorisée.

IV.4. Astrocytes, microglies : entre inflammation et cognition

Si ces cellules du SNC ont été largement étudiées dans le contexte de la neuroinflammation, y compris dans le cadre des études sur les effets des RF, des études plutôt récentes montrent que les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglies) sont aussi importantes pour la mémoire, et ceci dès le codage de l'information, ainsi que pour son stockage à plus long terme (Cristina M. Alberini *et al.* 2018). Pour cela, elles interviennent dans le métabolisme du glucose avec le couplage entre les astrocytes et les neurones pour le stockage à long terme, mais aussi dans l'excitation neuronale nécessaire à la formation de souvenirs, et enfin dans le métabolisme énergétique élevé pour la formation de la mémoire lors du développement (Cristina M. Alberini *et al.* 2018). En effet, les cellules gliales sont essentielles au fonctionnement cérébral (fonctions synaptiques, transport du glutamate, mémoire et plasticité synaptique, neurogénèse, … (Adamsky et Goshen 2018)). La protéine acide fibrillaire gliale (*Glial fibrillary acidic protein* ou GFAP) est un filament intermédiaire présent dans les astrocytes du système nerveux central (Hol et Pekny 2015). En plus de son rôle dans les phénomènes d'inflammation (Kassubek *et al.* 2017), elle est étroitement liée aux autres protéines du cytosquelette de la cellule non épithéliale ; elle participe au maintien de l'effort cellulaire et à sa forme, ainsi qu'au fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique. Cette protéine est très étudiée dans la littérature des RF, que ce soit par Western Blot (WB) ou par immunomarquage en tant que marqueur des astrocytes activés, et possiblement d'inflammation, de lésions et/ou dysfonctionnement de ces cellules.

Les astrocytes sont également impliqués dans la dépression, le stress et l'anxiété, mais aussi dans des pathologies psychiatriques comme la schizophrénie et les addictions (R. Kim *et al.* 2018). Cependant, en ce qui concerne les radiofréquences, les études sur la glie se sont

intéressées uniquement aux aspects bien connus liées à la neuroinflammation et à la neurotoxicité.

Une première observation (Fritze, Wiessner, *et al.* 1997) a montré l'absence d'impact sur l'ARNm (ARN messager) de la GFAP, dans plusieurs régions cérébrales (cortex, hippocampe, striatum, cervelet et le corps calleux), après une exposition à un signal GSM de 900 MHz (DAS = 0,3, 1,5 et 7,5 W/kg) pendant 4h chez le rat. Cette étude a donné lieu à d'autres recherches aboutissant aux mêmes résultats. Watilliaux et collaborateurs ont confirmé par WB sur extraits de tissu cérébral, l'absence d'effet des RF chez le jeune rat après une exposition aigüe (GSM 1800 MHz, 2h, 3 DAS différents : 1,7 – 2,2 et 2,5 W/kg) (Watilliaux *et al.* 2010).

Cependant, en 2004, une augmentation de la quantité de GFAP dans le cortex et l'hippocampe a été observée après une exposition aigüe à un signal GSM de 900 MHz et un DAS de 6 W/kg (Mausset-Bonnefont *et al.* 2004). Un effet similaire a été observé en 2010, lorsqu'Ammari et collaborateurs ont exposé des rats à un signal de 900 MHz selon différentes conditions : 15 min à 6 W/kg ou 45 min à 1,5 W/kg, 5j/semaine pendant 8 semaines. Ils ont mis en évidence une augmentation de la GFAP dans le cortex préfrontal, le striatum, le cervelet, le gyrus denté et le globus pallidus 3 jours après l'exposition aux deux DAS (Ammari *et al.* 2010), augmentation qui persiste au moins 7 jours, soit 10 jours après la fin de l'exposition. Des résultats similaires avec une analyse protéomique ont été observés plus tard par Fragopoulou et collaborateurs, après une exposition de 8 semaines (3h/j) à un DAS plus faible (entre 0,17 et 0,37 W/kg) chez la souris (Adamantia F. Fragopoulou *et al.* 2012).

Bouji et collaborateurs (Bouji *et al.* 2012) ont exposé des rats de différents âges (6 semaines et 12 mois) à un signal GSM de 900 MHz et un DAS de 6 W/kg pendant 45 min. Ils ont obtenu le même résultat que Watilliaux (2011), avec aucun effet de l'exposition sur l'expression de la GFAP dans le cortex, le striatum et l'hippocampe pour les deux groupes d'âge, ni d'effet sur l'expression d'un marqueur de la microglie (CD68). Dans une seconde étude plus récente (Bouji *et al.* 2016), avec la même exposition, ils ont fait exactement la même observation (cortex et gyrus denté) sur des rats adultes (4-5 mois) et âgés (22-24 mois). Cependant, lors de ces deux études, ils ont mis en évidence une augmentation la protéine IL-1β (interleukine 1β, protéine pro-inflammatoire) dans les bulbes olfactifs chez les rats de 12 mois (Bouji *et al.* 2012) et dans le cortex des rats âgés de 22-24 mois (Bouji *et al.* 2016).

Deux autres études de la même équipe ont permis d'observer l'impact des RF sur l'expression de la GFAP dans un modèle sain et inflammatoire. La première étude

(Barthélémy *et al.* 2016;) a mis en évidence, chez le jeune rat (6 semaines), une augmentation de la GFAP dans le striatum pour l'exposition à un signal GSM de 900 MHz avec un DAS de 1,5 W/kg pendant 45 min. La seconde étude (Petitdant *et al.* 2016) n'a mis en évidence aucun impact des RF sur l'expression de la GFAP sur le modèle de rat sain, ni sur le modèle inflammatoire (injection de LPS (lipopolysaccharide) pendant la gestation et/ou après la naissance). Pour cela, ils avaient exposé des rats à un signal GSM de 900 MHz avec deux DAS différents (1,5 et 6 W/kg) pendant 45 min/jour, 4 jours/sem pendant 4 semaines.

Enfin, Lameth et collaborateurs (Lameth *et al.* 2017) ont exposé des rats jeunes (2 semaines) et adultes (2 mois) injectés ou non avec du LPS (induction d'inflammation) à un signal GSM de 1800 MHz avec un DAS de 2,9 W/kg, pendant 2h. Ils ont mis en évidence une diminution de l'expression de l'IL-1β dans le cortex cérébral, 24h après l'exposition chez les jeunes rats et les adultes.

Ces études montrent peu d'effets d'une exposition aigue ou chronique aux RF sur la protéine GFAP au niveau cérébral, mais des variations d'expression pour l'interleukine IL-1β.

IV.5. Stress et mort cellulaire

Dans la réponse au stress, les protéines les plus étudiées sont les protéines chaperonnes appelées "*Heat Shock Protein*" ou HSP et les protéines HSC ("*Heat Shock Chaperonne*", autre membre de la famille des HSP). Les résultats restent controversés, reflétant certainement au moins en partie des protocoles d'exposition aux RF différents.

D'une part, certaines études n'ont montré aucun effet des RF sur les protéines cérébrales HSP et HSC (J. P. McNamee et Chauhan 2009). Par exemple, Finnie montre en 2009 qu'il n'y a aucun changement pour les HSP32, 70 et 25 chez des souriceaux non-nés (19ème jour de gestation), après une exposition aux RF pendant la gestation (900 MHz, 4 W/kg, 1h/j) (John W. Finnie *et al.* 2009). Une autre étude sur les HSP60, 90 et HSC 70 (Watilliaux *et al.* 2011) a donné le même résultat sur des rats âgés de 35 jours (exposition aigue GSM de 1800 MHz, DAS compris entre 1,7 et 2,5 W/kg, 2h), tout comme l'équipe de Fritze en 1997 (Fritze, Wiessner, *et al.* 1997).

D'autre part, Fragopoulou a montré en 2012 une augmentation de HSP90 dans l'hippocampe (Adamantia F. Fragopoulou *et al.* 2012) après 3h d'exposition journalière pendant 8 mois (GSM de 900 MHz, DAS compris entre 0,17 et 0,37 W/kg). Deshmukh et ses collaborateurs ont montré également une augmentation d'une autre protéine de la famille,

HSP70, chez le jeune rat (2 mois), pour toutes les fréquences testées (900, 1800 et 2450 MHz, DAS <0,07 mW/kg, 2h/j, 5j/sem, 180 jours) (Deshmukh *et al.* 2015).

Terro et collaborateurs (Terro *et al.* 2012) ont exposé *in vitro* des cellules corticales à un signal GSM de 900 MHz avec un DAS de 0,25 W/kg pendant 24h. Ils n'ont montré aucun impact sur l'apoptose (coloration DAPI et quantification de caspase 3 clivée), mais par contre ils ont mis en évidence une augmentation de la protéine HSC70 et une diminution de la protéine HSP90.

Une étude (Shahin *et al.* 2015) sur un autre marqueur de stress oxydant : malonedialdéhyde (MDA), a montré une augmentation de ce dernier dans les régions hippocampiques, lors d'une exposition (signal 3G, 2100 MHz, 0,4 W/kg, 6h/j, 5j/sem) de 10 jours, puis une diminution lors d'une exposition plus longue (40 jours).

Dans la littérature, certaines équipes se sont aussi intéressées à la mort cellulaire programmée ou apoptose, et à l'impact que pourraient avoir les RF sur celle-ci. Dans la voie cellulaire conduisant à l'apoptose, on trouve des protéines telles que p21, p53, Bax ou encore Bcl-2. Cette dernière a été étudiée en 2008 (Yilmaz *et al.* 2008) par marquage immunohistochimique (coupes de cerveau entier) après une exposition à un signal de 900 MHz avec un DAS compris entre 0,52 et 3,13 W/kg, 20 min/j pendant un mois chez le rat (conditions de contention). Les résultats n'ont montré aucune différence entre le groupe exposé et le groupe contrôle.

Une récente étude (Ghatei *et al.* 2017) réalisée chez la souris, au niveau du cervelet, a exploré la possibilité d'un impact des RF sur le développement embryonnaire et celui du jeune rongeur à travers des expositions chroniques (900 et 1800 MHz, DAS non communiqué) aux RF avant (pendant 19 jours de gestation) et/ou après la naissance (8-10 semaines). L'expression des gènes p21 et Bax est modifiée, respectivement augmentée et diminuée par les RF pour toutes les conditions d'exposition. Les auteurs concluent donc que les RF n'induisent pas d'apoptose (baisse de Bax et pas de changement pour Bcl-2) et que les cellules potentiellement affectées seraient réparées grâce à un arrêt du cycle cellulaire (augmentation de p21).

Bien que les résultats sur l'impact des RF sur le stress restent variables, on peut noter que les effets délétères observés (augmentation de HSP) sont observés avec de faibles DAS. Concernant la mort cellulaire, les données iraient plutôt en faveur d'une absence d'effet sur les

gènes tels que Bcl2, Bax ou encore p21 chez le rat adulte, alors qu'une exposition fœtale mènerait à une influence des RF sur ces gènes (mécanisme de compensation).

Chapitre 2 : Les systèmes de mémoire

I. Définitions et classifications de la mémoire

I.1. Définitions générales

De manière générale, la mémoire regroupe l'ensemble des activités mentales qui permettent d'enregistrer, de stocker et de se rappeler des informations passées. Le concept de mémoire a évolué au cours des siècles, pour aboutir, de nos jours, à des définitions axées sur la notion de traces mnésiques ou engrammes ; de types de mémoire voire de systèmes de mémoire ; et à la formation de souvenirs plus ou moins durables et essentiels pour agir de manière adaptée dans notre environnement.

La première étape est l'enregistrement ou **encodage** de l'information permettant la transformation de cette-dernière en une représentation mentale aussi appelée trace mnésique. Celle-ci entre alors dans un processus de **consolidation** pour être stabilisée et stockée à plus ou moins long terme. Lors de cette étape, la synthèse de protéines et la création de nouvelles connexions synaptiques participent à la ***consolidation synaptique***, alors que les réorganisations structurelles et fonctionnelles des circuits neuronaux sont impliquées dans la ***consolidation systémique***. Enfin, ces représentations mnésiques peuvent être restituées à tout moment lors de **l'étape de rappel**.

Bien que les processus principaux soient identiques, la mémoire n'est pas un processus unitaire, il faut plutôt parler de mémoires au pluriel et plus précisément de plusieurs systèmes de mémoire (Tulving 1985).

I.2. Classification des systèmes de mémoire

I.2.1. Différents types de mémoire

Au cours des dernières décennies, différents systèmes de mémoire ont été mis en évidence et classés selon le registre sensoriel (auditif, visuel, tactile) ou encore, selon le décours temporel (mémoires à court terme et mémoires à long terme). C'est ainsi qu'en 1968, Atkinson et Shiffrin (Atkinson et Shiffrin 1968) proposent une représentation de ces trois systèmes de mémoire et leurs interactions (Figure 8).

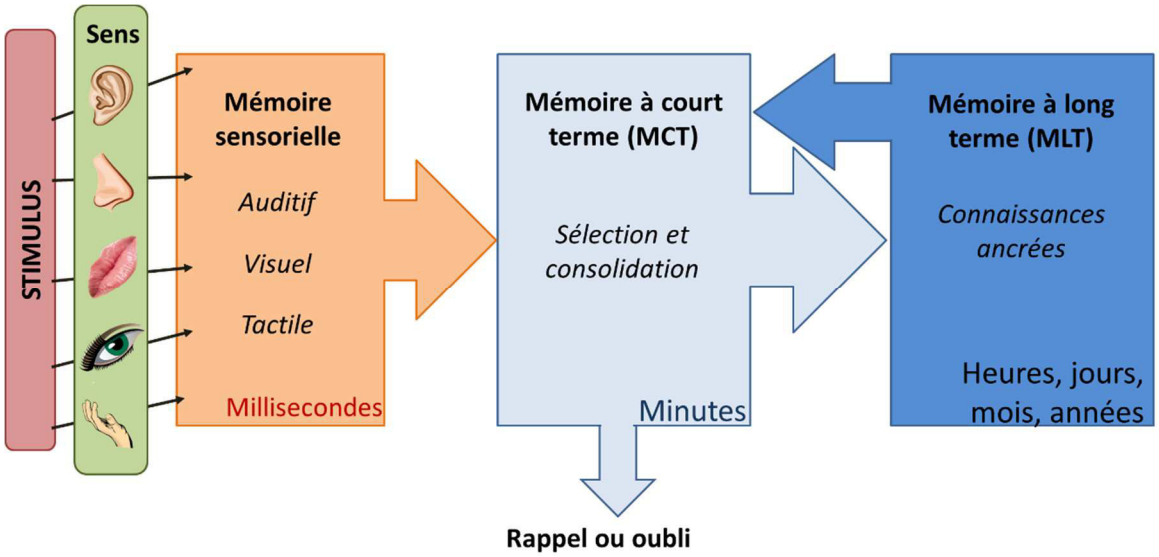


Figure 8 : Représentation schématique du modèle proposé par Atkinson et Shiffrin 1968.
La mémoire est divisée en trois systèmes : l'information est encodée par le système sensoriel, puis transférée dans la mémoire à court terme. Elle peut alors être stockée à long terme et rappelée à tout moment ou être oubliée.

Ce modèle modal divise les mémoires selon leur durée. Un stimulus est perçu par le système sensoriel pour être encodé pendant quelques millisecondes dans la mémoire sensorielle. Puis l'information va être transmise à la mémoire à court terme. Enfin le souvenir pourra être stocké à long terme, grâce à la consolidation, pour être rappelé à tout moment, ou oublié.

I.2.2. La mémoire sensorielle

La mémoire sensorielle est la première étape, extrêmement courte (moins d'une seconde), pour l'encodage d'une information. Elle est considérée comme automatique, car elle ne relève pas d'un état conscient. Elle peut faire intervenir tous les sens et fait donc le lien entre la perception sensorielle et le système de mémoire suivant : la mémoire à court terme (MCT).

I.2.3. La mémoire à court terme (MCT)

William James fut le premier (James 1890) à distinguer deux mémoires différentes, la mémoire primaire, pouvant retenir un faible nombre d'informations tant qu'elles sont gardées à l'esprit, et la mémoire secondaire, capable de garder un nombre illimité de souvenirs. Ces derniers peuvent être conservés indéfiniment et rappelés à volonté. La MCT est utilisée au

quotidien, par exemple pour retenir un numéro de téléphone avant de le composer, ou encore pour retenir une information avant de la transmettre à une tierce personne.

La capacité de stockage de la MCT est de 7 ± 2 items pour une durée comprise entre quelques secondes et quelques minutes. Elle est limitée en quantité d'informations à retenir, alors afin d'optimiser le stockage, il est possible de réaliser des associations de plusieurs items en un seul, appelé "*chunk*" (unité structurée de découpage de l'information intervenant dans la mise en mémoire à court terme). Cette hypothèse, avancée par Miller (G. A. Miller 1956) grâce à un exercice de mémorisation de séquences binaires, prend tout son sens avec les recherches de Chase et Simon (Chase et Simon 1973) et les joueurs d'échecs. En comparant trois catégories de joueurs (novices, experts et maitres), ils ont montré que les maitres pouvaient rappeler 4 fois plus de pièces que les novices et 2 fois plus que les experts en conditions de jeu. L'encodage par "*chunks*" permet d'augmenter la capacité de stockage de la MCT, grâce notamment à la mémoire à long terme qui fournit l'expérience et les techniques de jeux dans cet exemple.

I.2.4. La mémoire à long terme (MLT)

La mémoire à long terme (MLT) permet de stocker des informations de plusieurs jours jusqu'à plusieurs années, voire toute la vie. C'est cette mémoire qui est utilisée pour retenir les épisodes de notre vie, nos savoir-faire ou encore tout ce qui fait notre identité. Cependant, cette MLT n'est pas infaillible, elle est modulable notamment avec les différents rappels (voir théorie de la consolidation systémique ci-dessous), mais aussi altérée par l'âge et dans de nombreuses pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou encore la démence à corps de Lewy, …

Les principales connaissances initiales apportées sur la MLT viennent des recherches en neuropsychologie et plus particulièrement avec le patient H.M. (Henry Molaison) dès 1957 (Scoville et Milner 1957) . Ce patient subit une résection chirurgicale bilatérale des lobes temporaux médians afin de remédier à de sévères crises d'épilepsie. A la suite de cette opération, H. M. commença à souffrir d'une amnésie rétrograde, l'empêchant ainsi de se souvenir des évènements précédant la chirurgie de plusieurs années. De plus, le patient souffrait également d'une amnésie antérograde sévère, l'empêchant de former de nouveaux souvenirs. Il ne pouvait donc pas se souvenir d'une personne qu'il avait croisée le matin, ni même de son repas précédent. Cependant, il arrivait à se souvenir un court instant d'une information, sa mémoire à court terme étant restée intacte. Ces observations et celles de nombreux autres patients qui ont suivi, ont permis de conclure que le lobe temporal n'était pas

impliqué dans la mémoire à court terme mais uniquement à long terme. De plus, en fonction de l'âge du souvenir, ceux-ci n'étaient pas localisés dans les mêmes régions cérébrales, expliquant l'amnésie rétrograde temporellement graduée, telle qu'observée chez le patient H.M.

Enfin, H. M. passa de nombreux tests neuropsychologiques, lors de son suivi par la neuropsychologue Milner pendant de très nombreuses années, comme le test du dessin au miroir en 1962. Ce test visait à tester les habilités perceptrices et motrices relevant du registre de la mémoire procédurale. Le patient s'améliorait de jour en jour, ce qui a prouvé qu'il existait une diversité dans les systèmes de mémoire à long terme, divisés en deux grands groupes : la mémoire explicite et implicite (Squire 2009).

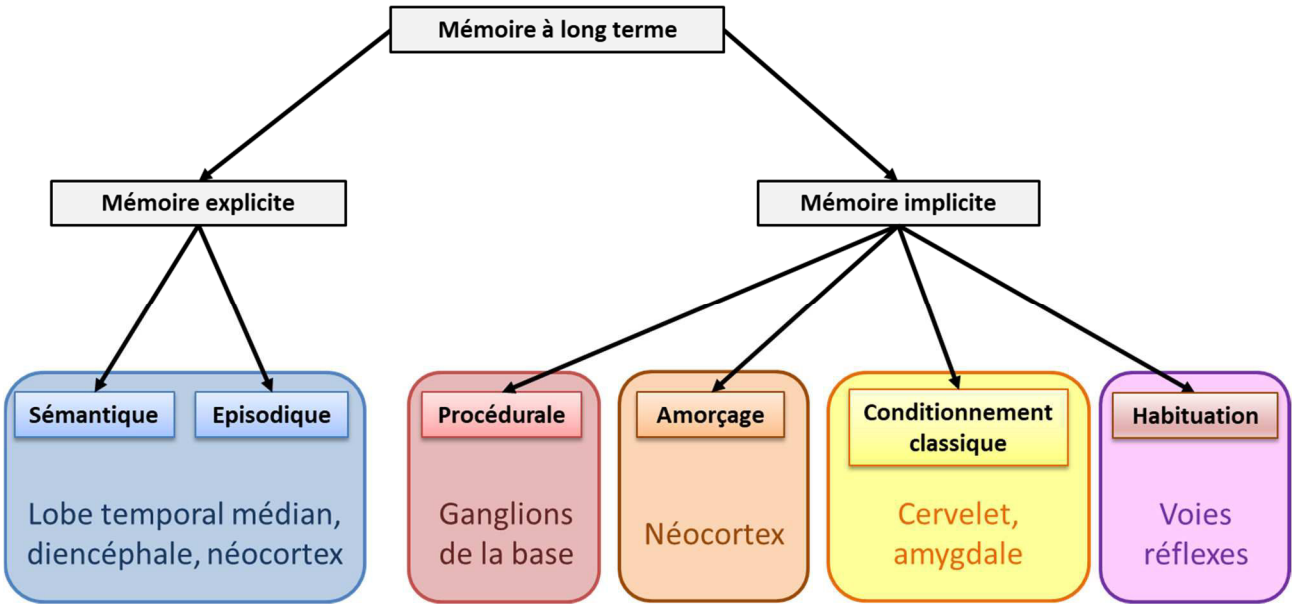


Figure 9 : Représentation hiérarchique des sous-systèmes de mémoire à long terme et des structures cérébrales sur lesquelles elles reposent, adaptée de Henke, 2010.

I.2.4.1. La mémoire explicite

La mémoire explicite ou déclarative concerne le stockage et la récupération des informations qu'un individu se rappelle consciemment et exprime par le langage. Cette mémoire est composée de deux sous-systèmes : la mémoire sémantique et la mémoire épisodique (Figure 9).

La première, **la mémoire sémantique,** fait référence à l'ensemble des souvenirs concernant les connaissances générales comme les règles de calculs mathématiques, les conjugaisons ou encore les grandes villes de France. Cependant, chaque personne possède aussi des souvenirs sémantiques personnels sur lui-même (adresse, date de naissance, par

exemple). Cette mémoire repose sur les régions corticales comme le lobe frontal et également le lobe temporal (Tulving et Markowitsch 1998). Ces informations nécessitent un rappel conscient mais sont généralement dissociées du contexte spatial, émotionnel et temporel.

La mémoire épisodique englobe les évènements personnellement vécus par l'individu et donc les informations issues de ses expériences personnelles. Ces souvenirs reposent sur un cadre spatio-temporel précis et présentent souvent une dimension émotionnelle importante. Ces deux paramètres sont essentiels pour la mémorisation de l'information mais aussi pour son rappel (mémoire du "où", "quoi" et "quand", (Tulving et Lepage 2000), par exemple : son mariage à la mairie de Strasbourg en février 2017, sous un ciel nuageux, avec toute sa famille, l'odeur des churros de la fête foraine sur la place Broglie à Strasbourg). Cette mémoire dépend donc du système limbique (hippocampe et amygdale, Figure 9), respectivement pour le contexte spatio-temporel et la composante émotionnelle, mais aussi du thalamus (diencéphale) et du néocortex, en particulier le cortex préfrontal (Tulving et Markowitsch 1998).

I.2.4.2. La mémoire implicite

A l'inverse de la mémoire explicite, la mémoire implicite ou non-déclarative ne nécessite pas un accès conscient pour le rappel de l'information. Dans la représentation hiérarchique de la Figure 9, la mémoire implicite regroupe plusieurs systèmes de mémoire :

- **La mémoire procédurale** ou mémoire des habilités permet le rappel des savoir-faire et des automatismes, comme par exemple faire du vélo ou conduire une voiture, mais aussi les routines cognitives. Ces activités ne nécessitent pas de rappel conscient, ce qui permet de focaliser l'attention de la personne sur autre chose, comme la circulation sur la route lorsque nous conduisons. Cette mémoire est durable et garde les informations sur une longue période même sans rappel. Elle dépend du cervelet, des ganglions de la base (le striatum, le globus pallidus, le noyau sous-thalamique et la substance noire) qui ont une connexion étroite avec le cortex préfrontal.
- **Le phénomène d'amorçage** représente la faculté à se rappeler d'un souvenir en fonction d'une information stockée précédemment. Par exemple, lorsque l'on demande à un individu de citer un fruit jaune, il répondra le plus souvent un citron, car c'est le lien le plus fréquent entre les deux. Après des études sur le champ visuel, il a été mis en évidence que l'amorçage se base sur le cortex occipital (Pascale Gisquet-Verrier 2006).
- **L'habituation et la sensibilisation** sont deux phénomènes opposés ; le premier est lié à une diminution de l'intensité d'une réponse à la suite d'un stimulus répété ou

prolongé (ex : l'habituation à l'eau chaude pour les aides-soignantes). Le second est une augmentation de la réponse après un stimulus récurrent également (ex : la précision au niveau des goûts ou des odeurs pour un cuisinier). Ces phénomènes reposent principalement sur les voies réflexes qui sont inhibées (habituation) ou exacerbées (sensibilisation).

- **Le conditionnement classique** ou pavlovien est défini par l'association entre un élément neutre et un autre avec une valence (exemple d'une récompense) (Dewsbury 1997). Au cours du temps et par la présentation récurrente de ces deux éléments en simultané, l'élément neutre finit par susciter une réponse identique à celle engendrée par l'élément récompensant seul. Le conditionnement dépend de plusieurs structures cérébrales (Hippocampe, cortex préfrontal, amygdale et cervelet)

I.2.5. Consolidation d'un souvenir

Dès le début du 20ème siècle, le zoologue allemand Semon caractérise pour la première fois une modification durable et latente d'une trace mnésique engendrée par un stimulus sous le nom d'engramme (Semon 1921). Selon Hebb en 1949, l'engramme se compose d'un regroupement de neurones qui échangent de manière privilégiée une information. Cette trace labile encodée, c'est-à-dire prise en compte par les différents registres sensoriels, va être stabilisée progressivement pour être stockée à long terme. Cet ancrage dans la MLT est appelé consolidation mnésique (Lynn Nadel et Hardt 2011; L. Nadel *et al.* 2012).

Cette dernière repose sur deux mécanismes différents mais étroitement liés : la consolidation synaptique, qui se met en place dès les premières minutes suivant l'apprentissage ou l'encodage, et la consolidation systémique qui prend plus de temps, pouvant aller jusqu'à quelques jours chez l'Homme.

I.2.5.1. Consolidation synaptique

La partie sur les voies de signalisation impliquées dans la mémoire sera traitée plus en détails dans le chapitre suivant.

La consolidation synaptique repose sur des modifications de plasticité au niveau de la synapse permettant de renforcer l'efficacité des échanges de l'information au sein de cette dernière. C'est Ramon y Cajal qui parla pour la première fois à la fin du 19ème siècle de modifications (croissance et développement) de la synapse après un apprentissage (Azmitia 2007). Puis Hebb (Hebb 1949) émit l'hypothèse qu'une information stockée dans le cerveau

est associée à des modifications de l'efficacité de la synapse. Ces modifications s'accompagnent de changements morphologiques et fonctionnels, par exemple par l'augmentation du nombre de récepteurs ou encore une libération plus importante de neurotransmetteurs (Dudai 2004).

Il existe trois types de plasticité, reposant sur les modifications de l'activité synaptique suite à une stimulation: la plasticité à court terme (quelques minutes), à long terme précoce (quelques heures) et à long terme tardive (modification de plus de 10 heures) (Clopath 2012).

La plasticité synaptique peut entrainer une facilitation des échanges au niveau de la fente synaptique entre les éléments pré- et post -synaptiques, c'est la **potentialisation à long terme** (PLT) (Bliss et Lømo 1973). Des stimulations courtes à haute fréquence sur la voie perforante de l'hippocampe vers le gyrus denté provoquent une augmentation des potentiels excitateurs post-synaptiques. Ceci se traduit par une dépolarisation de l'élément post-synaptique suffisante pour atteindre plus rapidement le seuil minimal nécessaire au déclenchement d'un potentiel d'action et à l'activation des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) du glutamate, couplés à un canal ionique. Cette activation entraine l'ouverture de ce dernier et permet l'entrée de calcium dans la dendrite et l'activation de nombreuses cascades intracellulaires comme la voie des protéines kinases (PKA et PKC) (Figure 10). Cette activation se fait par le biais de seconds messagers comme la calmoduline (CaM) et l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc). De plus, une fois les kinases activées, elles sont capables de s'auto-activer et ainsi amplifier le phénomène (Traynelis *et al.* 2010). L'activation de la PKA (protein kinase) stimule la voie des kinases MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase*), kinases impliquées dans le maintien de la PLT (Pang et Lu 2004). Ces enzymes, capables de traverser la membrane nucléaire, permettent l'activation de facteurs de transcription tel que *CREB* (*cAMP response element-binding protein*) (Davis *et al.* 2000), qui peuvent, à leur tour, activer la transcription de gènes précoces ("*immediate early genes"*, IEGs). Ces derniers participent également à la transcription, on retrouve notamment *c-fos* et *Egr1* (Sheng et Greenberg 1990) en induisant la transcription des gènes plus tardifs tels que le *Bdnf* (*Brain-derived neutrophic factor*) et Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*). Dans ce cas, on parle de **potentialisation à long terme tardive**. Le BDNF est un facteur neurotrophique très important dans la plasticité synaptique à long terme par son implication dans l'arborisation dendritique et dans la survie neuronale (Danzer *et al.* 2002).

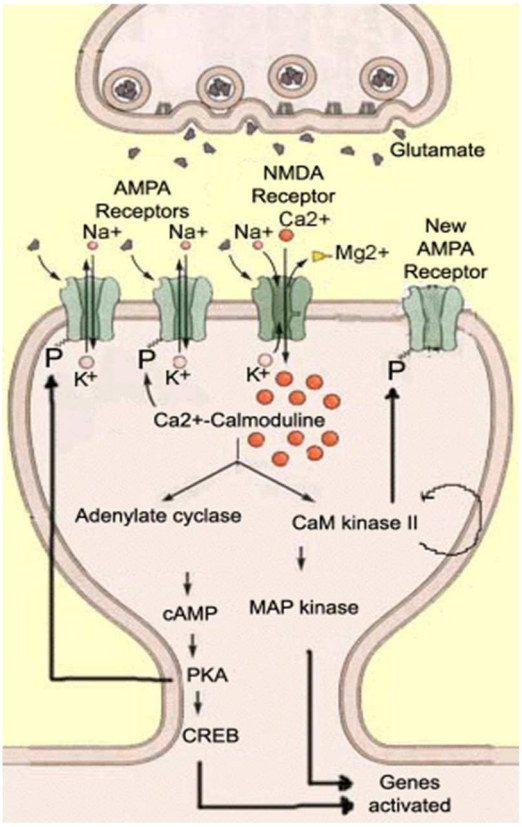


Figure 10 : La potentialisation à long terme. Le glutamate libéré dans la fente synaptique active les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartique) et AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) en post-synaptique.

L'entrée de calcium (Ca^{2+}) permet alors l'activation d'enzymes et de cascades enzymatiques jusqu'à l'activation des gènes précoces. (D'après http://lecerveau.mcgill.ca)

La plasticité peut également être associée au phénomène inverse, soit la désensibilisation (diminution des échanges au niveau de la jonction synaptique), appelée la **dépression à long terme (DLT)** (Ito et Kano 1982). Elle s'oppose à la PLT car elle permet "d'affaiblir" des synapses de manière spécifique afin de compléter le renforcement des synapses par la PLT. De manière simple, le DLT permet d'éliminer des informations pour qu'un nouvel encodage puisse avoir lieu, évitant ainsi l'atteinte d'un plafond ou saturation au sein des synapses. On peut donc dire que la DLT et la PLT sont complémentaires pour le stockage de l'information (Malleret *et al.* 2010). La DLT implique aussi les récepteurs glutamatergiques (Lüscher et Malenka 2012). Le calcium entre dans la cellule suite à l'activation des récepteurs NMDA, ce qui augmente la concentration intracellulaire en Ca^{2+}. Ainsi, il se lie à la calmoduline pour activer la protéine phosphatase 2B (PP2B) qui, en dé-phosphorylant la protéine inhibitrice 1, conduit à l'activation de la protéine phosphatase 1 (PP1). Cette dernière dé-phosphoryle les récepteurs AMPA et induit leur internalisation, d'où l'affaiblissement de la transmission synaptique (Kessels et Malinow 2009).

Ainsi, la DLT permet de diminuer la force de connexion des synapses, elle est donc impliquée à la fois dans l'oubli et dans la mémorisation de nouvelles informations. C'est ce qu'ont montré Nabavi et collaborateurs grâce à des tests de conditionnement de peur chez des

rats. En effet, après un conditionnement de peur au son, (association d'un son à un choc électrique), ils stimulent l'amygdale (structure où s'opèrent les mécanismes de DLT et PLT) avec une fréquence de 1 Hz mimant la DLT (900 impulsions de 2 ms) ou 5 stimulations (mimant la PLT) à 100 Hz (100 impulsions/stimulation, chacune espacée de 3 min). Lors de la stimulation à 1 Hz, les animaux ne présentent plus de peur au son, indiquant un oubli du conditionnement précédent, alors qu'avec les 5 stimulations à 100 Hz, les rats présentent à nouveau une peur au son. Donc la PLT et la DLT sont complémentaires et nécessaires toutes les deux pour la consolidation synaptique d'un souvenir (Nabavi *et al.* 2014).

I.2.5.2. Consolidation systémique

Alors que la consolidation synaptique se met en place rapidement après l'encodage au niveau de la synapse, la consolidation systémique est un processus plus lent nécessitant plusieurs jours/semaines, voire des mois. Ce phénomène a pour but la stabilisation et le stockage sur le long terme de nos souvenirs.

Actuellement, il existe plusieurs théories sur la consolidation systémique, dont la théorie standard, la théorie des traces multiples et la transformation et ont été plutôt proposées dans le cadre des mémoires déclaratives.

La théorie standard a été établie par Marr en 1970 en suggérant une communication entre l'hippocampe et les modules corticaux (Marr 1970). Dans de nombreuses espèces telles que l'Homme, le rat et les singes, l'hippocampe est considéré comme le site de stockage initial (Squire 1992), alors que le stockage permanent se situerait dans les structures corticales (Marr 1971). Ces échanges d'informations entre l'hippocampe et le néocortex interviendraient notamment pendant les phases de sommeil. Durant celles-ci, des réactivations hippocampo-corticales et cortico-corticales ont lieu et vont permettre le transfert d'une trace mnésique, initialement dépendante de l'hippocampe, vers des aires corticales qui deviendront dépositaires de la trace stabilisée et durable. Dans ce modèle, l'hippocampe est désengagé pour le rappel d'un souvenir ancien (quelques semaines, mois, années), et c'est l'inverse pour le rappel d'un souvenir récent (quelques jours-semaines), dépendant de l'hippocampe et non du néocortex pour son rappel. Ceci est vrai pour un souvenir épisodique et sémantique. Cette théorie dite "standard "(Frankland et Bontempi 2005) fut la première formulée et repose sur de nombreuses études menées chez l'Homme comme celles du patient H. M. et son amnésie rétrograde. Il faudra plus de 20 ans pour que cette théorie évolue avec Moscovitch et Nadel et leurs collaborateurs.

En effet, d'autres études de patients atteints d'une lésion du lobe temporal, présentant une amnésie rétrograde, ont montré que la mémoire rétrograde de type sémantique était temporellement graduée alors que la mémoire rétrograde de type épisodique ne l'était pas. Par ces constatations, Nadel et Moscovitch et leurs collaborateurs (Lynn Nadel et Moscovitch 1997; Lynn Nadel et Hardt 2011) ont proposé une théorie alternative à celle de Marr, **la théorie des traces multiples**. Ainsi, les patients amnésiques avec lésions de l'hippocampe semblaient être capables de rappeler des souvenirs anciens de type sémantique comme des dates historiques ou des règles de calculs, alors qu'ils ne pouvaient en aucun cas accéder à des souvenirs anciens de type épisodique. L'hypothèse était donc que pour ces souvenirs riches en détails contextuels, l'hippocampe reste engagé quel que soit l'âge du souvenir (Maguire et Frith 2004). Cette théorie des traces multiples propose aussi qu'au moment du rappel, il existe un ré-encodage qui a pour conséquence une "mise à jour" du souvenir en créant ainsi une nouvelle trace (Maguire et Frith 2003). Ces traces sont donc ré-encodées par l'hippocampe et reconsolidées au niveau cortical pour donner de nouvelles versions du souvenir initial. Contrairement à la consolidation d'une information qui intervient lors du stockage, pour la première fois, la reconsolidation (mémoire active → mémoire inactive) fait suite au rappel d'un souvenir (mémoire inactive → mémoire active) (Lewis 1979).

Enfin, plus récemment, **la théorie de la transformation** se base sur la théorie des traces multiples, notamment pour les souvenirs épisodiques hippocampo-dépendants (riches en détails contextuels). Cette théorie stipule que ces souvenirs se transforment en une version épurée, plus simple voire schématique, dépendante, cette fois, du néocortex (Winocur *et al.* 2010). Ainsi, la consolidation systémique mène à une transformation d'un souvenir épisodique récent et hippocampo-dépendant (théorie des traces multiples) à un souvenir ancien qui, en fonction du contexte de rappel, peut soit garder des éléments du contexte (nature épisodique), restant ainsi dépendant de l'hippocampe pour son rappel, soit s'exprimer sous une forme schématique et dépendant donc uniquement du cortex pour son rappel (Sekeres *et al.* 2018).

II. Le cas particulier de la mémoire spatiale

II.1. Définition

La mémoire spatiale est définie comme la mémoire des lieux, des espaces, ou encore des parcours que l'on apprend pour nous déplacer (aller de notre appartement au travail, ou encore se rendre à la pharmacie de quartier) (Smith et Milner 1981). Cette mémoire est

indispensable pour l'animal comme l'Homme pour retrouver sa tanière, sa nourriture, échapper à un prédateur, construire un foyer …

Chez l'Homme, elle est une composante de la mémoire épisodique, elle représente le contexte, la dimension spatiale de nos souvenirs personnels (Burgess *et al.* 2002). Au sein de la mémoire spatiale, on distingue la **mémoire spatiale de référence** qui correspond au stockage à long terme des informations spatiales comme par exemple la localisation d'une plateforme immergée dans la piscine de Morris (tâche de mémoire spatiale chez l'animal, Olton 1979; R. Morris 1984) . Lorsque ces informations sont utilisées et manipulées pour s'orienter vers la plateforme lors de chaque essai (si l'on garde l'exemple précédent), il s'agit alors de la **mémoire spatiale de travail,** une forme de mémoire à court terme.

II.2. Stratégies et représentations spatiales

Lorsqu'une personne ou un animal se déplace ou "navigue" dans son environnement, il a la possibilité de se repérer par deux stratégies différentes, l'une basée sur sa position au sein de l'environnement spatial, ou stratégie égocentrique, et la seconde qui prend en compte les liens entre les informations spatiales (par ex, configuration des informations visuelles et leur lien dans l'espace), ou stratégie allocentrique.

II.2.1. Informations égocentriques

Les informations égocentriques sont centrées sur l'individu et notamment sur la position et le déplacement de son propre corps, même dans l'obscurité. Une stratégie égocentrique vise donc à atteindre un but en effectuant une succession de mouvements du corps. En 1978, cette représentation est comparée à un système de "routes" par O'Keefe et Nadel (John O'Keefe et Nadel 1978). De nos jours, la navigation basée sur des informations égocentriques pourrait être comparée à un trajet guidé par un GPS "tournez à droite, puis prenez la seconde à gauche, dans 50 mètres serrez à droite, etc.". Cependant, ce système de navigation est peu flexible, comme par exemple avec une route barrée ou en partant d'un point différent.

II.2.2. Informations allocentriques

Les informations allocentriques se composent de repères spatiaux (visuels, olfactifs, tactiles et auditifs) reliés entre eux afin de former un réseau sous forme de "carte cognitive, soit une représentation/un codage de l'environnement" (John O'Keefe et Nadel 1978). Cette

représentation allocentrique est dépendante de l'hippocampe et est, quant-à-elle, flexible. En effet, elle est indépendante de la position et de la direction vers laquelle se dirige l'individu et permet de faire face à de petites modifications de l'environnement (telles qu'une route barrée ou encore la création d'une nouvelle rue). Ces nouveaux éléments sont alors intégrés à la carte cognitive qui est ainsi "mise à jour".

Au quotidien, nous utilisons ces deux stratégies en parallèle afin de pallier tous les changements environnementaux et ainsi avoir une navigation optimale (Burgess 2006).

II.3. Une structure clé : l'hippocampe

L'hippocampe doit son nom à Giulio Cesare Aranzi, anatomiste du 16ème siècle, qui remarqua que cette structure cérébrale ressemblait chez l'Homme à l'animal marin. L'hippocampe est présent chez tous les mammifères, même chez les plus primitifs où l'on retrouve une structure embryologique appelé pallium médian (Aboitiz *et al.* 2003).

Dans le cadre de la recherche, les études sont réalisées principalement chez trois espèces : l'humain (analyses *in vivo* en imagerie cérébrale (IRM, PET Scan) et *ex vivo* en post-mortem), le rongeur (rat ou souris) et plus rarement le primate non humain (ex : singe macaque rhésus).

II.3.1. Organisation anatomique

L'hippocampe (Hip) est une structure bilatérale se situant dans le lobe temporal médian, sous les parties temporales et postérieures du néocortex. Il possède deux amygdales à ses extrémités et se place dans le prolongement du fornix.

Chez le rat, l'hippocampe mesure 10 mm de longueur, 3,5 mm de largeur pour 1,5 à 2 mm d'épaisseur environ, ce qui représente une proportion plus élevée chez le rat que chez l'Homme. On y distingue 2 parties : la partie dorsale et la partie ventrale (Figure 11). Plus récemment a été décrite une zone entre les deux, dite intermédiaire (Fanselow et Dong 2010).

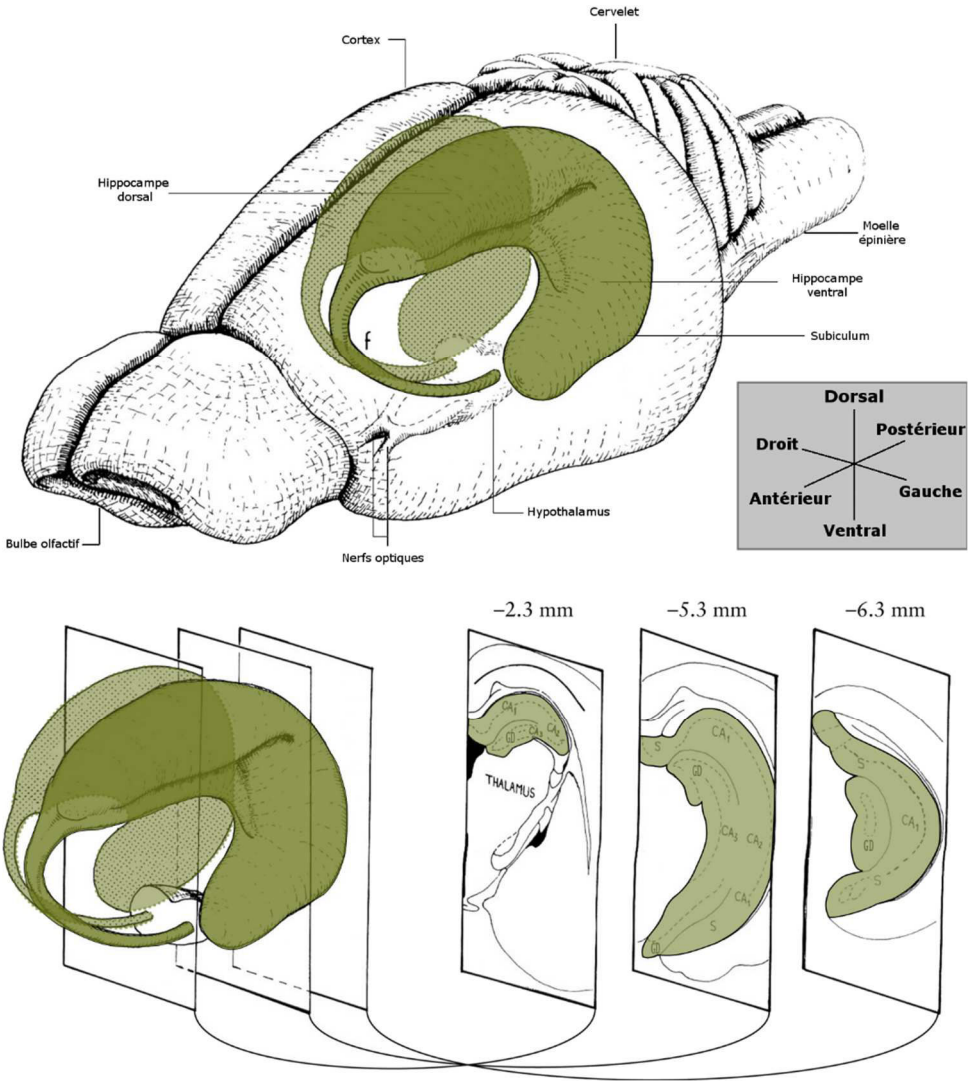


Figure 11 : Représentation et orientation de l'hippocampe au sein d'un cerveau de rat.
En dessous, les trois sections coronales montrent l'organisation des trois subdivisions de la Corne d'Ammon (CA), du gyrus denté (GD) et du subiculum (S), selon l'axe antéro-postérieur. Les coordonnées sont calculées à partir du point Bregma. Adapté de Cheung et Cardinal, 2005.

L'Hip dorsal est bordé antérieurement par le septum et postérieurement par le cortex entorhinal. Au niveau ventral, il est bordé par le thalamus et au niveau dorsal par le cortex pariétal et occipital. Les deux Hip, gauche et droit, sont reliés ensembles par le corps calleux. L'Hip ventral, quant-à-lui, est bordé antérieurement par le ventricule latéral, et postérieurement et latéralement par des parties du cortex pariétal, occipital et temporal.

Au sein de ces trois sections se trouvent trois sous-structures : la corne d'Ammon (CA), le gyrus denté (GD) et le subiculum. La première est encore subdivisée, selon leurs différences morphologiques et leurs connexions anatomiques intrinsèques et extrinsèques, en trois : CA1, CA2 et CA3.

II.3.2. Connexions de l'hippocampe

Les connexions de l'hippocampe sont nombreuses et se classent en deux catégories : les connexions intrinsèques et extrinsèques.

Les connexions intrinsèques permettent une communication entre les différentes sous-parties de l'hippocampe (CA1, CA3 et GD). Elles sont principalement unidirectionnelles et forment une boucle trisypnatique. L'entrée de cette boucle est le cortex entorhinal d'où proviennent les voies afférentes, qui projettent sur le GD, qui à son tour projette sur CA3, puis sur la région CA1. Cette dernière reçoit également des projections directes du cortex entorhinal, puis projette sur le subiculum, qui est la principale voie de sortie du l'hippocampe, clôturant ainsi la boucle intrinsèque (Henke 2010).

Les connexions extrinsèques permettent un dialogue entre l'hippocampe et les autres structures cérébrales. L'hippocampe est connecté de manière réciproque à un grand nombre de structures corticales et sous corticales. Les principales voies d'entrée de l'hippocampe arrivent du néocortex (cortex perirhinal et parahippocampique) *via* le cortex entorhinal. Le complexe amygdaloïde projette également sur CA1 et le subiculum. Quant à la région CA3, elle reçoit principalement des connexions afférentes provenant du septum et qui projettent à leur tour sur le noyau septal médian. Les régions CA1, CA2, CA3 et GD reçoivent des projections noradrénergiques et sérotoninergiques du tronc cérébral. Enfin, parmi les projections thalamiques sur l'hippocampe, on peut citer celles provenant des noyaux de la ligne médiane ventrale du thalamus (noyaux réuniens et rhomboïde), permettant notamment le relais entre le cortex préfrontal médian et la région CA1 d'une part et le subiculum d'autre part (Cassel *et al.* 2013).

II.3.3. Codage neuronal de l'environnement

En 1971, O'Keefe et Dostro*vs*ky mettent évidence, chez le rat, que certaines cellules de l'hippocampe montrent une grande activité brève, lors d'un enregistrement électrophysiologique. En effet, lorsque le rat explore librement son environnement, l'activité de ces cellules augmente selon la place du rat et donc du lieu où il se trouve. Ils nomment ces cellules "**cellules de lieu**" et les définissent comme "des neurones codant pour un endroit précis de l'espace et dont l'activité dépend de la position de l'animal dans son environnement" (J. O'Keefe et Dostro*vs*ky 1971). Cette activité ne dépend pas de l'orientation de l'animal, ni de la direction qu'il emprunte. Elle correspond au champ d'activité, c'est-à-dire à la partie de l'environnement dans laquelle la cellule de lieu décharge fortement à chaque fois que le rat y

passe. Ce champ d'activité se crée en quelques minutes et peut rester stable pendant plusieurs semaines, avec une certaine flexibilité en cas de changement de l'environnement (Moser *et al.* 2008). Au niveau anatomique, ces cellules ont été mises en évidence, chez le rat, dans les régions hippocampiques CA1 et CA3 (Muller 1996).

En 1985, Ranck et Taube observent une autre population de neurones qui ne s'activent que lorsque la tête de l'animal bouge (Taube *et al.* 1990). **Ces cellules d'orientation de la tête** s'activent indépendamment de la position du rat dans son environnement. Mises en évidence dans le présubiculum dorsal, elles ont ensuite été retrouvées dans les noyaux thalamiques antérieurs et réuniens, le striatum dorsal et le cortex rétrosplénial (Taube et Muller 1998; Jankowski *et al.* 2014).

En 2005, Hafting et collaborateurs ont découvert que des cellules s'activent en plusieurs points de l'environnement (formant une grille) : **les cellules de grille** (Hafting *et al.* 2005). Sargolini et collaborateurs remarqueront en 2006 que certaines cellules sont à la fois des cellules de direction de la tête et de grille, dans le cortex entorhinal (Sargolini *et al.* 2006).

Enfin, Solstad et collaborateurs découvrent des cellules qui s'activent à proximité d'une paroi ou à la limite de l'environnement, ce sont **les cellules de bordure** (Solstad *et al.* 2008). On retrouve ces cellules, en plus du cortex entorhinal (où elles ont mises en évidence), dans le présubiculum, la parasubiculum, le subiculum et les noyaux réuniens (Jankowski et O'Mara 2015).

L'ensemble de ces cellules aux propriétés fonctionnelles spécifiques et complémentaires permettraient une représentation allocentrique de l'environnement dans lequel on évolue (Moser *et al.* 2008).

II.4. Le relai à long terme : le cortex préfrontal médian

II.4.1. Organisation anatomique

En 1948, Rose et Woolsey définissent le cortex préfrontal médian (CPFm) sur la base des projections du noyau médiodorsal du thalamus (Rose et Woolsey 1948). En effet, ce dernier semblait être l'unique noyau thalamique à innerver le CPFm. Cependant, cette caractérisation n'est plus valable de nos jours, car on sait que la ligne médiane du thalamus projette également sur cette partie du cerveau.

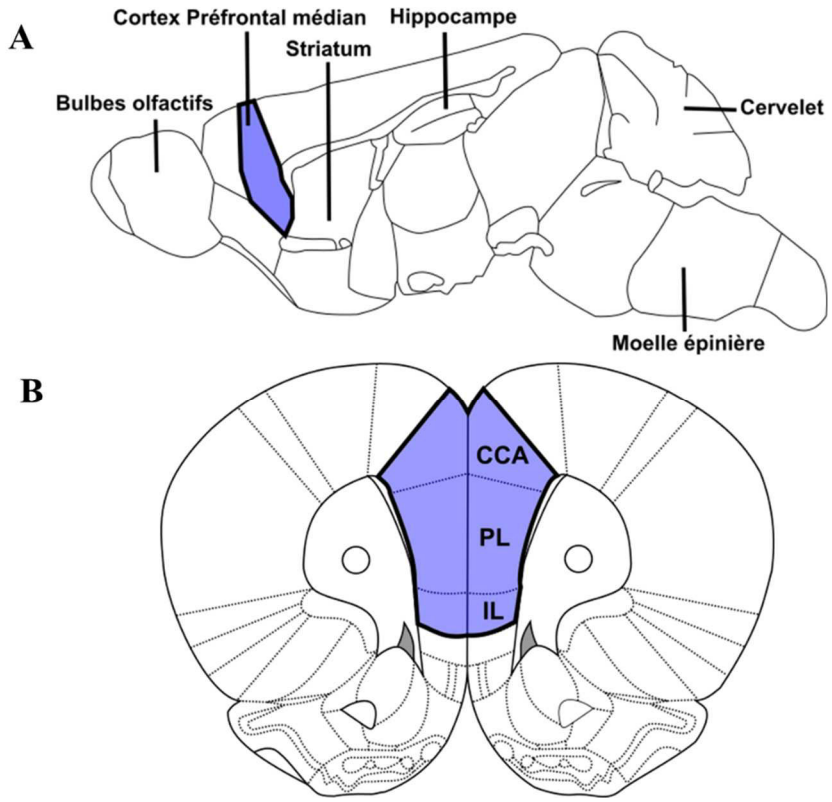


***Figure 12 :* Représentations du cortex préfrontal médian au sein d'un cerveau de rat.**

A : Représentation schématique d'une coupe sagittale d'un cerveau de rat, délimitation du CPFm en bleu. B : Coupe coronale adaptée de "The Rat Brain", G. Paxinos, délimitation du CPFm en bleu comportant les 3 subdivisions principales : Cortex Cingulaire Antérieur (CCA), Cortex Prélimbique (PL) et Cortex Infralimbique (IL)

Le CPFm se situe au niveau de la partie antérieure du lobe frontal du cerveau, soit en avant des régions prémotrices (Figure 12A). Chez le rat, il est divisé en quatre sous-régions : le cortex agranulaire médian (AGm), le cortex cingulaire antérieur (CCA), le cortex prélimbique (PL) et le cortex infralimbique (IL) (Figure 12B).

II.4.2. Connexions du CPFm

Au sein du CPFm, les quatre sous-structures sont fortement connectées entre elles (**connexions intrinsèques**). Elles reçoivent des **connexions extrinsèques** communes provenant de CA1, du noyau basolatéral de l'amygdale, de l'aire tegmentale ventrale, des noyaux supramammillaires et du tronc cérébral (noyaux du raphée, claustrum et locus coeruleus) (Hoover et Vertes 2007).

En dehors de ces afférences communes, le CPFm se divise en 2 parties : dorsale et ventrale. Le CPFm dorsal (CCA et AGm) reçoit principalement des projections venant des aires sensorimotrices mais également des noyaux de la ligne médiane du thalamus (Hoover et Vertes 2007). Le CPFm ventral (PL et IL) reçoit également des afférences de la ligne médiane du thalamus, mais aussi des afférences venant du système limbique (CA1 ventral, cortex parahippocampique et cortex orbital) (Hoover et Vertes 2007).

Pour les voies efférentes, on observe également des différences entre la partie ventrale et dorsale. La première projette fortement vers les régions sensori-motrices telles que le cortex moteur et somatosensoriel, le striatum dorsal, les noyaux ventraux et latéraux du thalamus. Il existe des projections sur les régions limbiques, mais celles-ci restent moins importantes que les précédentes (Vertes 2004). La partie ventrale du CPFm projette principalement sur le noyau accumbens, l'amygdale et les noyaux de la ligne médiane du thalamus (Vertes 2002).

Du fait de ces connexions différentes entre le CPFm dorsal et ventral, ces deux parties endossent des rôles différents. Alors que la partie dorsale du CPFm serait plutôt impliquée dans les comportements moteurs, le CPFm ventral sera associé aux processus cognitifs, mnésiques et émotionnels (Hoover et Vertes 2007; Vertes 2006).

II.4.3. Implication du CPFm dans la mémoire

On sait que le CPFm, contribue aux fonctions exécutives, c'est-à-dire "l'ensemble des processus dont la fonction principale est de faciliter l'adaptation du sujet à des situations nouvelles, comme lors d'actes de routine" (Godefroy *et al.* 2008). De ce fait, le CPFm est impliqué dans des processus attentionnels, le contrôle viscéromoteur, la planification, l'organisation d'une tâche et dans la prise de décision (Dalley *et al.* 2004).

L'implication du CPFm dans les processus mnésiques a été montrée dans un premier temps dans la mémoire de travail (P. Gisquet-Verrier et Delatour 2006), puis dans la mémoire à long terme ancienne (rev Frankland et Bontempi 2005) mais il est également impliqué dans le rappel d'une mémoire à long terme récente (ex: Cholvin *et al.* 2016).

Tout comme l'hippocampe, le CPFm est nécessaire au rappel d'un souvenir spatial (Cholvin *et al.* 2016).

Chapitre 3 : Modifications moléculaires en lien avec la plasticité cérébrale et la mémoire

La synthèse *de novo* de protéines est nécessaire à la mise en place d'une mémoire, et la formation des souvenirs ne se fait pas sans modification de l'expression des gènes (pour revue voir, C. M. Alberini 2009).

I. Régulations de l'expression des gènes

I.1. ADN et structure

L'ADN d'une cellule eucaryote est organisé en une structure complexe, composée d'ADN et de protéines, que Flemming a appelé chromatine pour la première fois en 1878. L'ADN est très compacté dans le noyau de chaque cellule, notamment par enroulement autour des nucléosomes. Ces derniers sont constitués d'un octamère d'histones (H) autour duquel s'enroulent 146 paires de base d'ADN (Caputi *et al.* 2017) (Figure 13). Chaque octamère est constitué de deux copies de chaque histone : 2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4. Afin de stabiliser le nucléosome, une cinquième histone est présente à l'extérieur de celui-ci ; l'histone H1 (Figure 13).

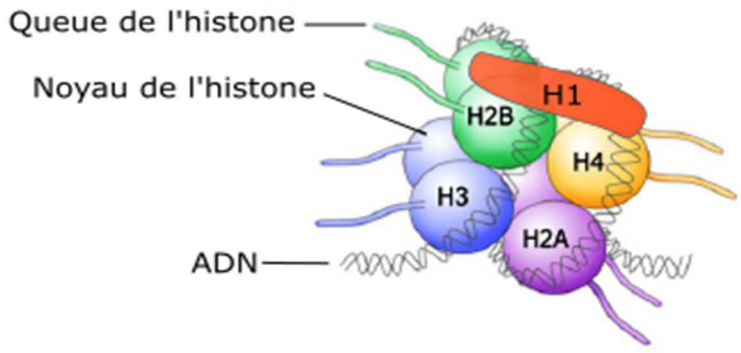


Figure 13 : Représentation schématique du nucléosome.
Adapté de Gräff et Mansuy 2008. Il est composé d'un octamère d'histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4), ainsi que de l'histone H1. Chacune des histones composant l'octamère est composée d'un noyau et d'une queue portant les modifications épigénétiques.

Les histones sont des petites protéines de 11 à 22 kDa, chargées positivement et constituées d'un noyau rond et d'une extrémité N-terminale. Les charges positives permettent aux histones d'interagir avec l'ADN qui, lui, est négatif.

Cette configuration spécifique permet de compacter l'ADN de 5 à 10 fois et ainsi d'obtenir une fibre de 11 nm en forme de "collier de perles". La chromatine existe sous deux

formes principales : l'hétérochromatine, très fermée, et dont le niveau de compaction ne permet pas à la machinerie transcriptionnelle d'accéder à la séquence des gènes, et l'euchromatine, très ouverte, où sont localisés les gènes fortement exprimés. Dans cet état, la chromatine est accessible aux facteurs de transcription, aux complexes enzymatiques associés, ainsi qu'à la machinerie transcriptionnelle, qui *in fine*, permettra la transcription en ARN messager.

Il existe de multiples états de compactage entre ces deux formes fermée et ouverte de la chromatine. Le changement d'état, entre hétérochromatine et euchromatine, se fait par les modifications épigénétiques. Ainsi, de petites portions de la chromatine modifient leur degré de compaction et régulent l'expression des gènes (Swaminathan *et al.* 2014).

I.2. Machinerie transcriptionnelle et synthèse d'ARN

En réponse à un stimulus, interne ou environnemental, une cellule eucaryote doit être capable de modifier son profil d'expression génétique. Un message de régulation est conduit dans la cellule jusqu'au noyau où l'ADN sert alors de matrice au cours de l'étape de transcription pour la synthèse de l'ARN. La nouvelle molécule ainsi formée est maturée et transportée dans le cytoplasme. Elle sert à son tour de matrice pour la traduction et permet la synthèse des protéines (Orphanides et Reinberg 2002). Chez les eucaryotes, il existe quatre ARN polymérases nucléaires (de I à IV). Seule l'ARN polymérase II sert à la transcription de petits ARN non codants et à la transcription des ARN messagers nécessaires à la synthèse des protéines.

La transcription est divisée en trois grandes étapes : l'initiation (synthèse des premiers nucléotides), l'élongation (allongement de la chaîne d'ARN) et la terminaison (relâchement de l'ARN et départ de la machinerie de transcription de l'ADN).

L'initiation est la première étape de la transcription. L'ARN Pol II n'est pas capable de démarrer seule la synthèse d'ARN au niveau d'un promoteur. Ce dernier est composé de plusieurs éléments de base : la boite TATA, l'initiateur, l'élément de reconnaissance par TFIIB (*B recognition element*, BRE) et l'élément promoteur aval DPE (*Downstream Promotor Element*) (Hampsey 1998).

L'initiation de la transcription nécessite la présence de facteurs auxiliaires, appelés facteurs généraux de transcription : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH (Roeder 1996). Le promoteur est reconnu par le complexe TFIID/TBP (*TATA box Binding Protein*)

puis TFIIA et TFIIB viennent ensuite se fixer. Cette structure est ensuite fixée par TFIIF associé à Pol II (Figure 14). Enfin, TFIIE vient s'associer sur la structure TFIID/A/B/F/Pol II et permet le recrutement de TFIIH en interagissant avec ce dernier (C. M. Alberini 2009)

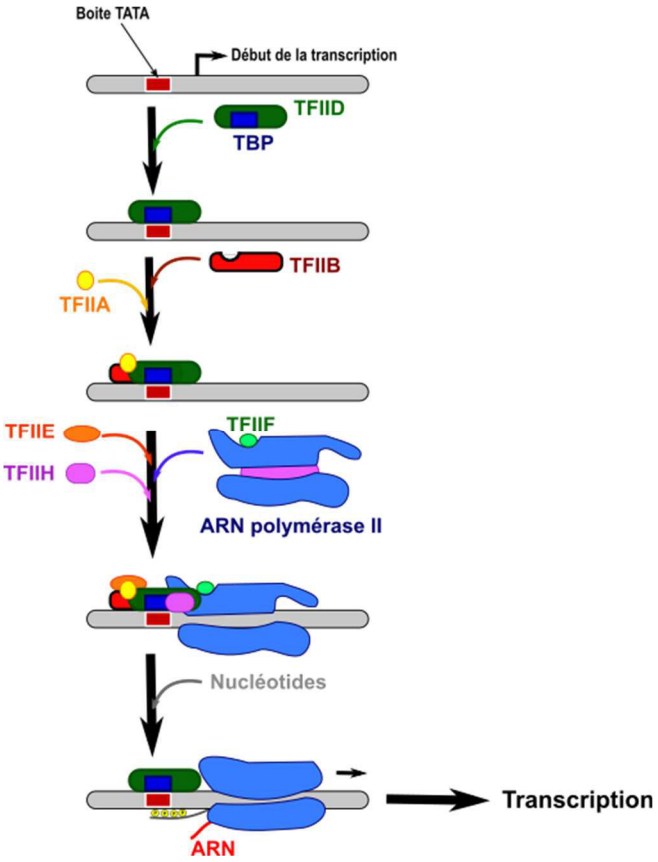


Figure 14 : Initiation de la transcription par recrutement des différents facteurs de transcription : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH et Pol II., adapté de C. M. Alberini 2009.

Tous les facteurs d'initiation de la transcription étant correctement assemblés au niveau du promoteur, le complexe de pré-initiation est alors prêt à entrer dans la phase d'initiation de la transcription proprement dite. Les deux brins d'ADN se séparent par l'action hélicase de TFIIH et Pol II se dissocie des facteurs de transcription (Holstege *et al.* 1996). L'initiation de la synthèse de la chaîne d'ARN, par la formation de la première liaison phosphodiester, aboutit à la formation d'un dinucléotide. Lorsque la chaine d'ARN est de 10 nucléotides, le complexe de transcription est considéré comme stable et la "bulle" de transcription se déplace. En amont de cette "bulle", l'ADN retrouve sa forme double brin.

La réaction d'initiation s'achève enfin par le départ des facteurs d'initiation de la "bulle" de transcription. TFIIB part en premier, suivi de TFIIE, de TFIIF (bien que faisant également partie des facteurs d'élongation, il peut se dissocier lors de l'initiation puis se réassocier lors de l'élongation) et TFIIH (Jiang *et al.* 1996).

Lors de **l'élongation**, l'ARN Pol II transcrit *in vivo* entre 1200 et 2000 nucléotides par minute. L'élongation de la transcription débute quand les facteurs d'élongation prennent place aux côtés de la polymérase, chassant ainsi les facteurs d'initiation. TFIIF s'associe directement à l'ARN Pol II, induisant un changement de conformation de l'enzyme et l'empêchant ainsi de s'arrêter au niveau des sites de pause transitoires. Ensuite, l'élongine et ELL (facteur d'élongation de l'ARN polymérase II) permettent d'augmenter la vitesse de polymérisation de l'ARN, tout en supprimant les pauses. Dans le cas où la polymérisation de l'ARN s'arrête quand même, la protéine TFIIS permet une nouvelle synthèse de l'ARN après le clivage du précédent. Enfin p-TEFb (autre facteur d'élongation) stimule l'élongation par phosphorylation alors que les facteurs DSIF, NELF et le facteur 2, eux, favorisent l'arrêt de la polymérase (Kwak et Lis 2013).

La terminaison de la transcription est un processus compliqué et important pour le recyclage de Pol II, car un défaut de terminaison peut entrainer une baisse significative du niveau d'expression des gènes situés après le gène transcrit (Richard et Manley 2009). La fin du gène est constituée d'une série de plusieurs adénines qui indique à l'ARN Pol II de s'arrêter. Le complexe subit alors de nombreuses phosphorylations indiquant qu'il faut cliver l'ARN messager (relargué dans le noyau) et recycler l'enzyme Pol II (Richard et Manley 2009).

II. Gènes précoces, facteurs de transcription et voies de signalisation associés à la mémoire

II.1. Les gènes immédiats précoces

Les gènes précoces (ou "*IEGs*" pour *Immediate Early Genes*) sont des gènes transcrits très rapidement lors de l'apprentissage. Ils jouent un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire à long terme (Cristina M. Alberini et Kandel 2015). Certains d'entre eux sont également qualifiés de facteur de transcription et peuvent être regroupés en plusieurs familles Fos (*c-fos, Fosb* ou encore *Fosl 1*et 2), Jun (*JunB* et *JunD*), Egr pour *Early growth response* (*Egr1*, appelé également *Zif 268*, *KROX24* et *NGF1-A*) et les récepteurs nucléaires (ex : *Nr4a1*).

Les IEGs les plus étudies sont *c-fos*, *Egr1* et *Arc* (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*). Les deux premiers sont des facteurs de transcription (FT) qui régulent des gènes plus tardifs alors qu'*Arc* code pour une protéine effectrice.

Pour *c-fos*, suite à une activation neuronale, la CaMKIV est activée par les entrées de calcium dans le noyau et phosphoryle le FT CREB (Bading 2013). CREB-Phosphorylé favorise alors la transcription du gène *c-fos* grâce au recrutement de co-activateurs transcriptionnels tels que CBP/p300 (Chrivia *et al.* 1993; Kwok *et al.* 1994; Lundblad *et al.* 1995). Ce gène est également sous la régulation du FT SRF (*serum-response factor*), présent sous forme de dimère et associé à une protéine TCF (*ternary complex factor*) telle que Elk-1 (*E twenty-six-like transcription factor*) (Sheng et Greenberg 1990). La phosphorylation de cette protéine par ERK contrôle la transcription de *c-fos* (Besnard *et al.* 2011). Grâce aux approches par ChIP-Seq, l'activation de *c-fos* par de multiples voies est maintenant bien documentée au niveau de son promoteur proximal, mais également au niveau de ses séquences régulatrices distales (enhancers) (Joo *et al.* 2016). La protéine c-fos, une fois synthétisée, va se lier à une autre protéine (de la famille Jun ou Fos) et ainsi former le complexe AP-1 (*activator protein 1*), qui en tant que FT favorise la transcription de gènes plus "tardifs" possédant un domaine TRE (*tetradecanoyl phorbol acetate response element*) (Benito *et al.* 2011). Dans ces gènes plus "tardifs" on retrouvera des gènes codants pour des récepteurs membranaires ou encore des protéines de structure pouvant élargir la synapse et modifier l'excitabilité synaptique (Lyons et West 2011).

Pour *Erg1*, sa transcription dépend également de la phosphorylation du FT Elk-1 par la voie de ERK/MAPK et notamment de l'activation ERK par cette voie de signalisation. Une fois phosphorylé, Elk-1 entre dans le noyau et s'associe à SRF afin de recruter sur le site SRE des co-activateurs de la transcription tels que CBP et p300 (Lavaur *et al.* 2007). Une fois la protéine Egr1 synthétisée, elle joue le rôle de FT modulant l'expression de différents gènes afin de maintenir une PLT tardive et la mémoire spatiale à long-terme (Penke *et al.* 2011, 2014).

Pour *Arc*, c'est différent, car il code une protéine effectrice et non un FT. De plus, en cas de stimulus, son ARNm peut être adressé au niveau des dendrites pour une traduction locale, contrairement à *c-fos* et *Egr1* (Peebles *et al.* 2010). Son promoteur est constitué d'un domaine SARE (*synaptic-activity responsive element*) distal comprenant trois sites de fixation : CRE, MRE (*myocyte enhancer factor 2* ou MEF2 *binding site*) et SRE. La cascade

ERK/MAPK est également impliquée dans la transcription de ce gène (Antoine *et al.* 2014; Hunter *et al.* 2017).

L'expression des IEGs est transitoire mais cruciale pour réguler l'expression d'autres gènes tardifs liés à des modifications neuronales stables et durables, comme la croissance des neurones ou encore la plasticité synaptique (Cristina M. Alberini et Kandel 2015). Des études expérimentales (chez l'animal) sur l'inhibition et la suppression des protéines c-fos, Zif 268 et Arc ont montré une altération de la consolidation de la mémoire à long terme sans affecter l'apprentissage ou la mémoire à court terme (Minatohara *et al.* 2016), soulignant l'importance de l'activation de gènes cibles par ces gènes précoces pour la formation d'une mémoire durable.

II.2. Facteurs de transcription et facteurs impliqués dans les processus mnésiques

II.2.1. CREB (c-AMP-responsive element binding protein)

CREB fait partit de la famille des FT dépendants de l'AMPc, composée de trois membres pour les mammifères : CREB, CREM (*response element modulator*) et ATF-1 (*activating transcription factor 1*) (Lonze et Ginty 2002). CREB est exprimée dans le noyau de toutes les cellules cérébrales. CREB se fixe sur des séquences spécifiques dont le site CRE (séquence de 8 paires de bases) est l'exemple le plus connu (Lonze et Ginty 2002). Pour que CREB soit active, elle doit être phosphorylée par le biais de différentes voies impliquant des kinases (PKA, CaMKIV, MAPK) (Benito et Barco 2010). Une fois activée, CREB peut recruter d'autres complexes protéiques tel le co-activateur CBP.

La forme active de CREB est associée à la régulation de l'expression des gènes dans l'hippocampe ainsi que le maintien de la potentialisation à long terme ou PLT (pour revue, Barco et al 2002). Elle est également impliquée dans différents types de mémoire à long terme comme la mémoire spatiale, la mémoire émotionnelle ou encore olfactive (C. M. Alberini 2009; Benito et Barco 2010; Sakamoto *et al.* 2014).

Cependant, bien que CREB soit très étudiée dans la littérature, il existe d'autres FT tel que NF-κB.

II.2.2. NF-κB (nuclear factor kappa B)

NF-κB est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifères. Il possède un domaine Rel, contenant des séquences qui permettent la localisation nucléaire de ces FT, leur fixation à l'ADN, leur dimérisation et leurs interactions avec le complexe inhibiteur IκB. L'activation de la voie NF-κB permet le recrutement d'un autre complexe composé de protéines kinases qui phosphoryle le complexe IκB, ce qui engendre la dégradation du complexe IκB (par ubiquitination) par le protéasome. Cette dégradation libère les dimères, les entrainant dans le noyau et ainsi ils peuvent activer la transcription des gènes cibles (Meffert et Baltimore 2005).

Deux études publiées en 2003 (Lilienbaum et Israël 2003; Meffert *et al.* 2003) ont montré, *in vitro*, d'une part que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs au glutamate de type NMDA entrainait une diminution de l'activité de NF-κB et d'autre part, à l'inverse, qu'une augmentation du taux de calcium intracellulaire induisait l'activation de la CaMKII et au final de NF-κB. Ces études ont été rapidement confirmées *in vivo* par stimulation à haute fréquence induisant la PLT au niveau de la voie perforante dans l'hippocampe (Freudenthal *et al.* 2004). Une autre étude (Kaltschmidt *et al.* 2006) sur le lien entre NF-κB et la PLT a montré qu'une sur-activation d'IκB engendrait des déficits de PLT chez la souris dans le cerveau antérieur. Enfin, de nombreuses études ont également montré l'implication de NF-κB dans la transcription de gènes, la plasticité et la mémoire à long terme (Salles *et al.* 2017; Kaltschmidt et Kaltschmidt 2015).

II.2.3. BDNF (brain-derived neurotrophic factor)

Le BDNF est un facteur neurotrophique appartenant à une famille composée de trois autres membres : NGF (*nerve growth factor*), NT-3 (*neurotrophine 3*) et NT-4/5 (*neurotrophine 4/5*). Il existe deux voies de sécrétion du BDNF : la voie constitutive permettant la libération du précurseur du BDNF (le proBDNF) indépendamment des niveaux de calcium de la cellule; et la voie régulée qui libère du BDNF mature sous le contrôle neuronal et du niveau de calcium intracellulaire (Lessmann et Brigadski 2009). Le BDNF et son récepteur transmembranaire TrkB (*tropomyosin-related kinase B*) sont tous les deux co-localisés au niveau des synapses glutamatergiques pré- et post-synaptiques dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Bramham et Messaoudi 2005).

La fixation du BDNF sur TrkB conduit à l'activation de trois voies de signalisation intracellulaires : PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*), ERK/MAPK et PLCγ (phospholipase C γ) (pour revue Cunha et al 2010). La première voie de signalisation (PI3K) est principalement impliquée dans la survie cellulaire et la croissance neuronale, alors que la voie ERK/MAPK est plutôt impliquée dans la transmission synaptique et l'expression des gènes (*via* CREB). Enfin, la voie PLCγ produit le DAG (diacylglycérol) et l'IP3 (inositol-triphosphate). Ce dernier se fixe sur les récepteurs du réticulum endoplasmique et induit une libération de calcium qui se lie à son tour à la calmoduline afin d'activer différentes kinases. Le DAG et le calcium vont alors activer la PKC (protéine kinase C), qui va activer des FT (*via* CaMKII) afin de réguler l'activité transcriptionnelle (R. Blum et Konnerth 2005).

Le BDNF est important dans la différenciation et la survie neuronale (Bekinschtein *et al.* 2014) et dans le développement et l'arborisation dendritique (Danzer *et al.* 2002). Mais il est également très impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire et dans la PLT (Bekinschtein *et al.* 2014; Cunha *et al.* 2010).

II.2.4. La voie ERK/MAPK et mémoire

Dans la littérature, il est maintenant admis que l'induction de l'expression de gènes est importante dans la plasticité synaptique sous-tendant l'apprentissage et la mémoire (Kandel 2001; C. M. Alberini 2009). Ces processus dépendent de voies de signalisation impliquant des MAPK, dont les plus étudiées sont la voie AMPc/PKA (voir paragraphe CREB) et la voie ERK/MAPK. Cette dernière est activée par l'entrée de calcium dans la cellule. Cette entrée de Ca^{2+} passe par les récepteurs glutamatergiques NMDA et permet de moduler deux types de protéines : les GEF (*guanyl nucleotide exchange factors*) et les GAP (*GTPases-activating proteins*). Ces protéines ont pour rôle d'activer (GEF) ou de désactiver (GAP) la protéine Ras qui à son tour active MEK (MAPK/ERK kinase) par phosphorylation. Enfin, la dernière étape est l'activation des protéines ERK (1 et 2) par phosphorylation *via* MEK (Thomas et Huganir 2004; McCain 2013).

La voie des MAPK/ERK joue un rôle très important dans la mise en place de la potentialisation à long terme et notamment ERK, comme l'ont montré English et Sweatt en 1997, pour la première fois, sur des coupes d'hippocampe de rats (l'utilisation d'un inhibiteur de MEK atténuait la PLT) (English et Sweatt 1997). Depuis cette première mise en évidence, l'implication de la voie MAPK/ERK a été très étudiée dans le domaine de la potentialisation à

long terme (PLT) (Selcher *et al.* 2003; Kelleher *et al.* 2004) et la dépression à long terme (DLT) (Thiels *et al.* 2002; Lindecke *et al.* 2006). Il a également montré que cette voie est impliquée dans l'apprentissage (S. Blum *et al.* 1999; Giovannini 2011) et la mémoire à long terme spatiale (Atkins *et al.* 1998; Hebert et Dash 2002; Kelleher *et al.* 2004) et émotionnelle (Trifilieff *et al.* 2006, 2007).

L'implication de la voie MAPK/ERK dans les processus mnésiques passe notamment par l'activation de MSK1, qui une fois phosphorylée, phosphoryle l'histone H3 et CREB. Cette dernière va pouvoir se fixer sur le site CRE et induire la transcription de gènes tels que *c-fos* et *Egr1* (Gräff et Tsai 2013).

III. Régulations épigénétiques et mémoire

Le premier à prononcer le terme "épigénétique" fut le biologiste Conrad H. Waddington en 1942, en le définissant comme "la branche de la biologie qui étudie les interactions entre les gènes et leurs produits qui sont à l'origine du phénotype". Cette définition a évolué au cours de ces dernières années. En 1999, Wolffe et Matzke définissent les modifications épigénétiques comme l'ensemble des modifications biochimiques héritables qui interviennent dans la régulation de la transcription génétique (Wolffe et Matzke 1999). Cependant, plus récemment, la définition de Wolffe et Matzke a été remise en question, par le fait que les cellules qui ne se divisent pas (ex: les neurones) comportent tout de même des modifications épigénétiques (Bird 2007). Finalement, Deans et Maggert concluent en 2015 (Deans et Maggert 2015) que "l'expression des gènes, la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la régulation des ARN sont toutes corrélées et regroupées sur le mot épigénétique". Ces modifications se produisent au sein du génome mais sans modifier la séquence nucléotidique et peuvent déterminer si un gène est exprimé et quand il le sera. Leur régulation permet la spécialisation tissulaire, qui inclut la répression ou l'activation de l'expression de certains gènes au sein du tissu, comme lors du développement embryonnaire (Karlić *et al.* 2010). Par exemple, le cerveau est composé de cellules gliales, de neurones et non de cellules cardiaques, et ceci grâce à l'activation de l'expression des gènes impliqués dans le développement neuronal et la répression de ceux impliqués au niveau cardiaque. Les régulations épigénétiques sont également réversibles et montrent l'influence de l'environnement sur le génome. Lorsque ces mécanismes sont altérés, il peut y avoir comme conséquence de nombreuses pathologies comme les cancers (Wolffe et Matzke 1999). A

l'heure actuelle, on pense qu'une altération de leur régulation est également impliquée dans les maladies neurodégénératives (Benito *et al.* 2015; Francelle *et al.* 2017; Berson *et al.* 2018; Chatterjee *et al.* 2018).

Les modifications épigénétiques des histones participent à la régulation de l'expression des gènes en modifiant la structure de la chromatine et en permettant le recrutement de co-activateurs transcriptionnels. Par conséquent, on pense que les modifications épigénétiques participent elles-aussi à la formation et la consolidation d'un souvenir (Cristina M. Alberini et Kandel 2015) en influençant notamment l'expression des récepteurs membranaires, la densité des épines dendritiques ou encore la formation de synapses (Smrt et Zhao 2010).

L'importance de l'acétylation des histones dans la consolidation d'un souvenir à long terme est illustrée dans les exemples suivants.

Une étude intéressante rapporte l'implication des acétylations d'histone dans le contexte de la mémoire ancienne chez le rat, dans un test de transmission sociale de préférence alimentaire impliquant des interactions hippocampo-corticales (Lesburguères *et al.* 2011). Les auteurs montrent que l'inactivation du cortex orbitofrontal au moment de l'encodage n'interfère pas avec l'acquisition de la tâche, mais empêche spécifiquement l'établissement d'une mémoire à long terme et abolit également l'augmentation de la densité des épines corticales qui y est normalement associée. Sur le plan cellulaire, cet étiquetage requiert l'activation des récepteurs au glutamate AMPA et NMDA et de la voie de signalisation des MAPK, ainsi que l'acétylation de l'histone H3. De plus, ils montrent que l'augmentation de l'acétylation de H3 par l'administration d'un inhibiteur de HDAC (le butyrate de sodium, dans le cortex orbitofrontal) au début de la phase de consolidation (15 premiers jours), augmente les performances lors d'un rappel en mémoire ancienne (rappel à 30 jours). Ainsi, ils concluent que la manipulation pharmacologique des modifications épigénétiques (acétylation d'histone) influe directement sur la persistance de la mémoire.

En 2010 au laboratoire, Bousiges et collaborateurs (Bousiges *et al.* 2010) ont mis en évidence, chez le rat, une augmentation de l'acétylation de H2B et de l'expression de l'acétyltransférase CBP après un apprentissage spatial au niveau de l'hippocampe dorsal, 1h après le dernier essai d'apprentissage (4 essais/jour, pendant 5 jours). Cependant, cette augmentation ne se produisait pas chez des rats lésés au niveau du cortex entorhinal et du septum médian. Ceci était corrélé avec le fait que ces rats lésés étaient incapables d'apprendre

la localisation de la plateforme et de s'en souvenir par rapport aux rats non-lésés. Lors de cette étude, l'association entre les gènes exprimés et les modifications des histones a été établie par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Les auteurs ont montré que l'acétylation de H2B est augmentée sur le promoteur proximal de gènes d'activité neuronale tels que *c-fos* ou *zif268/egr-1*, ainsi que sur le *bdnf*, dans l'hippocampe de rat au cours de l'apprentissage spatial. En 2013, cette même équipe a montré que l'acétylation de H2B semblait être spécifiquement associée à un apprentissage alors que l'acétylation des résidus K9K14 de l'histone H3 semblait être déjà modifiée par le traitement de l'information contextuelle (Bousiges *et al.* 2013). Par ailleurs, la perte d'acétylation de H2B dans l'hippocampe dorsal a été récemment associée à la perte des fonctions mnésiques et d'activité neuronale dans un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer et le rétablissement de cette acétylation avec un activateur des histones acétyltransférases CBP/p300 permet de restaurer ces fonctions chez ces souris (Chatterjee *et al.* 2018).

Outre les acetylations d'histones, des études sur les régulateurs de la méthylation de l'ADN montrent que les DNMTs sont indispensables pour la plasticité synaptique et l'apprentissage (C. A. Miller et Sweatt 2007; C. A. Miller *et al.* 2008; Heyward et Sweatt 2015). Une étude récente rapporte que la méthylation de l'ADN est particulièrement corrélée avec l'expression et le splicing de gènes de plasticité au cours d'un apprentissage (Halder et al., 2016). La méthylation de l'ADN n'est pas le seul processus important dans les processus de mémoire, la méthylation des histones joue un rôle conséquent dans la transcription de gènes impliqués dans la mémoire (Gupta *et al.* 2010; Kerimoglu *et al.* 2013; Halder *et al.* 2016).

Ces études montrent également que la relation de causalité entre les modifications épigénétiques par acétylation d'histone et l'expression de ces gènes dans les mécanismes de mémoire n'est pas encore clairement établie (Lopez-Atalaya et Barco 2014; Halder et al., 2016; Chatterjee et al., 2018).

Chapitre 4 : Effets des radiofréquences sur la mémoire et la plasticité cérébrale

Dans ce chapitre, nous ferons un point sur l'effet des RF sur la mémoire, tant au niveau comportemental que moléculaire chez l'animal. Les travaux sur les RF sont vastes et les publications citées dans ces parties ne constituent pas une liste exhaustive, mais représentent les différents résultats, modèles, systèmes d'exposition retrouvés dans la littérature. Ces articles seront concentrés sur les RF (8,3 KHz à 300 GHz), car les effets peuvent être différents avec des basses fréquences faibles et intermédiaires (ex 50 Hz; Liu et al. 2015; Y. Zhang et al. 2017; Akbarnejad et al. 2018) et ne sont pas le sujet de cette thèse.

I. Effets des RF sur les systèmes de mémoire

Depuis notamment les résultats de Lai publiés en 1994 (Lai *et al.* 1994) montrant des effets délétères sur la mémoire après une exposition aigüe aux RF (voir § mémoire à court terme), de nombreuses recherches se sont intéressées à l'impact des RF sur l'Homme comme sur l'animal. Leurs approches pour étudier les différents types de mémoire (mémoire à court terme, mémoire à long terme spatiale ou non spatiale) sont variables : tests comportementaux différents, rappels sans ou avec délai … Les paramètres d'exposition varient également d'une étude à l'autre (Figure 15) par leur système d'exposition (tête uniquement ou corps entier, cage d'élevage [libre de mouvement] ou en condition de contention [pas de mouvement]), par les fréquences utilisées (800-900 ou 1800-1900 ou 2400-2600 MHz, ou encore un signal Wi-Fi) ainsi que le DAS utilisé (d'une faible intensité [quelques mW/kg] à une très forte intensité [une dizaine de W/kg]). Enfin, le modèle utilisé est très différent entre les études, comme l'espèce (Homme, rat, souris), le sexe, l'âge des sujets ou animaux, modèle sain ou pathologique (inflammation, Alzheimer, …).

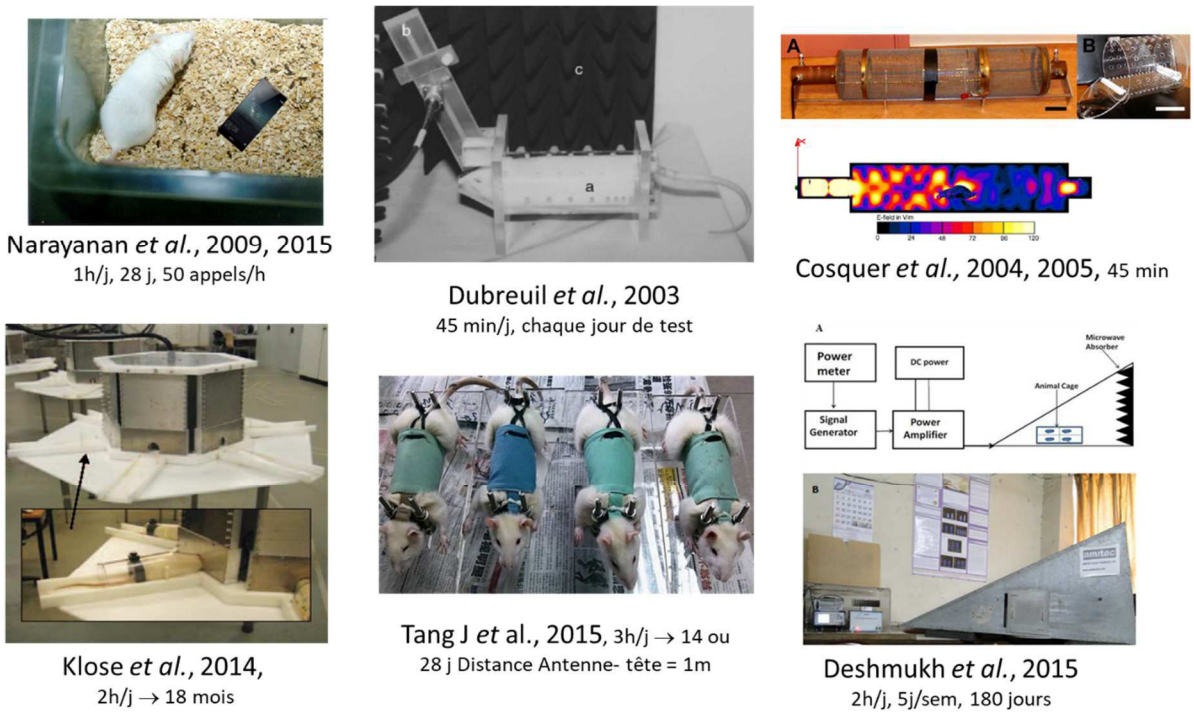


Figure 15 : Exemples de systèmes d'exposition utilisés dans les études sur les effets des RF.

I.1. RF et mémoire à court terme

Les principales études sur la mémoire à court terme ont été réalisées sur la mémoire de travail. Chez l'Homme, ce type de mémoire repose sur la manipulation d'une information encodée peu de temps avant d'effectuer la tâche demandée (voir § introduction correspondant). Cependant, chez l'animal, dans la mesure où la manipulation de l'information est difficile à évaluer, la notion de mémoire de travail pose question. Il s'agit le plus souvent en réalité d'une mémoire à court terme, c'est-à-dire où l'animal doit se souvenir de la localisation d'une plateforme ou d'un bras dans un labyrinthe au sein d'une même session, celui-ci ou celle-ci étant changé à chaque session de test (Bratch *et al.* 2016). L'introduction d'un délai entre 2 essais consécutifs est utilisée pour augmenter la difficulté de la tâche et tester la capacité à maintenir l'information acquise lors du 1er essai. Cependant, le terme mémoire de travail reste utilisé dans la littérature animale : celle-ci est le plus souvent spatiale mais peut-être non spatiale. Un 2^{e} test de mémoire à court terme (délai de quelques min à quelques heures) est la reconnaissance d'objets, qui existe en version spatiale (déplacement d'un objet) ou non spatiale (remplacement d'un objet).

Lai et collaborateurs (Lai *et al.* 1994) sont les premiers à mettre en évidence un impact important des RF sur la mémoire de travail chez le rat, après une exposition (matinale) de 45

min à un signal de 2450 MHz (DAS ~ 0,6 W/kg) dans des cylindres connectés à la source d'ondes EM. Après l'exposition, les rats ont été testés dans un labyrinthe radial à 12 branches, toutes appâtées. L'animal devait donc prendre la nourriture dans les 12 bras sans retourner dans un bras déjà visité (erreur). Les auteurs ont montré que les rats ayant reçu des RF faisaient plus d'erreurs que les rats Sham. Dans une deuxième expérience, ils ont traité les animaux (par injection IP avant l'exposition) avec un antagoniste du système opioïde (le naltrexone) ou un agoniste du système cholinergique (la physostigmine). Avec ces traitements, les effets des RF n'ont pas été retrouvés. Les effets délétères qui ont été mis en évidence seraient dépendants des systèmes cholinergique et opioïde.

Ces expériences ont été répliquées par 2 autres équipes avec exactement les mêmes conditions expérimentales, en 2004 (Brenda L. Cobb *et al.* 2004) et en 2004 et 2005 (Cassel *et al.* 2004; Cosquer, *et al.* 2005a). Ces équipes, dont une du laboratoire, ont répliqué exactement les techniques et les protocoles expérimentaux de Lai, aucune des deux n'a montré de déficits cognitifs dans la même tâche de mémoire de travail. De plus, l'étude de l'anxiété grâce au test du labyrinthe en croix surélevé montre l'absence d'effet anxiogène ou anxiolytique des RF, qui ne serait donc pas impliquées dans les performances altérées en mémoire spatiale des rats exposés aux RF de Lai et al (1994) (Cosquer, *et al.* 2005b).

Au début des années 2000, Dubreuil et collaborateurs (Dubreuil *et al.* 2002, 2003) ne montrent aucun déficit sur la mémoire de travail chez le rat. Pour cela, ils ont testé leurs animaux dans un labyrinthe radial à 8 branches et ont réalisé un test de reconnaissance d'objets (délai de 15 et 60 min entre l'entrainement et le rappel, voir § "Reconnaissance d'objet" pour le principe du test), après une exposition à un signal de 900 MHz (conditions de contention, DAS = 1 et 3,5 W/kg 45 min chaque jour de test). Des résultats identiques ont été obtenus avec le même test comportemental en 2014 lors d'une exposition chronique (900 MHz, 1h/jour, pendant 21 jours) avec un DAS plus faible, compris entre 0,05 et 0,18 W/kg (Maaroufi *et al.* 2014).

En 2014, une équipe allemande (Klose *et al.* 2014) ne montre également aucun impact des RF sur la mémoire à court terme (labyrinthe à 8 branches) après une exposition chronique (GSM 900 MHz, 2h/j, 5j/sem, 0,7 ou 2,5 ou 10 W/kg) sur toute la durée de vie du rat (J14 à 19 mois, études comportementales à 3 âges, juvéniles, adultes, préséniles).

Cependant, Shahin et collaborateurs (Shahin *et al.* 2015) ont exposé des souris de 3 mois aux RF, 2h/jour pendant 15, 30 ou 60 jours (2450 MHz, DAS = 0,015 W/kg). Ils ont mis

en évidence une diminution des performances en mémoire de travail (Piscine de Morris, où la plateforme est visible et où les indices spatiaux changent tous les jours) chez les animaux exposés. De plus, ils ont observé que cette altération des performances mnésiques était d'autant plus importante que la durée d'exposition était grande. La même équipe (Shahin *et al.* 2018) a obtenu le même résultat avec le labyrinthe à 8 branches (mêmes conditions expérimentales), mais cette fois pour toutes les durées d'exposition.

Ces résultats chez l'animal sur la mémoire à court terme, appelée aussi mémoire de travail, ne peuvent amener une conclusion définitive sur l'effet des RF, même si la majorité des études n'a pas montré d'effet délétères des RF sur ce type de mémoire. Ces données posent cependant la question de l'impact possible des RF sur l'apprentissage et la mémoire à long terme.

I.2. RF et mémoire à long terme

Au sein de la mémoire à long terme, l'ensemble des études a concerné une mémoire récente, c'est à-dire testée de quelques heures à 1 semaine après la fin de l'apprentissage ; aucune étude à ce jour n'a abordé la question des effets des RF sur une mémoire ancienne (quelques semaines chez le rongeur), c'est-à-dire consolidée au niveau des systèmes.

I.2.1. Mémoire spatiale

Un certain nombre d'études ont montré un effet négatif d'une exposition aigue ou chronique aux RF sur les performances d'apprentissage et de mémoire spatiale chez le rongeur.

Ainsi, en 2000, Wang et Lai (B. Wang et Lai 2000) étudient à nouveau avec le même système d'exposition que celui de 1994, avec cette fois-ci une étude de l'effet des RF sur la mémoire spatiale de référence en piscine de Morris. Les rats sont exposés aux RF (2450 MHz, DAS = 1,2 W/kg,), 1h/jour avant chaque apprentissage (6 jours au total) et le test de rappel est réalisé 1h après la dernière session d'apprentissage. Les auteurs ont montré une diminution des performances mnésiques chez les rats exposés, ainsi que des stratégies d'apprentissage différentes.

De même, un impact négatif sur la mémoire spatiale fut observé après une exposition chronique (1h/j, 28 jours) à un signal GSM (900/1800 MHz, DAS = 1,15 W/kg) obtenu avec un téléphone dans la cage, recevant ou non des appels (Narayanan *et al.* 2009, 2015). Leurs

résultats montrent une diminution des performances pendant l'apprentissage dans la piscine de Morris et lors des deux rappels à 24h et 48h. Ils ont également mis en évidence une diminution du nombre de neurones (hippocampe, CA3) ainsi que des différences dans l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux (diminution du nombre de ramifications dans CA3) entre les groupes, ce qui expliquerait, selon eux, la diminution des performances en mémoire spatiale.

Une étude comparative de plusieurs fréquences (900, 1800 et 2450 MHz), avec un DAS inférieur à 0,7 mW/kg, a montré qu'une exposition chronique de 3 mois (2h/j , 5j/semaine), chez des rats de 60 jours, impactait également l'apprentissage (augmentation de la latence pour atteindre la plateforme) et la mémoire spatiale (diminution du temps dans le quadrant cible à 24h) en piscine de Morris, dans toutes les conditions d'exposition (Deshmukh *et al.* 2015).

De même, Hao et collaborateurs (Hao *et al.* 2013) ont étudié l'effet des RF (916 MHz, DAS non connu, 6h/jour, 5j/sem pendant 10 semaines) sur la mémoire à long terme du rat adulte dans le labyrinthe à 8 branches (incluant une étude électrophysiologique dans CA1). Ils ont mis en évidence une diminution du nombre de neurones déchargeant dans CA1 lors des semaines d'entrainement pour les animaux exposés, ainsi qu'une augmentation du nombre d'erreurs lors du rappel. Shahin et collaborateurs (Shahin *et al.* 2018) ont exposé des souris de 3 mois aux RF, 2h/jour pendant 15, 30 ou 60 jours (2450 MHz, DAS = 0,015 W/kg). Ils ont également observé une diminution des performances en mémoire à long terme (labyrinthe à 8 branches) chez les animaux exposés, toutes durées d'exposition confondues.

Quelques études sur la mémoire spatiale montrent par contre une amélioration des performances mnésiques après une exposition aux RF. C'est la cas de Kumlin et collaborateurs en 2007 (Kumlin *et al.* 2007), qui ont mis en évidence, après une exposition de 5 semaines à un signal GSM de 900 MHz (2h/j, 5j/sem avec un DAS de 0,3 ou 3 W/kg) chez le jeune rat de 21 jours, une amélioration des performances en piscine de Morris lors du rappel à 24h, après 4 jours d'apprentissage.

Enfin, d'autres études ne montrent aucun effet des RF sur la mémoire spatiale chez l'animal. Des premiers résultats au début des années 2000 (Dubreuil *et al.* 2002, 2003), n'ont montré aucun effet des RF (900 MHz, DAS = 1 et 3,5 W/kg, 45 min) chez le rat, sur la mémoire spatiale dans un test semblable à la piscine de Morris, mais en milieu sec. En 2014, une équipe allemande (Klose *et al.* 2014) n'a montré aucun impact des RF après une exposition chronique (GSM 900 MHz, 2h/j, 5j/sem, 0,7 ou 2,5 ou 10 W/kg) sur toute la durée

de vie du rat (de J14 à 19 mois, études comportementales à 3 âges, juvéniles, adultes, préséniles). Les résultats étaient semblables entre les groupes d'âge et d'exposition pour la piscine de Morris (mémoire à long terme). Des résultats similaires ont également été retrouvés avec un DAS plus faible (compris entre 0,05 et 0,18 W/kg, 900 MHz, 1h/jour, pendant 21 jours) pour ces deux mêmes tests (Maaroufi *et al.* 2014). Enfin, Bouji et collaborateurs (Bouji *et al.* 2016) n'ont également montré aucun effet des RF (GSM 900 MHz, DAS = 6 W/kg, 45 min) sur les performances en mémoire à long terme (labyrinthe à 8 branches) chez des rats âgés (22-24 mois).

Les données recueillies par les études menées sur la mémoire spatiale à long terme montrent des résultats variables mettant en évidence à la fois des effets négatifs ou l'absence d'effet chez l'animal.

I.2.2. Mémoire non spatiale

I.2.2.1. Mémoire émotionnelle (conditionnement de peur)

Les études sur la mémoire émotionnelle, reposant notamment sur des tests de conditionnement de peur, sont assez récentes. Ce test vise à observer le rappel ou l'absence d'un souvenir à consonance négative (choc électrique) associé à un son et/ou à un contexte en mesurant le temps d'immobilisation de l'animal ("*freezing*") (Figure 16).

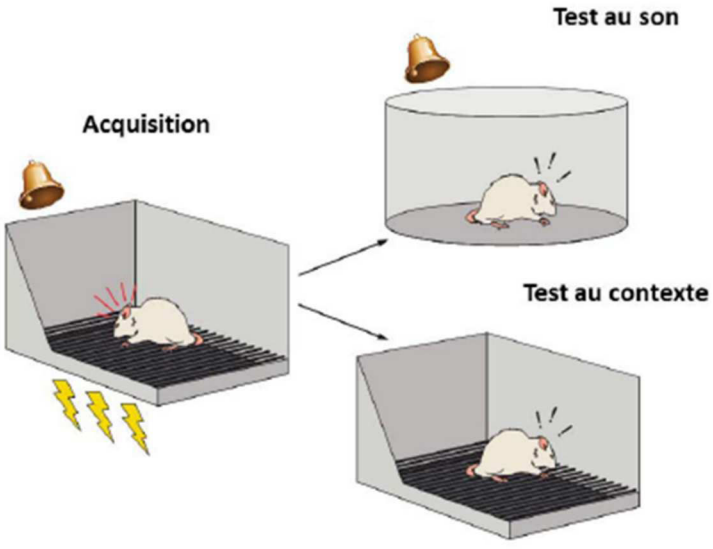


Figure 16 : Test du conditionnement de peur.

Lors de l'acquisition, le rat entend un son qui est associé à choc électrique non douloureux au niveau des pattes. Ensuite, à des délais variables, le rat passe un test de peur au son (nouveau contexte, son identique) et un test de peur au contexte (contexte identique). Lors de ces tests, on observe le temps d'immobilité ou "freezing" (issu de la thèse de Victor Mathis 2016).

En 2012, une première étude (Bouji *et al.* 2012) a mis en évidence une augmentation des performances en mémoire émotionnelle après une exposition aigüe (15 min, 900 MHz, 6 W/kg, conditions de contention juste avant le test au son) chez des rats de 12 mois. Les animaux passaient plus de temps en "*freezing"* que les rats contrôles ou les rats plus jeunes (6 mois, exposés ou non aux RF) lors du rappel à 48h (test au son) et 96h (test au contexte). Quatre ans plus tard, la même équipe (Bouji *et al.* 2016) publie une étude sur les effets d'une exposition chronique de 45 min/jour pendant 1 mois avec les mêmes paramètres d'exposition. Cette fois, aucune différence des capacités mnésiques pour la réponse au son (délai 24h) et au contexte (2 délais [court terme, 3h et long terme, 24h]) n'était visible au niveau de la mémoire émotionnelle pour les deux groupes d'âges étudiés (4-6 mois et 22-24 mois).

D'autres recherches menées dans le même laboratoire (Petitdant *et al.* 2016) sur des rats adolescents ont conduit aux mêmes résultats : soit pas d'impact d'une exposition chronique aux RF (900 MHz, DAS = 0, 1,5, or 6 W/kg, 45 min/jour, 5j/sem, pendant 30 jours) sur la mémoire émotionnelle testée à 3h (court-terme) et 24h (long-terme, conditionnement de peur au contexte), ainsi que sur la peur au son. De plus, dans cette dernière étude, l'effet des RF sur des modèles inflammatoires a également été étudié, soit avec une inflammation lors de la gestation (3 injections de lipopolysaccharide ou LPS en intrapéritonéal (IP)), soit chez le jeune rat (âgé de 25 jours, instillation de LPS en intracérébral pendant 28 jours). Et là aussi, ils n'ont observé aucune différence sur les performances de mémoire, avec ou sans exposition aux RF et pour toutes les conditions (rats issus de l'inflammation gestationnelle et rats adolescents avec microperfusion de LPS). Cette absence d'effet sur la mémoire émotionnelle (à court et à long terme, test au son et au contexte) est également observée après une exposition chronique aux RF pendant toute la gestation des mères (900 MHz, 1 et 4 W, DAS_{foetus} = 0,7 ou 2,6 W/kg) avec ou sans inflammation, la mémoire ayant été évaluée chez le jeune rat P36-37 ou à l'âge adulte (Petitdant *et al.* 2018).

Une autre étude (Barthélémy *et al.* 2016) a montré qu'une seule exposition de 15 min aux RF à un DAS élevé (900 MHz, 6 W/kg) chez le jeune rat, induisait une diminution des performances en mémoire émotionnelle à long terme (24h) dans un conditionnement de peur au contexte. Cet effet s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la protéine GFAP, un marqueur des astrocytes, dans l'hippocampe. Cependant, une exposition similaire mais plus longue (45 min) n'affecte pas la mémoire.

L'ensemble de ces 5 études de l'équipe du Dr AS Villégier, montre que les effets sur la mémoire chez le rat pourraient dépendre à la fois de l'âge et de la durée d'exposition (aigue

vs chronique), et ceci pour une fréquence donnée et un même DAS (6 W/kg). On peut remarquer qu'à cette valeur de DAS élevé (3x supérieur à la limite réglementaire de 2W/kg (tête) en champ proche), des effets thermiques ne sont pas à exclure (température non vérifiée par les auteurs).

I.2.2.2. Reconnaissance d'objets

Le test de reconnaissance d'objets se base sur la curiosité naturelle du rongeur (rat ou souris), qui explorera plus facilement un objet qu'il ne connait pas. Le test classique se déroule en deux sessions (Figure 17) : un entrainement pendant lequel l'animal explore librement deux objets identiques, puis une session de test où l'animal est confronté à un nouvel objet, en plus d'un objet déjà vu à la session d'entrainement. Le temps qu'il va passer à explorer les deux objets est comptabilisé ; si le rat se rappelle bien de l'objet qu'il a déjà vu, il passera plus de temps près du nouvel objet.

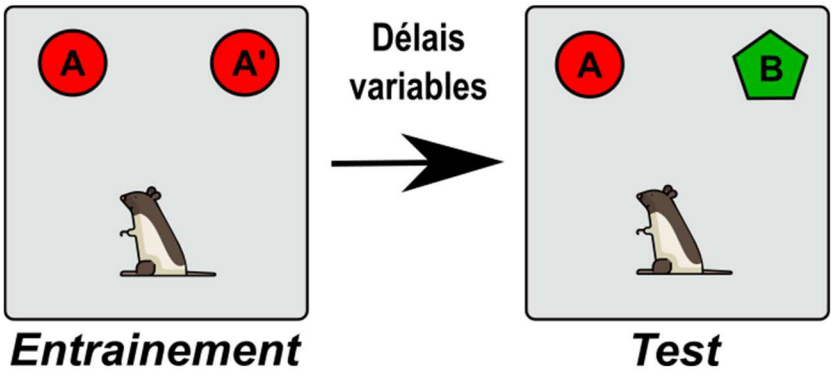


Figure 17 : Test de reconnaissance d'objets. *Les animaux ont une session d'entrainement où on leur présente deux objets identiques (A et A') avec une exploration libre, puis après un délai variable (pendant lequel l'animal est remis dans sa cage), on lui présente à nouveau un objet connu (A) et un nouvel objet (B). Le temps passé à proximité de chaque objet pour les deux sessions est mesuré. L'animal sain passera plus de temps vers le nouvel objet (B) que vers l'objet déjà connu (A).*

Aldad et collaborateurs (Aldad *et al.* 2012) ont exposé des souris femelles en gestation (17 jours) à un signal de 800-1900 MHz (téléphone placé au-dessus de la cage, DAS = 1,6 W/kg, 24h/24). Les souriceaux ont été testés à 8, 12 et 16 semaines dans un test de reconnaissance d'objets avec un rappel à 24h, et ont montré une diminution de l'indice de performance mnésique chez les souris (tous âges confondus) exposées durant la gestation.

Wang et collaborateurs (K. Wang *et al.* 2017) ont également testé des souris dans un test de reconnaissance d'objets avec un rappel à 24h. Ces dernières, âgées d'environ un mois, ont été exposées à un signal de 1800 MHz avec des DAS variables (1,98, 2,20, 2,42, 2,86 ou 3,30 W/kg) pendant 30 min et ceci 3 jours avant le début du test comportemental. Les auteurs

ont mis en évidence une amélioration des performances de mémoire chez les souris exposées à un DAS ≥2,2 W/k, aucun effet n'ayant été observé au DAS le plus bas (1,98 W/kg). Ils ont également testé ces animaux à plusieurs délais après l'exposition aux RF avec un DAS de 3,30 W/kg (3, 4, 5 et 8 jours) et ont observé que ces effets bénéfiques sur la mémoire de reconnaissance persistaient jusqu'à 8 jours après exposition.

I.2.2.3. Evitement passif

Le test d'évitement passif est un test de motivation liée à la peur permettant d'étudier la mémoire à long terme. Il est basé sur le fait que les rongeurs préfèrent les espaces sombres, plus rassurants pour eux. Dans ce test, l'animal est placé dans la partie exposée à la lumière, son instinct va donc le pousser à rejoindre le compartiment noir, où il va recevoir un choc électrique non douloureux dans les pattes (Figure 18). Après un délai plus ou moins long, l'animal est placé à nouveau dans le compartiment lumineux. Le temps qu'il va mettre à retourner dans le compartiment noir est chronométré. S'il se souvient du choc électrique, il mettra plus de temps, voire ne retournera pas dans le compartiment noir.

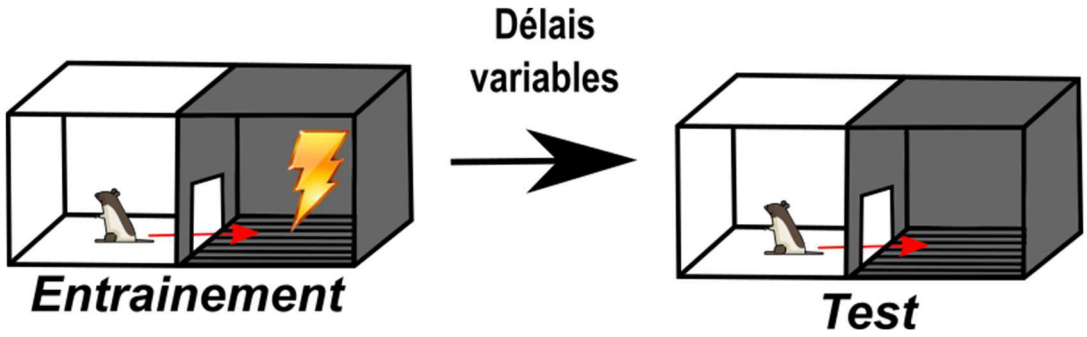


Figure 18 : Test d'évitement passif.
Le test d'évitement passif se déroule en deux sessions. La première (entrainement) consiste à mettre l'animal dans la partie exposée à la lumière et à le laisser rejoindre le compartiment noir, la trappe entre les deux compartiments se ferme alors et l'animal reçoit un choc au niveau des pattes. Puis, après un délai variable, le test consiste à remettre l'animal dans la partie exposée à la lumière et à chronométrer le temps qu'il met pour rejoindre le compartiment noir (latence).

Ikinci et collaborateurs (Ikinci *et al.* 2013) ont mis en évidence, sur des jeunes rats (âgés de 22 jours), une altération de la mémoire à long terme (les animaux exposés retournent plus vite dans la partie noire que les non exposés) lors du test à 24h, après une exposition pendant la gestation des mères (jours de gestation 13 à 21, 900 MHz, puissance 300 mW, 1h/jour, DAS non communiqué).

Razavinasab et collaborateurs (Razavinasab *et al.* 2014) ont également exposé aux RF des rates gestantes pendant toute la durée de la gestation (GSM 900 MHz, DAS entre 0,3 et 0,9 W/kg, 6h/jour). Ils ont observé une diminution de la latence de retour dans le compartiment noir chez les jeunes rats (28-30 jours) exposés pendant leur développement, 7 jours après l'entrainement.

Cependant, avec ce même test, Son et collaborateurs (Son *et al.* 2015) n'ont montré aucun impact d'une exposition chronique (1950 MHz, DAS = 5 W/kg, 2h/jour, 5j/sem, pendant 60 jours) lors du test à 24h chez la souris de 3 mois.

En résumé, à travers la littérature des RF, l'impact de ces dernières sur le comportement et la mémoire chez l'animal reste controversé, avec des effets positifs, négatifs ou pas d'effets. Ces différents résultats pourraient être dus en partie au type d'exposition aux RF (système, durée, DAS, fréquence, …) mais aussi à l'âge et l'espèce animale ainsi qu'au test comportemental et au type de mémoire (Figure 15). L'impact des RF sur divers aspects de la biologie, de la physiologie et de la pathologie humaine et animale font l'objet d'expertises régulières par divers organismes nationaux et internationaux comme l'ANSES en France. Ainsi, les dernières expertises de l'ANSES sur les effets des RF sur les fonctions cognitives, notamment sur la mémoire, ne concluent pas à des effets délétères avérés mais plutôt à un niveau de preuves insuffisant pour conclure dans un sens ou l'autre, soit pas d'effet, soit un effet (rapport ANSES 2013 et 2016).

I.2.3. RF et potentialisation à long terme ou PLT, forme de mémoire au niveau cellulaire

Deux études se sont intéressées à l'impact des RF sur la PLT par des techniques ex vivo (coupes sagittales de cerveau) ou *in vivo* (enregistrement sur animal anesthésié par électrodes intracérébrales).

Prochnow et collaborateurs (Prochnow *et al.* 2011) ont exposé des rats âgés de 12 à 15 semaines à un signal UMTS (3G) de 2000 MHz (DAS = 0, 2 ou 10 W/kg, 2h en condition de contention). Après mise à mort des animaux, les enregistrements de la PLT et de la DLT ont été réalisés sur des tranches sagittales d'hippocampe (au niveau de la sous-région CA1). Ils ont observé une diminution de la PLT et de la DLT uniquement pour l'exposition au DAS de 10 W/kg (pas de différence significative entre les groupes exposés ou non pour le DAS de 2 W/kg).

Wang et collaborateurs (H. Wang *et al.* 2013), quant à eux, ont travaillé *in vivo*, en exposant des rats mâles de 8 semaines à un signal de 2856 MHz ($DAS_{cerveau}$ = 3,5, 7 ou 35 W/kg, 6 min). Rapidement après l'exposition, les animaux sont anesthésiés ; les électrodes de stimulation sont placées sur la voie perforante (connexion entre le cortex entorhinal et le gyrus denté de l'hippocampe) et les électrodes d'enregistrement dans la couche moléculaire du gyrus denté. Ils ont mis en évidence une diminution de l'amplitude des potentiels de champs excitateurs pour les DAS 7 et 35 W/kg associée à une baisse des performances en mémoire spatiale (Piscine de Morris).

A noter que pour les deux études, les niveaux de DAS impactant la plasticité cellulaire (PLT et DLT) sont bien plus élevés que le maximum autorisé chez l'Homme (2 W/kg pour la tête).

I.2.4. Impact des RF sur des modèles Alzheimer

Enfin, d'autres études ont été menées dans le but d'observer les effets des RF sur des modèles de pathologie comme la maladie d'Alzheimer, à l'aide de modèles de souris transgéniques. C'est le cas d'Arendash et collaborateurs (Arendash *et al.* 2010, 2012), qui ont montré une amélioration des performances mnésiques (tâche de mémoire de travail spatiale en radial maze, ainsi que des tâches d'interférence utilisant à la fois un labyrinthe radial aquatique et un labyrinthe en Y) chez un modèle de souris Alzheimer (AβPPsw), après une exposition chronique de 2 fois 1h par jour (900 MHz, 0,25 ou 1,05 W/kg). Ils ont varié les groupes et les durées : jeunes adultes (2 mois + 4-7 mois d'exposition), adultes (4 mois + 2 mois d'exposition), âgés (21-26 mois + 2 mois d'exposition et 22 mois + 2 semaines d'exposition). Ils ont aussi remarqué que l'augmentation des performances en mémoire de travail retrouvée chez les animaux transgéniques (tous groupes confondus) était visible également chez les animaux sauvages (wild type, WT) à partir de 4 mois d'exposition aux RF, illustrant ainsi un effet "bénéfique" de l'exposition sur la mémoire de travail chez la souris adulte moyennement âgée (9-13 mois).

Une autre équipe (Banaceur *et al.* 2013) a également mis en évidence une amélioration des performances mnésiques dans le cadre de la mémoire de travail spatiale (labyrinthe de Barnes). Pour cela, les auteurs ont exposé des souris 3XTg-AD (modèle transgénique de la maladie d'Alzheimer) à un signal WI-FI (2400 MHz, DAS = 1,6 W/kg, 2h/jour pendant 2 mois).

Récemment, des tests sur un modèle de souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer (5xFAD) montrent que, contrairement aux données du groupe d'Arendash (Arendash *et al.* 2010, 2012) les RF n'impactent pas la mémoire spatiale (piscine de Morris) et non spatiale (reconnaissance d'objets) chez les souris WT et transgéniques (Son *et al.* 2016). Le système d'exposition corps entier (chambre réverbérante) permet une exposition à un signal WCDMA 1950 MHz avec un DAS de 5 W/kg, et d'une durée de 2h/j, 5j/sem pendant 3 mois. De plus, aucun impact sur les dépôts cérébraux (hippocampe et cortex) d'APP, CTFß ou peptide Aβ (3 marqueurs tissulaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer) n'a été remarqué. Mais lorsque cette même exposition est réalisée pendant 8 mois, des effets bénéfiques des RF sont observés chez les souris "Alzheimer" dans la mémoire de reconnaissance d'objets testée à 24h post-acquisition et une augmentation du métabolisme du glucose dans l'hippocampe et l'amygdale a été observée (Son *et al.* 2018). Ceci rejoint au moins en partie les données du groupe de Arendash pour des expositions aux RF prolongées, soit au-delà de 4 mois avec des effets bénéfiques à la fois sur la cognition des souris témoins et transgéniques, mais aussi sur d'autres paramètres comme les dépôts cérébraux de peptide amyloide-ß (Arendash *et al.* 2010).

II. Effets des RF sur les systèmes moléculaires

La plupart des recherches effectuées sur l'impact des RF sont réalisées sur les gènes ou les protéines jouant un rôle dans l'apprentissage, l'inflammation et le stress, l'intégrité de la BHE, ainsi que l'apoptose (voir chapitre 1). Dans cette partie, nous présenterons les gènes impliqués dans les processus mnésiques et leurs voies de signalisation.

II.1. Etude de l'expression des gènes sur l'intégralité du génome (approche "genome wide")

Il existe des études visant à voir l'impact des RF sur l'expression des gènes de manière globale (étude du génome en entier). C'est le cas de quelques études (Paparini *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2015; James P. McNamee *et al.* 2016; Adamantia F. Fragopoulou *et al.* 2018) qui ont étudié l'impact des RF sur l'expression des gènes dans plusieurs régions cérébrales par une approche "*Genome Wide*".

Paparini et collaborateurs (Paparini *et al.* 2008) ont exposé des souris (âgées de 5 à 6 semaines) à un signal GSM de 1800 MHz ($DAS_{corps\ entier}$ = 1,1 W/kg, 1h) puis ont analysé

l'expression des gènes sur l'intégralité du cerveau grâce aux puces à ADN. Ils ont mis en évidence 42 gènes surexprimés (avec un fold-change important [1,5 à 2,8], voir § matériel et méthode) et 33 gènes sous-exprimés. Ces gènes modulés étaient très différents et aucune famille ou groupe fonctionnel n'a été mis en évidence et aucune validation n'a été trouvée par RT-qPCR.

Zhao et collaborateurs (Zhao *et al.* 2015) ont exposé des souris à un signal de 2100 MHZ ($DAS_{corps\ entier}$ = 0,45, 1,8 ou 3,6 W/kg, 1h/jour pendant 8 semaines). Ils ont montré des nombres de gènes modulés différents selon les DAS utilisés : 41 gènes pour un DAS = 0,45 W/kg, 29 gènes pour un DAS = 1,8 W/kg et 219 gènes pour un DAS = 3,6 W/kg, sur l'intégralité du cerveau. L'analyse des groupes fonctionnels a montré que les gènes modulés appartenaient à divers groupements : processus métaboliques, régulation de processus biologiques, transport, développement ou encore organisation cellulaire, et intervenaient dans différentes voies : ribosome, maladie d'Alzheimer, Parkinson et Huntington, potentialisation à long terme.

Une autre équipe (Adamantia F. Fragopoulou *et al.* 2018) a également travaillé sur le signal 1800 MHz ($DAS_{cerveau}$ compris entre 0,022 et 0,366 W/kg, 2h) et chez la souris. Ils ont mis en évidence 178 gènes modulés dans l'hippocampe (60 sous-exprimés et 118 surexprimés). L'analyse des groupements fonctionnels (Banque de données en ligne DAVID) a mis en évidence, entre autres, des variations des gènes impliqués dans la traduction, le comportement, le développement du système nerveux et la communication cellulaire. Cependant, la validation par RT-qPCR sur quelques gènes choisis, n'a pas permis pas de retrouver cet effet des RF.

McNamee et collaborateur (James P. McNamee *et al.* 2016), quant à eux, ont exposé des souris aux RF de même fréquence, avec deux DAS différents 0,2 et 1,4 W/kg, 4h/j sur 5 jours. Ils ont ensuite réalisé un séquençage des ARN de plusieurs régions cérébrales (amygdale, cervelet, hippocampe, hypothalamus et CPFm). Le nombre de gènes modulés est différent entre les régions, mais surtout entre les groupes (~ 9-10 gènes pour le DAS le plus élevé, ~ 10 gènes pour le plus faible et ~ 33 gènes pour les sham) en comparaison du groupe témoin (uniquement manipulé pour réduire le stress, pas de passage dans la chambre d'exposition). L'analyse des gènes modulés et des voies de signalisation dans lesquelles ils sont impliqués a montré des variations, tous DAS confondus, dans la voie de p53 (impliqué dans l'apoptose) et dans la voie du métabolisme de la porphyrine et de la chlorophylle (impliquée dans d'autres voies comme celle de l'AcétylCoA, Cycle de Krebs) dans le CPFm.

Leurs analyses en RT-qPCR n'ont montré aucune différence sur les gènes impliqués dans les deux voies citées ci-dessus.

II.2. Gènes précoces, mémoire et voies de signalisation

En 1997, Fritze et collaborateurs (Fritze, Sommer, *et al.* 1997) font partie des premiers à étudier l'impact des RF sur l'expression de gènes précoces dans le cerveau (par hybridation *in situ*) après une exposition aigüe aux RF (4h, 900 MHz, DAS = 0,3 – 1,5 ou 7,5 W/kg) chez le rat. Les résultats n'ont montré aucune différence entre les groupes exposés (quel que soit le DAS) et le groupe témoin, concernant les ARNm de *c-fos* et *c-jun* dans différentes régions cérébrales (cervelet, cortex, thalamus, cortex entorhinal, striatum et cortex piriforme). Ces résultats sont également observés lors de la quantification de la protéine c-Fos par immunohistochimie dans le cerveau après une exposition semblable (900 MHz, 1h, 4 W/kg) chez la souris (John W. Finnie 2005). Ces mêmes auteurs n'ont montré, avec les mêmes paramètres mais avec une exposition chronique pendant la gestation (19 jours) chez la souris femelle, aucun effet des RF sur l'expression de *c*-Fos chez les jeunes souriceaux (John W. Finnie *et al.* 2006). Ils ont également vérifié l'expression de la protéine c-Fos après la même exposition aux RF mais sur 2 ans, et dans cette étude aussi (John W. Finnie *et al.* 2007), ils n'ont montré aucune variation de la protéine.

Del Vecchio et collaborateurs (Del Vecchio *et al.* 2009) ont abouti à la même conclusion avec leurs études sur des cultures primaires de neurones corticaux exposés aux RF (GSM 900 MHz, DAS = 1 W/kg, 24, 72 ou 120h), pour l'expression des gènes *c-fos* et *c-jun* par RT-qPCR.

Jorge-Mora et collaborateurs (Jorge-Mora *et al.* 2011) ont exposé des rats à des RF (2450 MHz, $DAS_{cerveau}$ = 0,077 ou 0,3 W/kg, DAS corps entier = 0.041 ou 0,160 W/kg) de façon aigüe (30 min) ou chronique (10 x 3 min/jour pendant 2 semaines, $DAS_{cerveau}$= 0,077W/kg). Après une exposition aigue, ils ont mis en évidence dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, seul noyau étudié, une augmentation du nombre de neurones *c*-Fos+, 90 min ou 24h après l'exposition pour le DAS = 0,3 W/kg et à 24h pour le DAS de 0,077 W/kg, alors qu'une baisse du nombre de ces neurones Fos+ est observée 90 min après l'exposition au DAS 0,077 W/kg. L'exposition chronique montre une augmentation des neurones Fos+, 90 min après la dernière exposition aux RF.

La même année, la même équipe (Carballo-Quintás *et al.* 2011) a publié des résultats sur l'expression de la protéine c-Fos (marquage immunohistochimique) dans les aires

corticales [cortex frontal, pariétal et piriforme], ainsi que dans l'hippocampe [CA1, CA3 et GD]), à différents délais (90 min, 24h ou 3 jours après exposition) dans un modèle de convulsions épileptiques chez le rat (injection en IP de picrotoxine ou PIC) exposé à un signal GSM de 900 MHz (DAS = 1,45 W/kg, 2h). Ils ont mis en évidence une augmentation de c-fos chez les rats PIC exposés (*vs* les rats PIC non exposés) à 90 min. Cette augmentation était toujours visible à 24h et apparaissait chez les non PIC exposés. Enfin, à trois jours, aucune différence n'était observée entre les rats PIC exposés ou non, mais Carballo-Quintás et collaborateurs ont montré une augmentation de c-fos chez les rats non PIC exposés ou non à ce délai.

Gökçek-Saraç et collaborateurs (Gökçek-Saraç *et al.* 2017) ont exposé des rats à un signal de 900 MHz avec une puissance d'antenne de 1,5 W, 2h/jour, soit pendant une semaine (aigue) ou 10 semaines (chronique). Ils ont montré une augmentation de p44/42 MAPK et sa version phosphorylée lors des deux expositions, mais avec une augmentation plus importante avec l'exposition de 10 semaines. Pour ces auteurs, ceci expliquerait les mauvaises performances mnésiques lors de leur test d'évitement passif.

A l'inverse, une diminution de l'expression d'autres kinases impliquées dans des voies de signalisation en lien avec la plasticité cérébrale, l'apprentissage et la mémoire est retrouvée chez la souris après une exposition chronique de 15, 30 et 60 jours (2450 MHz, 2h/j, $DAS_{corps\ entier}$ = 0,0146 W/kg) (Shahin *et al.* 2018). En effet, les auteurs ont mis en évidence une diminution de certaines protéines présentes dans la voie de signalisation ERK (ERK1/2, p-ERK1/2, PKA, PKC), ainsi que CREB et p-CREB dans l'hippocampe (Shahin *et al.* 2018). Pour les auteurs, ces résultats montrent que l'exposition aux RF induit un stress local qui supprime certains processus dans l'hippocampe impliqués dans la formation d'une mémoire et seraient corrélés à des déficits d'apprentissage et de rappel lors du test de mémoire spatiale (labyrinthe radial, voir § mémoire spatiale de l'intro).

II.3. Gène en lien avec la neurotransmission glutamatergique, GABAergique, cholinergique, sérotoninergique et dopaminergique

Dans le cerveau, la communication entre les neurones s'effectue au niveau des synapses entre un neurone pré-synaptique et un neurone post-synaptique. Pour cela, la partie pré-synaptique libère des neurotransmetteurs dans la fente synaptique qui vont se fixer sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de la partie post-synaptique. Ceci va alors entrainer la formation d'un potentiel d'action post-synaptique. Il existe deux catégories de

neurotransmetteurs : excitateurs (glutamate et aspartate) et inhibiteurs (acide gamma amino-butyrique ou GABA, glycine).

Le glutamate permet l'activation de deux familles de récepteurs : les récepteurs ionotropiques (ou récepteurs-canaux, iGluR), et les récepteurs métabotropiques (mGluR) couplés aux protéines G. Ces derniers transmettent l'influx nerveux lent, alors que les iGluR interviennent dans la neurotransmission rapide, jouant un rôle important dans la cognition et la mémoire (Smart et Paoletti 2012). Il existe plusieurs sous-types de récepteurs ionotropiques au glutamate : les récepteurs NMDA (NR1, NR2A à D, NR3A-B), AMPA (GluR1 à 4), et kaïnate (Hansen *et al.* 2018). Pour les récepteurs GABA, il en existe 3 sous-types $GABA_A$, (prédominant) et $GABA_C$, ionotropiques et $GABA_B$ métabotropique.

Mausset-Bonnefont et collaborateurs (Mausset *et al.* 2001) ont exposé des jeunes rats à un signal de 900 MHz avec deux DAS différents (4 et 32 W/kg) pendant 2h. Ils ont observé une diminution du nombre de cellules GABAergiques dans le cervelet pour les deux DAS. Cette même équipe (Mausset-Bonnefont *et al.* 2004) a exposé des rats adultes à un signal GSM de 900 MHz avec un DAS de 6 W/kg pendant 15 min. Ils ont observé une diminution chez les rats exposés des capacités de liaison du récepteur $GABA_A$ dans l'hippocampe, du récepteur NMDA dans le cortex et le striatum et du transporteur de la dopamine dans le cortex, ce dernier étant augmenté dans le striatum. Ces changements s'accompagnent d'altérations des propriétés de liaison (Kd et B_{max}) (étude de ligands spécifiques par autoradiographie). Ils ont également montré une diminution des sous-types du récepteur NMDA, NR1 et NR1 phosphorylé dans le cortex, de NR2A dans le cortex et l'hippocampe et de NR2B dans le striatum par Western Blot. Ils ont également mis en évidence que cette diminution des récepteurs était plus importante dans la partie post-synaptique et dans la région du striatum. Ces altérations s'accompagnent d'une forte réaction gliale (immunoréactivité GFAP) dans les 3 régions cérébrales. Les auteurs concluent que l'exposition à un DAS élevé induit des changements cellulaires et moléculaires affectant non seulement le cortex, mais aussi les régions cérébrales plus profondes où le DAS est diminué d'environ 50% à 5 mm de profondeur, soit proche de la limite supérieure acceptée de 2W/kg.

Wang et collaborateurs (Q. Wang *et al.* 2005) ont étudié l'effet des RF sur les récepteurs AMPA GluR2 *in vitro*. Pour cela, ils ont exposé des neurones corticaux postnataux de rat soit à un signal de 900 MHz (DAS = 1,15, 2,23 et 3,22 W/kg) 2h/jour pendant 4 ou 6 jours, soit à une seule exposition de 12h avec un DAS de 3,22 W/kg. Ils ont mis en évidence

une diminution de la quantité de récepteurs et une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire pour les protocoles de répétition de l'exposition, mais pas d'effet en aigüe.

Cette diminution de l'expression des récepteurs AMPA (iGluR) dépendante de la durée d'exposition est également retrouvée chez la souris après une exposition chronique de 15, 30 et 60 jours (2450 MHz, 2h/j, DAS = 0,0146 W/kg) (Shahin *et al.* 2018). De plus, les auteurs ont mis en évidence une diminution des récepteurs AMPA (GluR1 et GluR2) ainsi qu'une diminution de PSD-95 (important dans l'organisation du neurone post-synaptique, marqueur de la force et de l'activité de la synapse) dans l'hippocampe. Ces résultats en quantification de protéines étaient corrélés à des déficits d'apprentissage et de mémoire lors de leur test de mémoire spatiale (labyrinthe radial).

Une autre expérience menée par Xu et collaborateurs (Xu *et al.* 2006) a également étudié l'impact des RF sur l'activité des récepteurs glutamatergiques sur des cellules *in vitro* (neurones hippocampiques). Ils ont mis en évidence une diminution de l'amplitude des courants post-synaptiques des récepteurs AMPA uniquement (celle des récepteurs NMDA ne variait pas) ainsi qu'une diminution de l'expression de PSD-95 après une exposition aigüe (GSM 1800 MHz, DAS = 2,4 W/kg, 15 min).

Watilliaux et collaborateurs (Watilliaux *et al.* 2010) proposent une des rares études de l'effet d'une exposition à un signal GSM de 1800 MHz et 3 DAS différents (1,7 – 2,2 et 2,5 W/kg) pendant 2h sur les transporteurs au glutamate chez le rat au cours du développement (âgé de 5 jours, 15 jours et 35 jours). Ils n'ont montré aucune différence significative entre les rats exposés et les sham pour les transporteurs GLT1 et GLAST, pour tous les DAS. Pour les auteurs, qui montrent aussi aucun impact des RF sur la réaction gliale (GFAP) ou le stress (protéines de choc thermique), il n'y a aucune indication qu'une telle exposition aux RF affecte en aigue, le stress cellulaire ou la réponse gliale pouvant indiquer des dommages précoces.

Publiés en 2014, les résultats de Qiao et collaborateurs (Qiao *et al.* 2014) sur des synaptosomes (région synaptique terminale) d'hippocampe de rats, ont mis en évidence une diminution de l'expression de la synapsine I phosphorylée (p-syn I , impliquée dans la régulation des neurotransmetteurs), ainsi qu'une augmentation des transporteurs vésiculaires de GABA (VGAT) dès 6 h après une exposition aigue et VGLUT1 7 jours après l'exposition (2856 MHz, DAS = 14 W/kg, 5 min). Ils ont également montré, sur une culture de neurones, une diminution de l'expression de p-syn 1 ainsi que du relargage du GABA. D'après les

auteurs, l'exposition aux RF diminuerait l'expression de p-syn 1, ce qui altérerait la libération du GABA et impacterait donc les performances en mémoire spatiale.

Hassanshahi et collaborateurs (Hassanshahi *et al.* 2017) ont montré récemment, chez le rat, des effets sur l'expression d'un récepteur muscarinique (M1, dont le ligand est l'acétylcholine, excitateur) et d'un transporteur du GABA (GAT1) par RT-qPCR. Pour cela, ils ont exposé des rats à un signal Wi-Fi de 2400 MHz, 12h/jour pendant 30 jours. Ils ont mis en évidence une augmentation de l'expression de M1, sans variation de celle de GAT1, dans l'hippocampe. Les ondes Wi-Fi impacteraient, d'après les auteurs, l'intégration des informations multisensorielles, perçues pendant différentes versions d'une tâche de reconnaissance d'objets.

Li et collaborateurs (H.-J. Li *et al.* 2015) ont exposé des rats d'un mois à un signal de 2856 MHz avec différentes densités de puissance (5, 10, 20 et 30 mW/cm²) durant 6 min, trois fois par semaine, pendant 6 semaines. Ils ont mis en évidence, par chromatographie et dans l'hippocampe, une diminution des concentrations de l'acide aspartique (Asp) et du glutamate (Glu) pour 5 mW/cm² et une augmentation du GABA pour 30 mW/cm², 14 jours après l'exposition. A 28 jours, Asp et Glu diminuaient à 5 mW/cm², la glycine (Gly) diminuait à 20 et 30 mW/cm². Deux mois après l'exposition, Asp et Glu augmentaient chez les rats exposés à 10 mW/cm². De plus, les auteurs ont montré une augmentation de l'expression des récepteurs à la sérotonine (5-HT_{1A}R, 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R, impliqués dans la mémoire et l'amnésie) jusqu'à 2 mois après l'exposition pour 30 mW/cm², dans l'hippocampe. Pour les auteurs, la diminution de la quantité de neurotransmetteurs, ainsi que l'augmentation des récepteurs à la sérotonine seraient à l'origine des diminutions des performances mnésiques de leurs animaux.

Une étude récente (J.-P. Zhang *et al.* 2017) a observé l'effet des RF sur la mémoire émotionnelle et plus particulièrement la quantité de neurotransmetteurs (technique de chromatographie en phase liquide, couplé à de la spectrométrie de masse) dans le cortex et l'hippocampe chez la souris de 4 semaines (1800 MHz, DAS = 2,7 ou 2,2 W/kg, 6h/jour pendant 4 semaines). Les auteurs ont montré une diminution du niveau de GABA et d'acide aspartique (Asp, excitateur sous sa forme méthylée des récepteurs NMDA) dans les deux structures étudiées. Par contre, ils n'ont trouvé aucune différence entre les groupes exposés ou non pour les taux de glutamate et de glycine, ni pour l'acétylcholine estérase (AchE). Les auteurs proposent que ces effets sur le GABA et l'aspartate pourraient être en lien avec les effets anxiogènes de l'exposition aux RF mesurés dans un champ ouvert.

Aldad et collaborateurs (Aldad *et al.* 2012) ont étudié les courants excitateurs dans l'élément post-synaptique (électrophysiologie) dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal après une exposition prénatale sur toute la durée de la gestation chez la souris (800-1900 MHz, DAS = 1,6 W/kg, 9, 15 ou 24h/jour). Ils ont mis en évidence une diminution de ces courants excitateurs chez les souris âgées de 3-4 semaines exposées in utero 24h/24 et que celle-ci dépend de la durée quotidienne d'exposition (plus importante quand le nombre d'heures d'exposition augmente).

Ainsi, les études se sont intéressées pour l'essentiel à l'expression des récepteurs post-synaptiques ou transporteurs et aux quantités de neurotransmetteurs dans diverses régions cérébrales et pour certaines, ont proposé que les modifications pouvaient être mises en lien avec des altérations comportementales, notamment la mémoire ou l'anxiété. On peut noter que ces modifications concernent divers systèmes de neurotransmission/neuromodulation étudiés plutôt par des approches cellulaires et moléculaires. Quelques données en électrophysiologie montrent des effets des RF sur les courants excitateurs dans le neurone post-synaptique.

A l'image de la littérature sur l'effet des RF sur le comportement, l'impact de ces dernières sur les systèmes moléculaires reste très hétérogène, notamment sur la neurotransmission. Ces différents résultats pourraient être dus en partie au type d'exposition aux RF (système, durée, DAS, fréquence, …) (Figure 15). L'impact des RF sur divers aspects de la biologie moléculaire et cellulaire, de la physiologie et des voies de signalisation font aussi l'objet d'expertises régulières par divers organismes nationaux et internationaux comme l'ANSES (rapport ANSES 2013 et 2016).

Matériels & Méthodes

I. Animaux

Les études présentées dans ce mémoire ont été effectuées sur des rats mâles de souche Long-Evans (provenant du centre d'élevage R. Janvier, France).

Figure 19 : Rats Long Evans mâles, âgés d'un mois, avec leur buchette, en cage d'élevage.

Les rats sont âgés d'un mois à leur arrivée au laboratoire pour former trois groupes d'âges : 1 mois ("ados", 108 rats), 6 mois ("adultes", 128 rats) et 18 mois ("âgés", 150 rats). En attendant l'âge requis pour le début des expériences, les rats sont stabulés sein du laboratoire par 2 ou 3 dans des cages transparentes adaptées à leur âge avec une (petite) buchette de bois (Figure 19). Les pièces de stabulation sont distinctes des salles de test, et les paramètres d'éclairage (cycle lumière/obscurité 12h/12h), de température (23°C ± 1°C), de taux d'humidité (40% ± 10%), et d'ambiance sonore (assurée par une radio durant la phase diurne) sont automatiquement régulés.

Les rats disposent d'eau et de nourriture *ad libitum* (hors expériences) et sont toujours testés en comportement durant la phase diurne. Cette étude est autorisée par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, référencée sous le numéro APAFIS #1074.

II. Exposition aux radiofréquences (RF)

L'objectif de notre projet a été de réaliser des expositions corps entier à un signal RF le plus proche possible d'une exposition environnementale chez l'Homme (type antennes relais) pour un signal de téléphonie mobile de type 4G.

II.1. Installation

L'exposition est réalisée dans une chambre réverbérante construite par la Fondation IT'IS (Zurich, Suisse, dimensions externes : hauteur = 2,5m, largeur = 1,52m, longueur =

1,9m ; dimensions internes : hauteur = 2,34m, largeur = 1,6 m et longueur = 1,6m). Les avantages d'un tel système sont multiples : i) il permet l'exposition simultanée de plusieurs rats, placés individuellement dans une cage en plastique (Maxi Miser®, Thoren, Etats-Unis), matériau pour ainsi dire neutre par rapport aux RF, soit ne modifiant pas de manière significative la dose issue de l'énergie émise par les RF impartie à l'animal) ; ii) il laisse l'animal libre de se mouvoir, limitant de beaucoup le stress et permettant des expositions prolongées (rev des différents systèmes d'exposition Paffi *et al.* 2013), iii) les performances métriques de la chambre ont été optimisées, que ce soit pour l'homogénéité du champ électrique, son isotropie, ainsi que l'uniformité du DAS et son efficience (Capstick et al 2017). Ainsi, le signal RF provient d'un générateur, est amplifié et enfin introduit dans la chambre par le biais d'une antenne *"broadband log-periodic dipole array"* couvrant des fréquences de 700 MHz à 2,2 GHz composées de 11 dipôles répartis sur la longueur et espacés de 40 à 200 mm (Isbell 1960). La distribution d'un champ électromagnétique statistiquement homogène est assurée à l'aide de 2 pales métalliques, l'une verticale située au fond de la chambre et l'autre horizontale positionnée au plafond (Clegg *et al.* 2005, Figure 2). Le design et la vitesse de rotation des pales et donc le volume brassé ont été optimisés pour que les variations de la force du champ électrique soient minimisées ou au moins contrôlées dans la configuration d'une exposition simultanée de 24 rats maximum en cage individuelle : cela inclut notamment la taille de la chambre qui assure le maintien d'une distance au-delà d'un minimum par rapport aux parois et permet un volume suffisant pour une bonne efficacité du brassage (Capstick *et al.* 2017)

Le signal est un signal LTE (Long Term Evolution) de type 4G à la fréquence de 900 MHz avec un débit d'absorption spécifique ou DAS = 0,33 W/kg ou 0 W/kg pour le groupe Sham, et le champ électrique incident est ajusté chaque semaine en fonction de l'évolution du poids moyen des rats de chaque groupe, afin de maintenir le DAS à 0,33 W/kg. Le niveau d'exposition des rats est ajusté à un champ électrique E incident d'environ 61 V/m, représentant la limite supérieure du seuil réglementaire en France pour les RF de type 4G (IRCNIP, Recommandation Européenne n°1999/519/CE, décret français N° 2002-775 du 3 mai 2002) (Figure 20).

Enfin, un système de contrôle piloté par un ordinateur gère l'environnement de la chambre et donc le programme/niveau d'exposition, la vitesse de rotation des pales et aussi le monitoring de la ventilation, la température, l'humidité, le niveau d'oxygène, la lumière et le champ électromagnétique (cf Figure 11 de Capstick *et al.* 2017).

Figure 20 : Chambre réverbérante construite par IT'IS Foundation, avec rack et cages en plastique (Maxi-Miser®).
Paramètres de l'exposition : signal LTE 4G, 900 MHz, DAS = 0,33 W/kg, E ≈ 61 V/m.

II.2. La dosimétrie

Elle a été réalisée par la Fondation IT'IS, Dr M Capstick et sera brièvement décrite. La puissance du champ électrique a été déterminée à partir d'une dosimétrie numérique et expérimentale (estimation du DAS ou débit d'absorption spécifique). **La dosimétrie numérique** a été réalisée avec la plateforme SEMCAD (SPEAG, Suisse) et la méthode FDTD (*finite difference time domain*) qui propose un environnement de simulation des ondes 3D complet offrant une large gamme des modèles à haute résolution Homme –animal (voir § introduction "dosimétrie et réglementation"). Elle permet ainsi d'extraire le champ électrique (E), magnétique (CM), les distributions de DAS corps entier ou organe-spécifique. Le modèle dit "*Random plane waves*" a été utilisé pour estimer le DAS dans la chambre (remarque : il existe une 2^{e} méthode "*12-plane-wave approximation*") (Figure 21).

La courbe de sensibilité du DAS (Figure 22) intégrant le poids des rats a utilisé la formule suivante : DAS corps entier (W/kg)/(V/m)^2 = 4,153x10^{-3} x poids$^{-0,665}$.

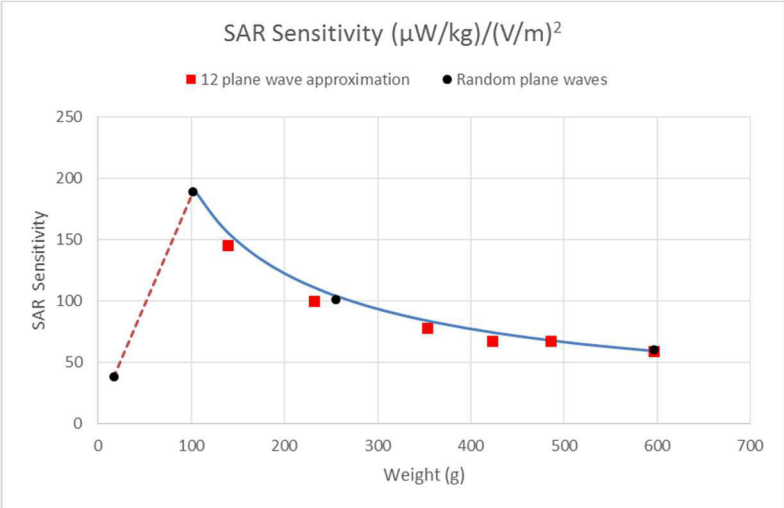


Figure 21 : la sensibilité du DAS en fonction du poids selon les 2 modèles "Random plane waves" et "12 plane wave approximation".

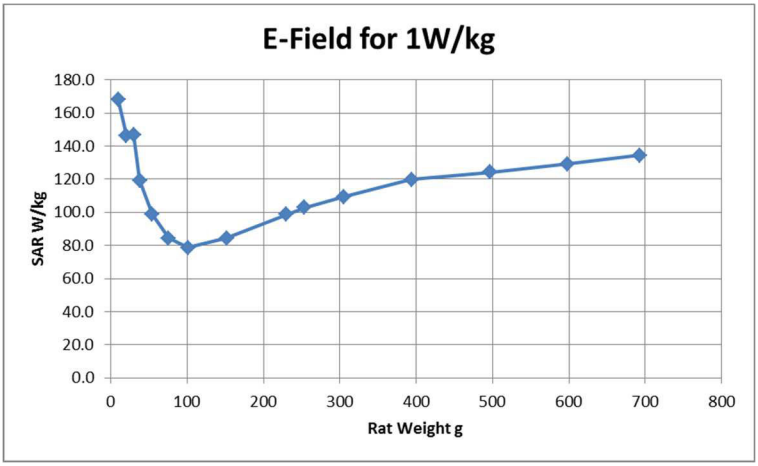


Figure 22 : Evolution du DAS en fonction du poids des rats

La dosimétrie expérimentale : pour valider le DAS dans des modèles anatomiques, on choisit un cas simplifié dans lequel le DAS peut être mesuré. Dans notre cas, un fantôme homogène construit pour avoir le même DAS corps entier que celui du modèle anatomique. Le fantôme est fait d'une bouteille de 1/2 litre remplie à ras bord de 552 ml avec un liquide simulant le tissu biologique. La sensibilité du DAS a été calculée à 43,1 (µW/kg)/(V/m)^2 à l'aide de la plateforme SEMCAD X. Le DAS a été déterminé expérimentalement en plaçant 20 fantômes dans la chambre réverbérante en cage individuelle et en les exposant à un niveau élevé (305 V/M) pour produire une élévation de la température. Deux fantômes ont été enregistrés sur toute la période de montée et descente en température (Figure 23) et la température finale des 18 autres fantômes a été mesurée à la fin de la période de montée en température. Le DAS est déterminé à partir des courbes de chaud et de froid des fantômes et

l'homogénéité du DAS par la distribution de la température des fantômes. Le DAS a été déterminé à 4,4 W/kg pour un champ de 305 V/m, ce qui donne une sensibilité du DAS de 47,2 (µW/kg)/(V/m)^2

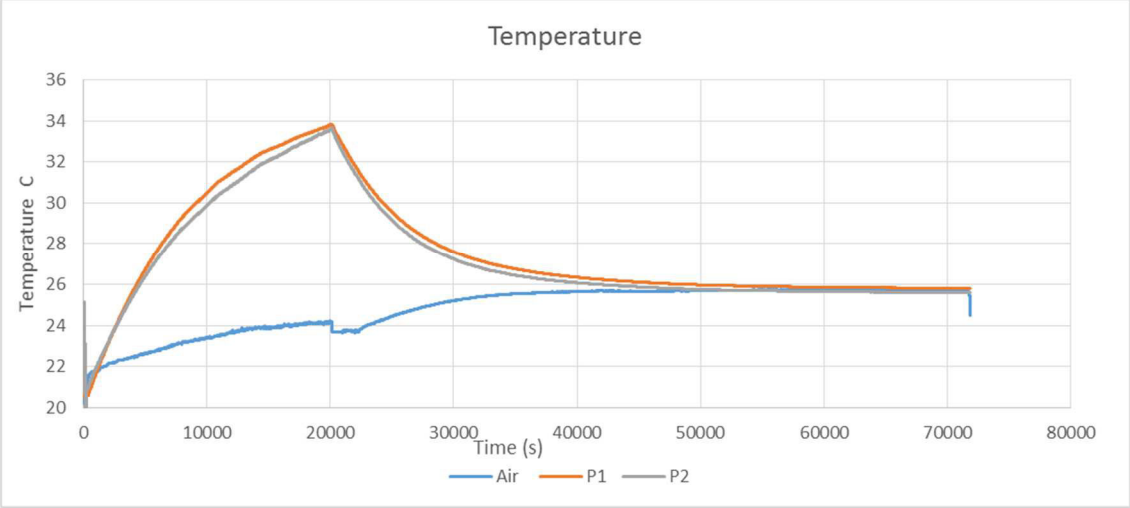


Figure 23. Courbes de température enregistrées chez deux modèles fantômes. P = Phantom

La différence entre la dosimétrie numérique et expérimentale est évaluée à 9,5% ou 0,39 dB et est jugée acceptable considérant les incertitudes combinées de la simulation et des mesures et le DAS a été validé à 0.33 W/kg pour un champ électrique d'environ 61V/m.

II.3. Protocole d'exposition

Les rats sont exposés 4h/jour, 5 jours/semaine pendant 3 mois. L'exposition est réalisée en aveugle. Deux groupes entrent dans la chambre, l'un est exposé au signal 4G (RF), l'autre non (Sham). Pendant les 4 heures d'exposition en période diurne, matin ou après-midi, les rats sont en cage individuelle sans eau, ni nourriture, dans des cages en plastique adaptées à la chambre réverbérante. Un troisième groupe, appelé "Témoin" est placé à l'extérieur de la chambre dans une cage individuelle pour une même durée que leurs congénères dans la chambre, sans accès à l'eau ou la nourriture. Les expositions RF et Sham alternent chaque jour, soit le matin, soit l'après-midi.

Pendant ces 3 mois, les rats sont stabulés dans une pièce juxtaposée à la pièce d'exposition, avec les mêmes paramètres d'éclairage, d'humidité et sonores. La manipulation des rats en vue de leur entrée dans la chambre commence environ 45 min après l'allumage de la lumière le matin.

Durant l'exposition, et dans le cadre du bien-être animal, certains paramètres biologiques sont surveillés toutes les semaines en plus du suivi au quotidien de l'état général de l'animal (poil, yeux, comportement…). La pesée hebdomadaire des animaux est réalisée et permet d'adapter l'intensité de l'exposition aux RF au poids moyen du groupe. La température est mesurée au niveau rectal avant et après exposition (conditions RF, Sham, Témoin) en alternance matin et après-midi, une fois par semaine.

III. Tests comportementaux

Les tests de comportement débutent 48h après la fin de l'exposition aux RF (Figure 24). Le nombre de rats par groupe est de 12 à priori, cependant en fonction de l'âge, ce nombre a pu varier (problèmes techniques, mortalité, animaux malades). Le nombre exact de rats est précisé pour chaque résultat dans la partie suivante (Contributions expérimentales).

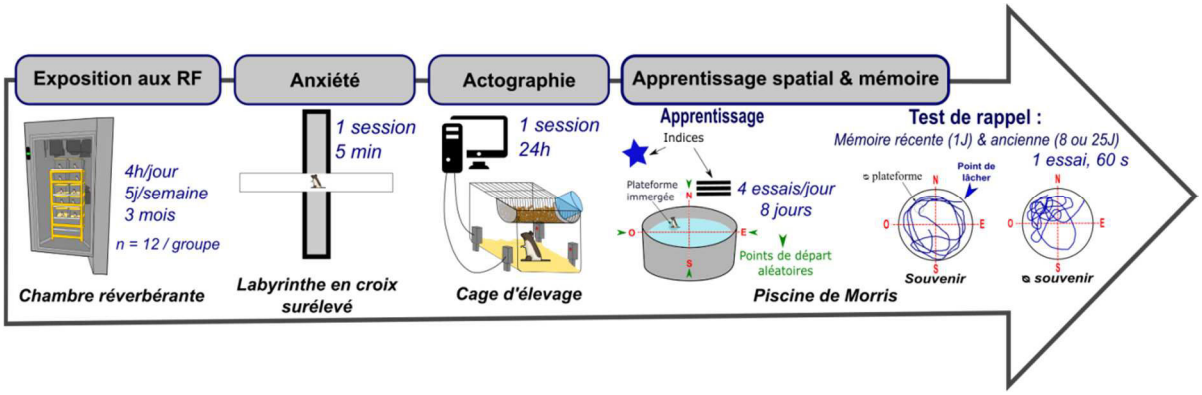


Figure 24 : Frise chronologique pour les études comportementales.

III.1. Le labyrinthe en croix surélevé

III.1.1. Description du dispositif

Ce labyrinthe en croix est constitué de 4 bras de plexiglas noir, 2 bras ouverts et 2 bras fermés, le tout situé à 73 cm au-dessus du sol. Les bras, d'une longueur de 50 cm et d'une largeur de 10 cm, sont opposés deux à deux et reliés à un espace central de 10 x 10 cm. Les bras fermés Nord (N) et Sud (S) sont entourés d'une paroi opaque et rigide d'une hauteur de 40 cm et les bras ouverts Est (E) et Ouest (O) d'un petit rebord de 1,5 cm (Figure 25).

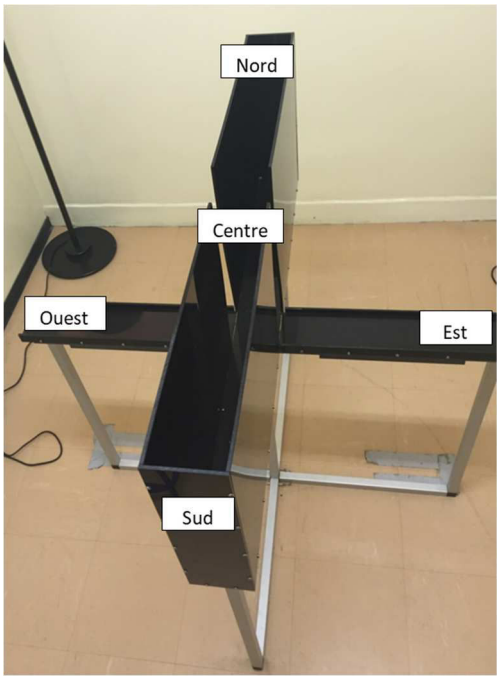


Figure 25 : Labyrinthe en croix surélevé, bras Nord et Sud fermés et bras Est et Ouest ouverts

Le test se déroule dans une pièce close sans fenêtre ni lumière extérieure ; l'éclairage est contrôlé à l'aide de quatre lampes halogènes installées autour du labyrinthe. Lors de la mise en place du test, l'intensité lumineuse est précisément ajustée à l'aide d'un luxmètre pour que celle-ci soit de 10 lux au bout des bras ouverts, 2 lux au sein des bras fermés et 7 lux sur la plateforme centrale (Loureiro *et al.* 2012; Ali *et al.* 2017). Ces valeurs sont contrôlées fréquemment tout au long du test.

Une caméra est placée à la verticale au-dessus du dispositif et reliée à un ordinateur pour visualiser en temps réel des comportements des animaux à distance. Le logiciel associé permet à l'expérimentateur de comptabiliser le nombre d'entrées et le temps passé dans chaque partie du labyrinthe.

III.1.2. Principe de la tâche

Le test du labyrinthe en croix surélevé exploite une double contrainte chez les rongeurs. Ces derniers, nocturnes et donc montrant une aversion pour la lumière, sont à la fois très curieux mais ont peur de la nouveauté et des espaces ouverts et éclairés. Les bras fermés représentent donc un espace sécurisé pour l'animal mais offrent peu de possibilités d'exploration. Quant aux bras ouverts, ils permettent une plus grande exploration, mais sont également anxiogènes.

Ce labyrinthe est ainsi couramment utilisé pour évaluer le niveau d'anxiété d'un animal après un traitement particulier, comme par exemple après une lésion d'une région cérébrale (noyaux réuniens, (Loureiro *et al.* 2012), ou encore une exposition aux radiofréquences (Cosquer, Vasconcelos, *et al.* 2005). Ce labyrinthe est également utilisé pour des tests de validation préclinique de nouveaux traitements anxiolytiques ou d'antidépresseurs (Fajemiroye *et al.* 2018; Walf et Frye 2007).

III.1.3. Déroulement du test

L'animal est placé dans une cage propre, sans litière, dans la pièce d'expérimentation, pendant 5 min, afin qu'il s'habitue au nouvel environnement avant le test. Puis celui-ci débute en plaçant le rat sur la plateforme centrale, sa tête orientée vers le bras Nord. L'animal peut alors explorer librement le dispositif pendant 5 min.

L'expérimentateur rejoint rapidement le poste informatique dissimulé dans un coin de la pièce. Le nombre d'entrées dans chaque bras (N, E, S, O) et sur la plateforme centrale, ainsi que le temps passé dans chaque zone et le nombre de défécations dans la cage et dans le labyrinthe (indice d'anxiété) sont comptabilisés. Après le passage d'un animal dans le dispositif, celui-ci est soigneusement nettoyé à l'alcool 70%, de manière à réduire et uniformiser les informations olfactives laissées par le rat précédent.

III.2. L'actographie en cage d'élevage

Ce test permet l'enregistrement sur une longue durée de l'activité locomotrice spontanée horizontale de l'animal dans sa cage d'élevage (Figure 26). Ce test est ainsi particulièrement adapté à l'étude des effets durables d'un traitement ou dans notre cas, d'une exposition chronique. L'un des avantages d'un enregistrement sur 24 h est la possibilité d'étudier l'activité des animaux lors de l'habituation au dispositif (2 premières heures), ainsi que leur activité pendant les périodes nocturne et diurne.

Figure 26 : Test d'actographie en cage d'élevage.

L'enregistrement de l'activité de l'animal dans sa cage d'élevage est possible grâce à des cellules photoélectriques situées de part et d'autre de la cage, qui émettent un faisceau infrarouge. Lorsque l'animal bouge et traverse sa cage, les faisceaux se rompent, ce qui reflète l'activité locomotrice de l'animal. Chaque cage est équipée de deux cellules photoélectriques et deux réflecteurs. Les faisceaux distants de 28 cm sont situés à 4,5 cm du fond de la cage et 4 cm de chaque extrémité de la cage.

Les cellules photoélectriques sont reliées à un ordinateur chargé de compiler les résultats selon la règle suivante : pour qu'une unité d'activité locomotrice soit comptée, l'animal doit interrompre les deux faisceaux successivement. L'activité comportementale est enregistrée à une fréquence d'échantillonnage de 15 min, puis analysée heure par heure.

III.3. Piscine de Morris

III.3.1. Description du dispositif

La piscine de Morris est une enceinte circulaire en PVC blanc de 160 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur. Lors des essais, la piscine est remplie à mi-hauteur, soit environ 700 litres d'eau opacifiée par 500 g de lait en poudre et à une température de 20°C ± 1°C. Cette température confère à l'eau son caractère aversif pour l'animal et en fait donc une source de motivation pour sortir rapidement, afin de ne pas se mettre en danger (hypothermie). Une plate-forme cylindrique en plastique transparent de 11 cm de diamètre est disposée au centre de l'un des 4 quadrants virtuels et immergée 2 cm sous la surface de l'eau (Figure 27A).

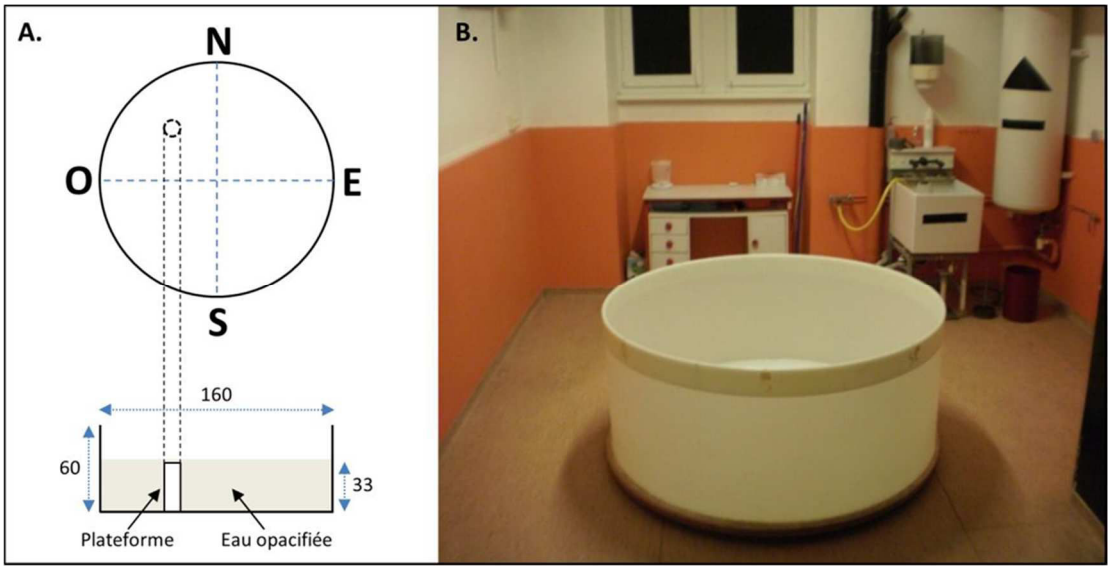


Figure 27 : Piscine de Morris

Représentation schématique (A) et photographie (B) du dispositif. Les dimensions sont en cm.

L'immersion de la plateforme ainsi que l'eau opacifiée permettent de rendre la plateforme invisible aux yeux de l'animal. Une caméra est placée au-dessus de la piscine et reliée à un ordinateur avec un système de traçage (système Smart, SD Instruments, Etats-Unis) permettant de suivre le trajet du rat et d'enregistrer différents paramètres (le temps de nage, la latence d'arrivée à la plateforme, la distance parcourue, la vitesse de déplacement, le nombre d'entrées dans chaque zone, le nombre de croisements sur la zone de la plateforme, le temps passé le long des parois ou thigmotaxie). Pour se repérer et trouver la plateforme, le rat utilise les indices allocentriques présents dans la pièce (repères muraux, horloge, évier, etc., Figure 27B) (Morris 1984; Lopez *et al.* 2012).

III.3.2. Principe de la tâche

La piscine de Morris est conçue pour évaluer la capacité des animaux à utiliser des indices spatiaux et à se construire une représentation allocentrique d'un environnement afin de mémoriser la localisation d'une plateforme fixe cachée sous la surface de l'eau (Morris 1984). Le terme "allocentrique" fait référence à des informations spatiales statiques dans un cadre de référence extérieur (objets environnants) qui n'implique pas l'animal. La mémoire allocentrique s'oppose à une mémoire dite "égocentrique" basée sur un système de coordonnées intégrant les axes du corps, permettant de calculer constamment les distances parcourues, les virages effectués, la vitesse de locomotion, le temps écoulé, …

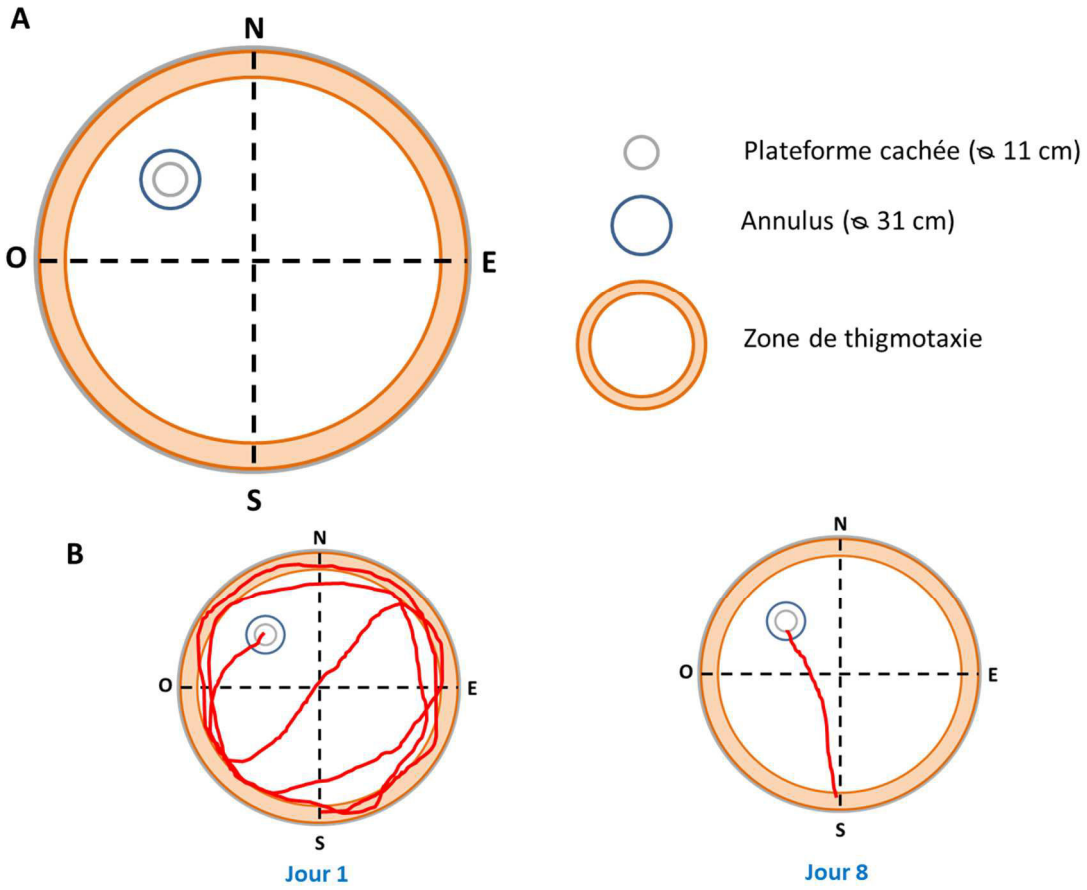


Figure 28 : Définition des différentes zones ou quadrants virtuels (A) et exemples de tracés au cours de l'apprentissage (B)

La répétition des séances d'acquisition au cours desquelles la plateforme cachée est toujours située au même endroit et le point de départ de l'animal modifié de manière aléatoire, permet d'évaluer la mémoire de référence. Cette dernière est définie comme la mémoire de l'emplacement de cette plateforme au sein d'une représentation allocentrique de l'environnement.

III.3.3. Protocole d'acquisition

Des *expériences préliminaires* chez des rats naïfs non exposés (chambre ou RF) (Annexe 1) de mise au point du protocole ont été réalisées afin d'obtenir une bonne performance en rappel à délai long (25j) sur des rats ayant eu précédemment un rappel à un délai court (24h) : en effet un phénomène d'extinction peut s'installer après un test de rappel, nécessitant la poursuite de l'entraînement des rats afin de pouvoir évaluer la mémoire ancienne (25 jours) (Lopez *et al.* 2008). La condition consistant à entrainer les rats pendant 8 jours avec un premier test de rappel à 24h, le 5ème jour, juste avant les 4 essais d'acquisition, a

permis d' obtenir de bonnes performances de rappel à 25 jours (temps passé dans le quadrant cible supérieur au hasard, 25%) chez les rats âgés de 5 et 9 mois : elle a été retenue pour les rats des études de comportement (Figure 24) et les rats des études de biologie moléculaire pour la condition "long terme" mais sans le rappel à 25 jours (Figure 30).

Ainsi, le premier jour d'entraînement consiste en 4 essais consécutifs avec une plate-forme visible dont l'emplacement diffère de celui choisi pour l'acquisition qui suit. De plus, durant ces 4 essais, la piscine est entourée de rideaux afin que l'animal n'ait pas accès aux indices spatiaux. Cette première étape permet à l'animal de s'habituer au dispositif et à la procédure expérimentale consistant notamment à monter sur une plate-forme dans la piscine. Les rats sont ensuite entraînés pendant 8 jours avec une plate-forme invisible (cachée sous la surface de l'eau opacifiée et sans rideau), à raison de 4 essais par jour avec des points de départ différents à chaque essai (Figure 29). A chaque essai, l'animal a 60 sec pour trouver et monter sur la plateforme : s'il échoue, il est guidé par l'expérimentateur jusqu'à la plateforme. Les rats restent 10 sec sur cette dernière, pour se repérer et mémoriser les indices de la pièce.

La latence, la distance d'accès à la plate-forme, le temps passé par les animaux à proximité des parois de la piscine (thigmotaxie), la vitesse de nage sont enregistrés pendant l'acquisition (Figure 28A). L'apprentissage de la tâche se traduit par une diminution progressive de la distance parcourue par l'animal et de la latence d'accès à la plateforme avec la répétition des essais et des sessions (Figure 28B).

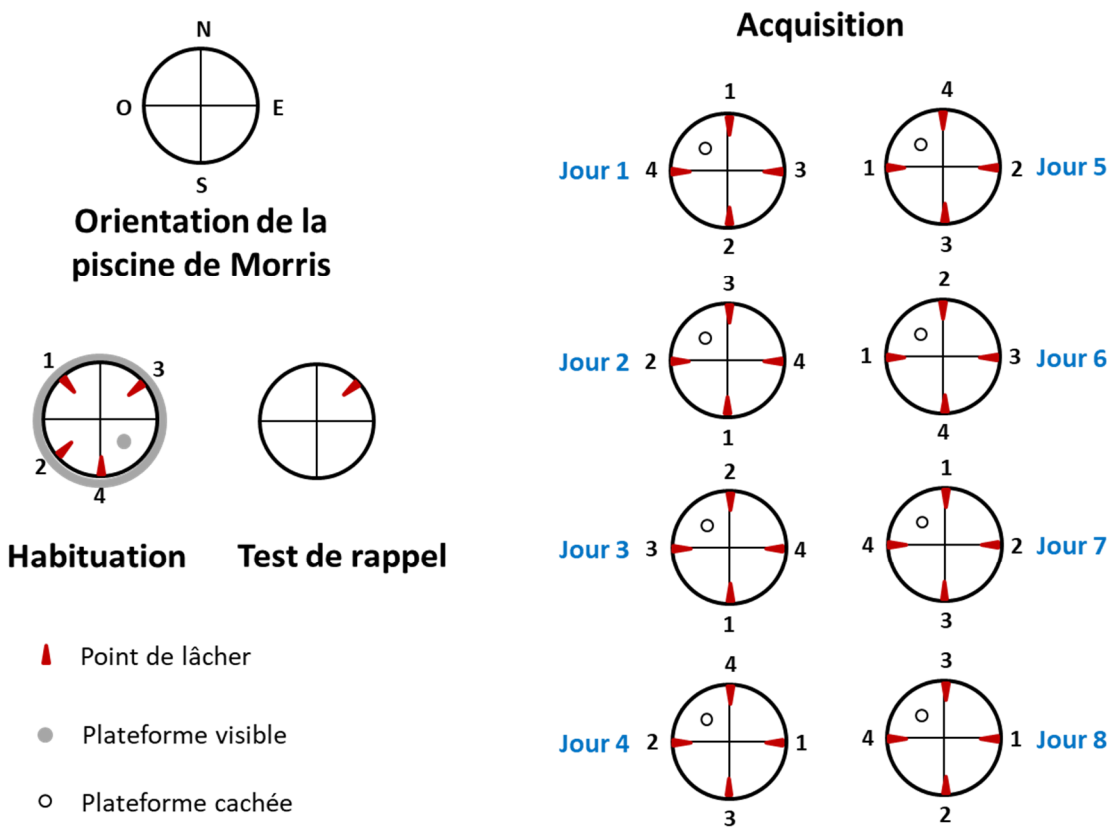


Figure 29 : Représentation schématique des différents points de lâcher pour le jour d'habituation, au cours de l'acquisition et lors du rappel.

Pour les rats destinés aux études moléculaires, les protocoles utilisés sont légèrement différents : pour la condition 1 (Basal et Apprentissage), les animaux sont entrainés uniquement pendant 3 jours (4 essais/jour) sans aucun test de rappel, et sont mis à mort le troisième jour après le dernier essai en piscine de Morris. Pour les rats en condition 2 (Basal et Apprentissage à long terme), un protocole complet de 8 jours est utilisé avec un test de rappel le 5ème jour (voir paragraphe suivant) puis ils sont mis à mort 25 jours après le dernier jour d'apprentissage sans test de rappel.

III.3.4. Test de rappel (probe)

Lors des tests de rappel, la plate-forme est retirée de la piscine, le reste du dispositif et la pièce étant en tout point identiques à la phase d'acquisition. Les rats sont lâchés d'un point de départ différent de ceux utilisés lors de l'acquisition de la tâche et ils n'ont qu'un seul essai de 60 sec (Figure 29). Le temps passé dans chaque quadrant est enregistré et exprimé sous la forme d'un pourcentage : un temps passé dans le quadrant cible significativement supérieur au hasard (25%) est synonyme d'une "préférence de place" pour ce quadrant, indiquant le rappel

de l'emplacement de la plateforme. De même, le nombre de passages dans l'aire cible, c'est-à-dire une zone de 31 cm de diamètre comprenant l'aire de la plateforme et un anneau de 10 cm de large autour de ce disque (représentant 3,5% de la surface totale de la piscine) est mesuré. Celui-ci rend compte de la précision de la recherche et donc du souvenir (Lopez *et al.* 2012). D'autres paramètres tels que la vitesse de nage, la thigmotaxie et la latence pour atteindre la zone de plateforme sont également enregistrés et analysés.

IV. Mise à mort des animaux et prélèvement des cerveaux

IV.1. Perfusion intracardiaque

Une heure et demie après le test de rappel en piscine de Morris (8 ou 25 jours), les rats des études du comportement sont euthanasiés à l'aide d'une injection létale de doléthal (pentobarbital sodique 100 mg/kg, IP). Une perfusion intracardiaque tout d'abord de 50 mL d'une solution de NaCl 9/°°(4°C) est réalisée pendant 5 min, puis 150 mL d'une solution de paraformaldéhyde (4%) dissout dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) pendant 15 min à 4°C permet de fixer les tissus cérébraux. Les cerveaux sont ensuite extraits de la boîte crânienne et placés dans ce même fixateur à 4°C pendant 4h, puis transférés dans une solution cryoprotectrice (saccharose à 30% et à 4°C) pour 36h. Une fois ce délai écoulé, les cerveaux sont congelés dans de l'isopentane à -40°C puis conservés au congélateur à -80°C. Ce protocole de conservation des cerveaux a été utilisé pour donner la possibilité d'effectuer l'étude ultérieure de marqueurs en immunohistochimie, par exemple, les protéines c-fos ou zif268 si cela s'avérait pertinent. Ceci n'a pas été réalisé dans le cadre de ma thèse.

IV.2. Décapitation pour microdissection sur tissu frais

Pour les rats des études moléculaires, une heure après le test de piscine de Morris (Figure 30), une injection de kétamine/xylazine (selon le ratio ¾ kétamine et ¼ xylazine) est réalisée en intra-péritonéal (0.21 ml/100g). Environ 3 min après l'injection (dès que l'animal est calme), le rat est décapité et le cerveau est extrait de la boîte crânienne et placé dans du PBS à 4°C. Les rats "Home Cage" (sans apprentissage) sont mis à mort dans les mêmes conditions. Les cerveaux sont alors immédiatement micro-disséqués et différentes structures sont isolées dont le cortex préfrontal médian (mPFC), l'hippocampe dorsal (dHip) et ventral (vHip) et congelées rapidement dans l'azote liquide. Les prélèvements sont stockés à -80°C.

V. Analyse de l'expression des gènes

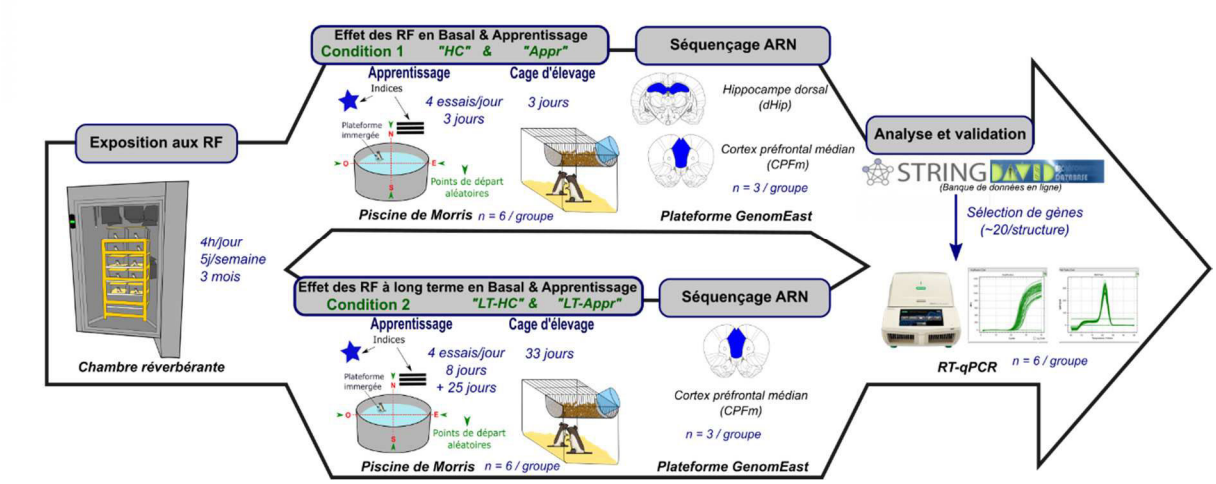


Figure 30 : Frise chronologique pour les études en biologie moléculaire.
Au sein des approches en biologie moléculaire, deux conditions sont testées : condition 1 (partie haute de la frise) permet l'étude de l'expression des gènes en condition d'apprentissage avec une mise à mort de l'animal après le dernier essai du 3ème jour d'entraînement en piscine et en condition basale (sans apprentissage); condition 2 (partie basse de la frise) permet l'étude de l'expression des gènes 36 jours après l'arrêt de l'exposition aux RF (long terme) avec une mise à mort de l'animal 25 jours après le 8ème jour d'apprentissage dans la piscine.

Après l'exposition aux RF, les animaux de chaque groupe d'exposition (Témoin, Sham et RF) sont répartis en deux groupes : ceux qui effectueront un apprentissage en piscine de Morris (3 jours pour la condition 1, et 8 jours pour la condition 2), l'autre moitié reste en cage d'élevage ("Home Cage" ou "HC"). La condition 1 est commune aux trois groupes d'âge ("Ados", "Adultes" et "Agés") alors que la condition 2 est réalisée uniquement chez les "Ados" et les "Adultes". Cette condition n'a pas été testée chez les rats du groupe "Agés" (21 mois) car en plus d'un nombre de rats faible dû à une mortalité non négligeable à cet âge, des études antérieures au laboratoire ont montré l'absence de capacité de rappel d'un souvenir ancien (Fuchs *et al.* 2016).

La mise à mort de tous les animaux (Appr et HC) est effectuée au même moment et les tissus récoltés (voir paragraphe précédent) sont conservés à -80°C avant d'être utilisés pour les différentes analyses moléculaires.

Les ARN totaux sont extraits des tissus et quantifiés sur le génome entier afin d'observer les variations d'expression des gènes, induites par les RF.

V.1. Préparation des ARN totaux

Le tissu est broyé et homogénéisé dans du trizol, puis placé à -80°C pendant 20 min afin d'éclater les noyaux. Deux étapes d'ajout de CHCl3/isolamyl (24/1) suivies à la fin de chacune par une centrifugation afin de séparer les différentes phases et de récupérer l'ARN dans le surnageant. Deux étapes de précipitation de l'ARN sont réalisées, l'une pendant 1h à 4°C dans de l'isopronol, suivie d'un lavage à l'éthanol 70%, l'autre sur toute une nuit à -20°C dans de l'éthanol 100%. Le lendemain, après une première centrifugation, le culot d'ARN est lavé 2 fois à l'éthanol 70%. Puis il est totalement séché et repris dans de l'eau milliQ et chauffé pendant 6 min à 50°C pour améliorer la dissolution.

L'ARN est dosé par lecture de l'absorbance à 260 nm au Nanovue. Les ratios 260/280 et 260/230 permettent respectivement de vérifier la non contamination par des protéines ou par des sels.

V.2. Séquençage d'ARN ou RNA-seq

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

V.2.1. Préparation des librairies

Des banques d'ARN-Seq (n = 3 / groupe) sont générées à partir de 300 ng du kit de préparation d'échantillons d'ARN_{totaux} Illumina® TruSeq® v2 (numéro de pièce RS-122-2001). En bref, 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.

V.2.2. Analyses du séquençage et statistiques

Les "*reads*" sont cartographiés sur l'assemblage rn6 du génome de rat en utilisant TopHat v2.0.14 (D. Kim *et al.* 2013) et l'algorithme de bowtie 2-2.1.0. L'expression génique est quantifiée à partir des "*reads*" alignés de manière unique en utilisant HTSeq-0.6.1 (http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html) et des annotations de gènes de la version Ensembl 86. 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) (Love *et al.* 2014) ajustés dans la bibliothèque DESeq2 Bioconductor (v1.0.19). Les "*p-value*" résultantes sont ajustées pour des tests multiples en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg (1995). La comparaison croisée des données RNAseq est effectuée à l'aide de Venny 2.1 (Oliveros, 2007-2015). 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 da et al, 2009) et STRING (Protein-Protein Interaction Networks, © STRING Consortium 2018, https://string-db.or, (De Souza *et al.* 2018). Le génome du rat entier (rn6) 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).

V.3. Validation par RT-qPCR

V.3.1. Rétrotranscription

La transcription inverse consiste en la synthèse d'un ADN, dit ADN complémentaire (ADNc), à partir d'un ARN servant de matrice grâce à une enzyme ADN polymérase : la transcriptase inverse. Les ARN sont aliquotés à 0,5 µg par tube (volume final de 10 µl), s'ensuit une étape d'élimination de l'ADN génomique (gDNAse) pendant 5 min (dsDNase, issue du kit Thermo Scientific Maxima™ H Minus cDNA Synthesis Master Mix with dsDNase). L'ajout d'un mix réactionnel 1x (5x Maxima cDNA H Minus Synthesis Master Mix [ThermoScientific]) contenant la réverse transcriptase permet d'obtenir un volume de 20 µl pour la réaction de rétrotranscription. La synthèse des ADNc se divise en trois étapes qui consistent en l'hybridation des amorces avec la matrice (25°C, 10 min), la synthèse des ADNc (50°C, 15 minutes) et la séparation des brins d'ARN et d'ADNc (85°C, 5 min). Les ADNc néosynthétisés sont dilués au 20ème et conservés à -20°C.

V.3.2. Synthèse des amorces

La séquence ribonucléotidique des ARNm des gènes cibles du rat est recherchée via le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ainsi que l'organisation de ceux-ci en exons dans le génome du rat. La séquence codante de l'ARNm est saisie dans Primer 3 (http://primer3.ut.ee/) où la référence du gène (XM ou NM) est utilisée avec le site IDT (Integrated DNA Technologies, https://eu.idtdna.com/scitools) afin d'obtenir des amorces sens et anti-sens. L'utilisation de ces deux sites permet de sélectionner les amorces selon plusieurs critères tels que la taille des amorces et de l'amplicon et la température d'hybridation.

Le site UCSC In-Silico PCR (http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=229019401_J0fejKdtrappnoVr0TlOuCALreYL) permet de vérifier les gènes ciblés par les amorces choisies. Les séquences ainsi conçues sont envoyées au laboratoire Eurogentec qui les synthétise, puis elles sont validées par qPCR sur une gamme de concentration de cDNA avant d'être utilisées sur les échantillons (Annexe 9).

V.3.3. qPCR

La réaction par polymérisation en chaîne en temps réel ou PCR quantitative (qPCR), couplée à une rétrotranscription, est la technique à même de permettre la quantification de l'expression des gènes. Une dilution du couple d'amorces est préparée dans de l'eau ultra-pure, pour obtenir une concentration finale de 200 nM dans chaque puits de réaction. Chaque échantillon, après la rétrotranscription, est dilué au 20ème avant la qPCR.

La qPCR est réalisée en plaque de 96 puits, en duplicat. Chaque puits contient 5 µl d'ADNc (dilué au 20ème), 4 µl de Master mix (PowerUp SYBR Green Master Mix [Thermoscientific]), et 1 µl d'amorces. Le volume final dans chaque puits est donc de 15 µL. Le supermix utilisé inclut des dNTP, l'enzyme qui synthétise l'ADN à partir de l'ADNc, du chlorure de magnésium MgCl2 apportant les cofacteurs nécessaires au fonctionnement de l'enzyme et le SYBR Green. Ce dernier est une molécule pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléiques doubles brins et ainsi faire office de fluorophore. Ainsi, dès lors qu'il est fixé à de l'ADN double brin, il permet de suivre l'évolution de la quantité d'ADN synthétisé.

La technique de qPCR appliquée au laboratoire est une succession de 45 cycles de 2 étapes (3 secondes à 95°C pour dénaturer l'ADNc et séparer le double brin de l'ADNc puis 30 secondes à 60°C pour l'hybridation) au sein d'un thermocycleur couplé à un système optique pour l'excitation et la détection des fluorochromes (CFX Connect Real-Time System, [Bio-Rad]).

Le protocole commence par l'activation de l'Uracil DNA Glycosylase (UDG) à 50°C pendant 2 min, afin d'éliminer de possibles contaminations accumulées par les réactions précédentes avant le début des cycles.

La dénaturation des ADN doubles brins se fait lors d'un chauffage à 95°C pendant 3 sec. Elle est à l'origine de la rupture des liaisons hydrogènes entre les brins d'ADN complémentaires aboutissant ainsi à l'obtention de simples brins d'ADN.

L'hybridation des amorces et l'élongation consiste en une paire d'amorces sens et anti-sens qui s'hybride avec les ADN cibles simples brins, lors d'un chauffage à 60°C pendant 30 sec. Ces cycles sont précédés par une étape de chauffage à 95°C pendant 2 min afin d'avoir un départ à haute température ("hot start") pour la Taq polymérase, et ainsi augmenter sa spécificité (élimination d'amplification non spécifique). Ces cycles sont répétés 40 à 45 fois et suivis d'une étape de dénaturation des brins, pendant laquelle la température augmente de 5°C toutes les 5 sec, dans un intervalle de température compris entre 65°C et 95°C. Une courbe de fusion est créée grâce à cette ultime étape, et ainsi la température de fusion des produits de PCR estimée. Tout au long de l'amplification moléculaire, l'appareil mesure l'évolution de la fluorescence : plus la quantité d'ADN double brin est grande, plus la fluorescence augmente.

V.3.4. Quantification/ Expression des résultats

La méthode utilisée est celle de la quantification relative à partir de valeur seuil (Cq). Le Cq correspond au cycle à partir duquel est détectée la fluorescence. Ainsi, plus un gène est exprimé, plus le niveau de fluorescence atteindra le seuil rapidement. Ainsi, le Cq reflète le niveau d'expression d'un gène.

Pour chaque rat, la quantité relative de chaque gène est divisée par l'expression relative des gènes de référence (la polymérase II (Pol II) ou Pol II et 36B4). Au final, la moyenne des expressions relatives d'un même gène de tous les rats d'un même groupe est calculée, ainsi que l'erreur standard sur la moyenne (SEM) qui permet d'analyser la variabilité intragroupe de l'expression du gène. L'expression finale en pourcentage est arbitrairement basée sur le groupe témoin sans apprentissage ou "Home Cage, HC" (100%).

VI. Analyses statistiques

VI.1. Tests comportementaux

L'ensemble des tests statistiques est réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Ils différent selon les tests et les paramètres étudiés, mais avec un facteur commun, G**roupe,** correspondant aux différentes conditions d'exposition (Témoin, Sham et RF). Les tests statistiques sont réalisés au sein d'un même groupe d'âge.

- Les données biologiques (poids et température corporelle, mortalité) sont analysées, pour le poids, par une ANOVA à 2 facteurs, **Groupe** comme facteur indépendant et **Semaine** [1, 2, …15], comme facteur avec mesures répétées. Pour la température corporelle, une ANOVA à 2 facteurs considérant **le Groupe** et **le Moment** (avant exposition, après exposition) est réalisée pour les 2 périodes de la journée (matin et après-midi), avec **le Moment** en mesures répétées. Les pourcentages de mortalité sont comparés entre chaque groupe (RF, Sham, Témoin) par un test de Khi-deux.
- L'analyse des résultats du labyrinthe en croix surélevé est faite par une ANOVA à 2 facteurs indépendants considérant le **Groupe** et la **Zone** (bras ouverts, bras fermés, centre) pour le temps passé dans chaque zone ou les facteurs **Groupe** et **Place** (cage, labyrinthe) pour le paramètre défécation.
- L'activité locomotrice est analysée, i) par une ANOVA à 2 facteurs, considérant le **Groupe,** comme facteur indépendant et l'Heure [10h, 11h, 12h….] comme facteur avec mesures répétées ainsi que ii) par une ANOVA à deux facteurs, **Groupe** et **Période** (jour, nuit, habituation), ce dernier comme facteur avec mesures répétées.
- Les résultats des tests en piscine de Morris sont analysés pour l'essentiel par une ANOVA à 2 facteurs avec pour les paramètres de l'apprentissage (latence, distance, thigmotaxie et vitesse) le **Groupe** comme facteur indépendant et le **Jour** [1, 2, 3….8] comme facteur avec mesures répétées Pour le rappel, le temps passé dans le quadrant cible est analysé par une ANOVA à 2 facteurs, **Groupe et Quadrant** (cible, autres). Une comparaison à une valeur fixe permet de comparer le temps passé dans le quadrant cible et les 3 autres quadrants au hasard (15 sec ou 25%) à l'aide d'un t test de Student. Les autres paramètres (thigmotaxie, vitesse, latence d'accès à la plateforme ou annulus sont analysés par une ANOVA à 2 facteurs (**Groupe** et **Délais**).

Pour toutes les analyses ANOVA, des comparaisons multiples sont réalisées en post-hoc, par le test de Newman-Keuls de rang multiple.

Le seuil de significativité utilisé est de 0,05 pour l'ensemble des analyses statistiques. La présentation graphique des résultats se fait sous la forme de moyennes ± SEM.

VI.2. Analyses en biologie moléculaire

L'ensemble des tests statistiques est réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Ils différent selon les tests et les paramètres étudiés, mais avec un facteur commun, **Groupe**, correspondant aux différentes conditions d'exposition (Témoin, Sham et RF). Les tests statistiques sont réalisés au sein d'un même groupe d'âge.

- Les résultats des tests en piscine de Morris sont analysés pour l'essentiel par une ANOVA à 2 facteurs le **Groupe** comme facteur indépendant et le **Jour** [1, 2, 3] ou [1,2, …8] comme facteur avec mesures répétées.
- Les résultats issus des approches moléculaires sont analysés par une ANOVA à deux facteurs **Groupe** (Témoins, Sham, RF) et **Apprentissage ou Appr** (Home Cage et piscine [Apprentissage ou Persistance]).

Pour toutes les analyses ANOVA, des comparaisons multiples sont réalisées en post-hoc, par le test de Newman-Keuls de rang multiple.

Le seuil de significativité utilisé est de 0,05 pour l'ensemble des analyses statistiques. La présentation graphique des résultats se fait sous la forme moyenne ± SEM.

Contributions expérimentales

Partie 1 : Expositions au signal 4G et données biologiques

I. Evaluation du poids corporel

Les rats exposés à la 4G sont pesés chaque semaine à partir de leur entrée dans le protocole d'exposition jusqu'à leur mise à mort. Ainsi, durant l'exposition aux RF, le débit d'absorption spécifique, ou DAS, a été maintenu à 0,33 W/kg et ajusté à l'évolution du poids moyen du groupe chaque semaine. Le suivi du poids est inclus dans le suivi individuel du "bien-être" et de la santé des rats. Les données présentées dans cette partie sont celles collectées pendant les 3 mois d'exposition, afin d'étudier l'effet des RF sur la prise de poids, ainsi que celles recueillies pendant les tests comportementaux et pour les analyses moléculaires (persistance). Ceci permet d'étudier l'effet des RF sur le poids à long-terme, jusqu'à un mois après la fin de l'exposition.

La semaine précédant le début de l'expérience, les animaux sont pesés et les groupes d'exposition sont constitués de manière à ce qu'il n'y ait aucune différence significative entre les groupes au niveau poids moyen de départ. Dans cette partie, nous présenterons les poids "*poolés*" pour chaque âge. Les données "*non poolées*" sont analysées dans l'Annexe 2.

I.1. Groupes des rats "Ados"

I.1.1. Au cours de l'exposition

Pour rappel, le groupe des "Ados" commence le protocole d'exposition (3 mois) à l'âge d'un mois, il le termine donc à l'âge de 4 mois. Le groupe de 108 rats "Ados" est donc divisé en deux lots exposés séparément :

- Le premier lot (N = 72, soit n = 24/groupe d'exposition) fut exposé de juin à août 2016 et divisé en deux pour la suite des expériences : tests comportementaux (N = 36, soit n = 12/groupe d'exposition) et biologie moléculaire, apprentissage (N = 36, soit n = 6 par groupe expérimental)
- Le second lot (N = 36, soit n = 6/groupe expérimental) fut exposé de septembre à décembre 2018 pour les analyses en biologie moléculaire (persistance).

Le poids des animaux est suivi tout au long de l'exposition. Les données recueillies dans ces deux lots sont regroupées et analysées ensemble (Figure 31).

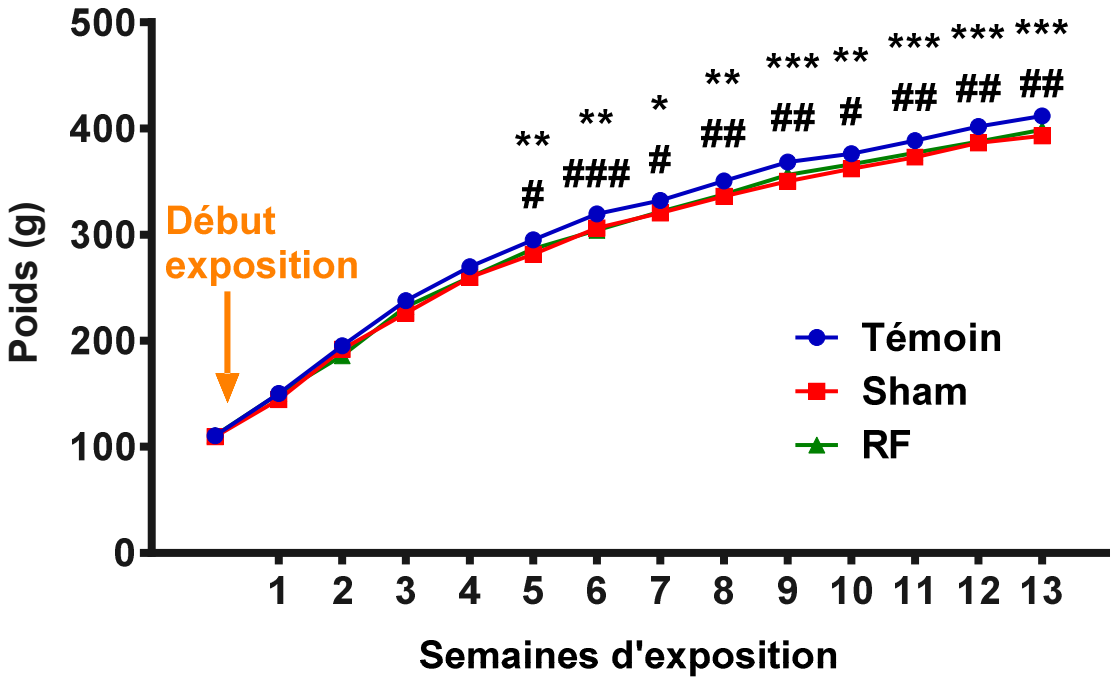


Figure 31 : Evolution du poids corporel pour les rats du groupe "Ados".
Les données sont représentées sous la forme moyenne ± SEM, au cours du temps (n = 36/groupe). Le premier point correspond à la pesée avant l'entrée dans le protocole d'exposition afin de constituer les groupes Sham, RF et Témoin. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, différences statistiquement significatives groupe Sham *vs* Témoin et #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 différences statistiquement significatives groupe RF *vs* Témoin.

Avant l'entrée dans le protocole d'exposition, aucune différence significative n'est visible entre le poids moyen des trois groupes d'exposition (ANOVA à un facteur, F(2,105) = 0,40; ns).

L'analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs, dont un en mesures répétées (Groupe et Semaines) de la prise de poids de ces deux lots de rats "Ados" au cours des trois mois d'exposition (13 semaines), montre un effet Semaine, un effet Groupe et une interaction entre les 2 facteurs Groupe et Semaine. En effet, l'analyse statistique des données montre, comme attendu, une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, F(13,1365) = 10480; p<0,001), avec un effet Groupe (F(2,105) = 5,80; p <0,01). On observe également une interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, F(26,1365) = 4,18; p<0,001). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre des différences significatives entre Sham et Témoin (semaine 7, p<0,05; semaines 5, 6, 8 et 10, p<0,01 et semaines 9, 11 à 13, p<0,001) et entre RF et Témoin (semaines 7, 9 et 10, p<0,05; semaines 8, 11 à 13, p<0,01; semaine 6, p<0,001).

Ceci reflète globalement un poids moyen supérieur chez les rats témoins par rapport à celui des rats Sham et des rats RF, notamment à partir de la 5e semaine d'exposition, alors que le poids moyen des rats RF ne diffère pas de celui des Sham.

I.1.2. Après l'exposition

Après l'exposition, certains animaux continuent d'être suivis pendant la suite du protocole (comportement) :

- Le premier lot (N = 36, soit n = 12/groupe) pendant la durée des tests comportementaux, incluant la piscine de Morris et le rappel à 25 jours.
- Le second (N = 36, soit n = 6/groupe) pendant le test de la piscine de Morris avec mise à mort 25 jours après le dernier test en piscine.

Les données recueillies dans ces deux lots sont regroupées et analysées ensemble (Figure 32).

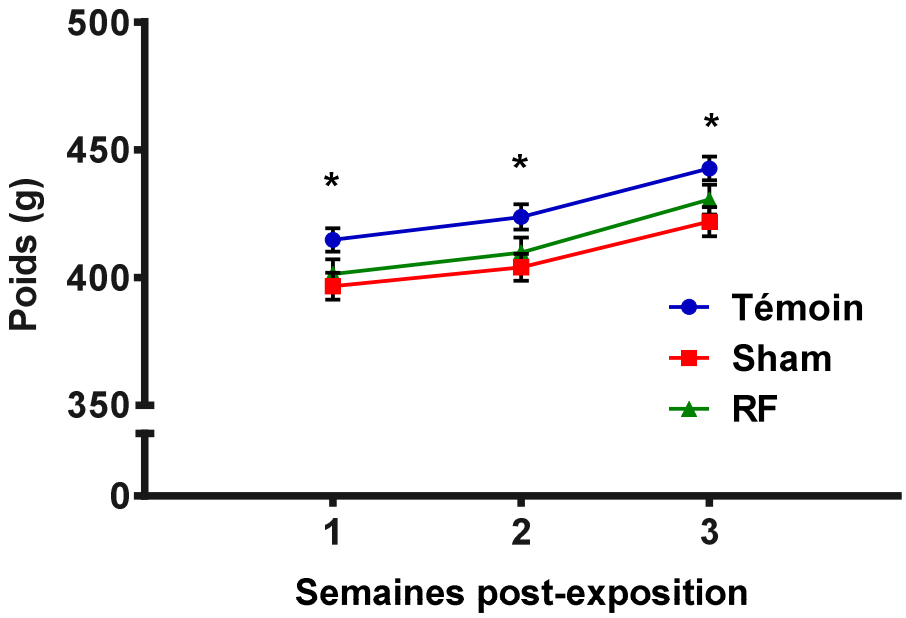


Figure 32 : Evolution du poids après la fin de l'exposition pour les deux lots de rats "Ados".
*Rats "Ados" suivis en post-exposition pendant les tests comportementaux (n = 24/groupe), *p<0,05 différence statistiquement significative entre les groupes Témoin vs Sham. Les valeurs représentent des moyennes ± SEM.*

L'analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs, dont un en mesures répétées (Groupe et Semaines) de la prise de poids de ces deux lots de rats "Ados" après les trois mois d'exposition, montre une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, $F(4,132) = 253,1$; $p<0,001$), avec un effet Groupe ($F(2,33) = 3,43$; $p<0,05$). Cependant,

aucune interaction entre les deux facteurs n'est observée (Groupe x Semaine, F(8,132) = 1,87; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre des différences significatives entre les rats Sham et Témoin ($p<0,05$ pour chaque semaine). L'effet Groupe est le reflet d'un poids plus faible chez les rats Sham et RF, par rapport aux rats Témoins.

Les résultats ne montrent aucun effet propre des RF sur la prise de poids chez le jeune rat mâle (1-4 mois) pendant l'exposition et jusqu'à 3 semaines après la fin de l'exposition. Cependant, au cours de l'exposition, un effet "chambre réverbérante" est observé à partir de la 5e semaine et persiste jusqu'à la fin de l'exposition. En effet, le poids corporel des rats Sham et RF est inférieur à celui des Témoins.

I.2. Groupes des rats "Adultes"

I.2.1. Pendant l'exposition

Pour rappel, le groupe des "adultes" commence le protocole d'exposition (3 mois) à l'âge de 6 mois, il le termine donc à l'âge de 9 mois. Au sein des rats "Adultes", deux lots différents ont été exposés :

- Le premier lot (N = 72, soit n = 24/groupe d'exposition) fut exposé de janvier à avril 2016 et divisé en deux pour la suite des expériences : tests comportementaux (N = 36, soit n = 12/groupe d'exposition) et biologie moléculaire, apprentissage (N = 36, soit n = 6 par groupe expérimental)
- Le second lot (N = 33, soit n = 5-6/groupe expérimental) fut exposé de septembre à décembre 2016 pour les analyses en biologie moléculaire (persistance).

Le poids des animaux est suivi tout au long de l'exposition. Les données recueillies dans ces deux lots sont regroupées et analysées ensemble (Figure 33).

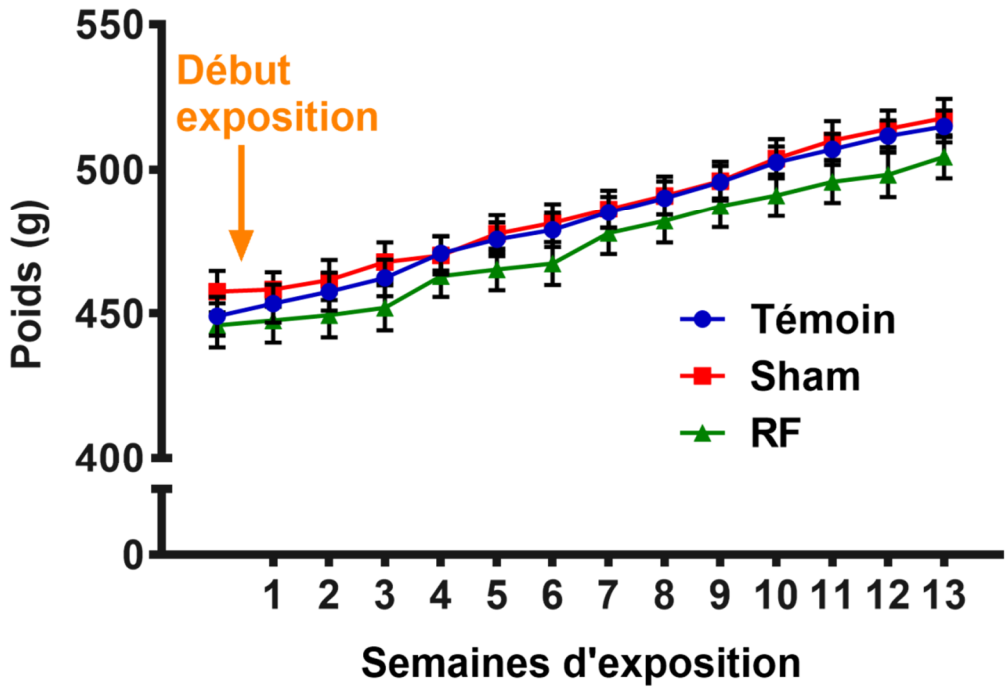


Figure 33 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Adultes".
Les données sont représentées sous la forme moyenne ± SEM, au cours du temps (n = 36/groupe). Le premier point correspond à la pesée avant l'entrée dans le protocole d'exposition afin de constituer les groupes Sham, RF et Témoin.

Avant l'entrée dans le protocole d'exposition, aucune différence significative n'est visible entre le poids moyen des trois groupes d'exposition (ANOVA à un facteur, $F(2,102) = 0,70$; ns).

L'analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs, dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) de la prise de poids de ces deux lots de rats "Adultes" au cours des trois mois d'exposition (13 semaines) montre, comme attendu, une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, $F(13,1326) = 661,4$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,102) = 0,89$; ns). On observe cependant une interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, $F(26,1326) = 1,70$; $p<0,05$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence entre les groupes.

Ceci reflète une prise de poids constante pour les trois groupes : Sham, RF et Témoin.

I.2.2. Après l'exposition

Après l'exposition, certains animaux continuent d'être suivis pendant la suite du protocole (comportement) :

- Le premier lot (N = 35, soit n = 11-12/groupe d'exposition) continue pendant 5 semaines les tests comportementaux.
- Le second lot (N = 33, soit n = 5-6/groupe expérimental) entre dans un protocole d'apprentissage en piscine de Morris avec mise à mort 25 jours après le dernier passage en piscine, soit environ 4 semaines.

Le poids des animaux est suivi après l'exposition, pendant les tests de comportement. Les données recueillies dans ces deux lots sont regroupées et analysées ensemble (Figure 34).

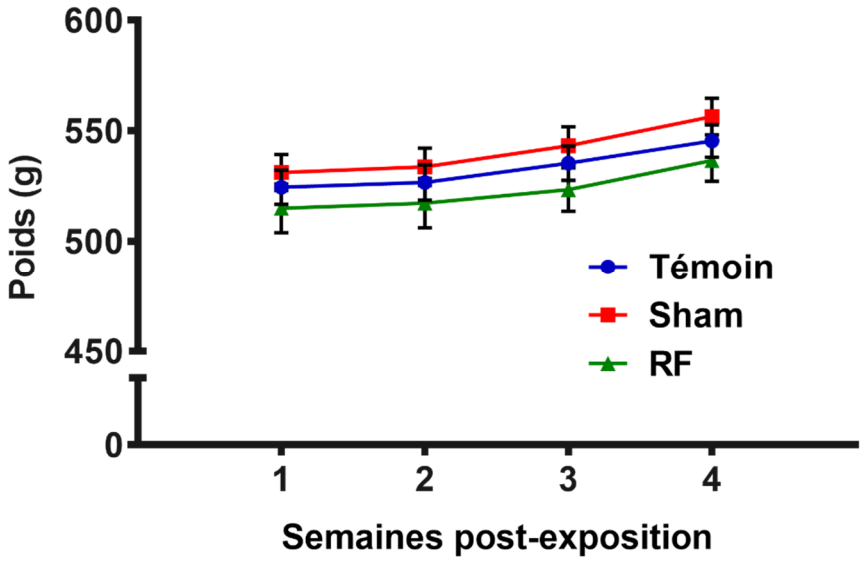


Figure 34 : Evolution du poids après l'exposition pour les deux lots de rats "Adultes".
Rats "adultes" suivis en post-exposition pendant les tests comportementaux (n = 21-24/groupe). Les valeurs représentent des moyennes ± SEM.

L'analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs, dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) de la prise de poids de ces deux lots de rats "Adultes" après les trois mois d'exposition montre une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, $F(3,195) = 94,08$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,65) = 1,07$; ns), ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, $F(6,195) = 0,50$; ns).

En résumé, les résultats ne montrent aucun effet propre des RF sur la prise de poids chez le rat mâle (6-9 mois) pendant l'exposition et jusqu'à 4 semaines après la fin de l'exposition. Contrairement au groupe "Ados", aucun effet "chambre réverbérante" n'est observé.

I.3. Groupe des rats "Agés"

I.3.1. Pendant l'exposition

Pour rappel, le groupe des "Agés" commence le protocole d'exposition (3 mois) à l'âge de 18 mois, il le termine donc à l'âge de 21 mois. Au sein ce groupe, deux lots différents ont été exposés :

- Le premier lot (N = 33, soit n = 11/groupe d'exposition) fut exposé de mars à mai 2017 pour mener les tests comportementaux.
- Le second lot (N = 56, soit n = 8/groupe expérimental) fut exposé de juin à août 2017 pour les analyses en biologie moléculaire (apprentissage).

Le poids des animaux est suivi tout au long de l'exposition. Les données recueillies dans ces deux lots sont regroupées et analysées ensemble (Figure 35).

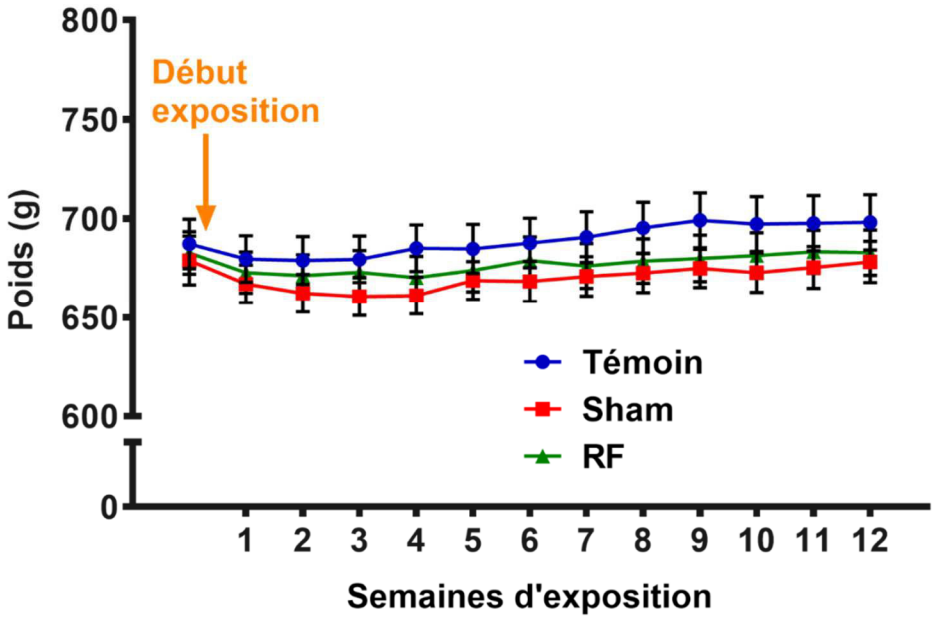


Figure 35 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Agés".
Les données représentées sous la forme moyenne ± SEM, au cours du temps (n = 27/groupe). Le premier point correspond à la pesée avant l'entrée dans le protocole d'exposition afin de constituer les groupes Sham, RF et Témoin.

Avant l'entrée dans le protocole d'exposition, aucune différence significative n'est visible entre le poids moyen des trois groupes d'exposition (ANOVA à un facteur, F(2,83) = 0,12; ns).

L'analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs, dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) de la prise de poids de ces deux lots de rats "Agés" au cours des trois mois d'exposition, montre un effet Semaine ($F(12,996) = 12,34$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,83) = 0,79$; ns), ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, $F(24,996) = 1,09$; ns). L'effet Semaine, contrairement aux rats des groupes "Ados" et "Adultes", ne correspond pas à une prise de poids mais à des fluctuations légères réparties sur les 3 mois d'exposition. L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre des différences de poids entre deux semaines au sein d'un même groupe. Pour les Témoins, des différences significatives ($p<0,05$) sont visibles entre les premières semaines (1 à 4) et les dernières semaines d'exposition (8 à 12) et pour les Sham entre les premières semaines (1 à 4) et des semaines en fin d'exposition (9, 11 et 12). Aucune différence significative entre les semaines n'est observée chez les RF.

I.3.2. Après l'exposition

Après l'exposition, le premier lot de rats poursuit le protocole par des tests comportementaux
(N = 33, soit n = 11/groupe d'exposition) pendant 3 semaines (Figure 36).

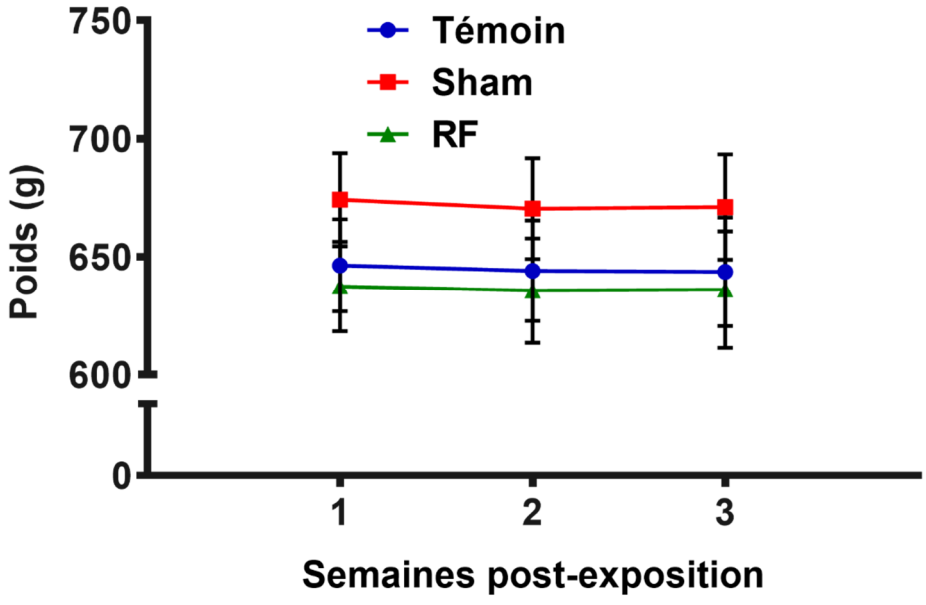


Figure 36 : Evolution du poids après la fin de l'exposition pour le premier lot de rats "Agés".
Rats "Agés" suivis en post-exposition pendant les tests comportementaux (n = 11/groupe). Les valeurs représentent des moyennes ± SEM.

L'analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs, dont un en mesures répétées (Groupe et Semaines) de la prise de poids de ces deux lots de rats "Agés" après les trois mois d'exposition montre une stagnation du poids (Semaine, F(2,56) = 0,53; ns), sans effet Groupe (F(2,28) = 0,78; ns), ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, F(4,56) = 0,03; ns).

En résumé, les résultats ne montrent aucun effet propre des RF sur la prise de poids chez le rat mâle adulte (6-9 mois) pendant l'exposition et jusqu'à 4 semaines après la fin de l'exposition.

En conclusion, pour les trois groupes d'âges, l'évolution du poids n'est pas impactée par une exposition de 3 mois aux RF, ni dans le mois qui suit. Cependant, chez le groupe "Ados", un effet lié à la chambre (groupe RF et Sham) par rapport au groupe Témoin est observé, avec une prise de poids moins rapide pour les rats exposés à la chambre d'exposition (RF, Sham) que pour les Témoins, qui persiste au moins 3 semaines post-exposition.

II. Evaluation de la température

La température rectale est mesurée toutes les semaines au cours de l'exposition (RF, Sham) sur la moitié des animaux/semaine, c'est-à-dire que pour un rat, elle est mesurée toutes les deux semaines. La température corporelle est mesurée juste avant le début et juste après la fin des 4 h d'exposition, pour les deux sessions journalières (Sham ou RF, matin ou après-midi). Il en est de même pour les rats Témoins.

II.1. Groupes des rats "Ados"

Comme pour l'étude du poids corporel, la prise de température est réalisée au cours de l'exposition des rats "Ados", comme présenté dans la Figure 37. A noter que tous les résultats (deuxième lot de rats) sont visibles dans l'Annexe 3.

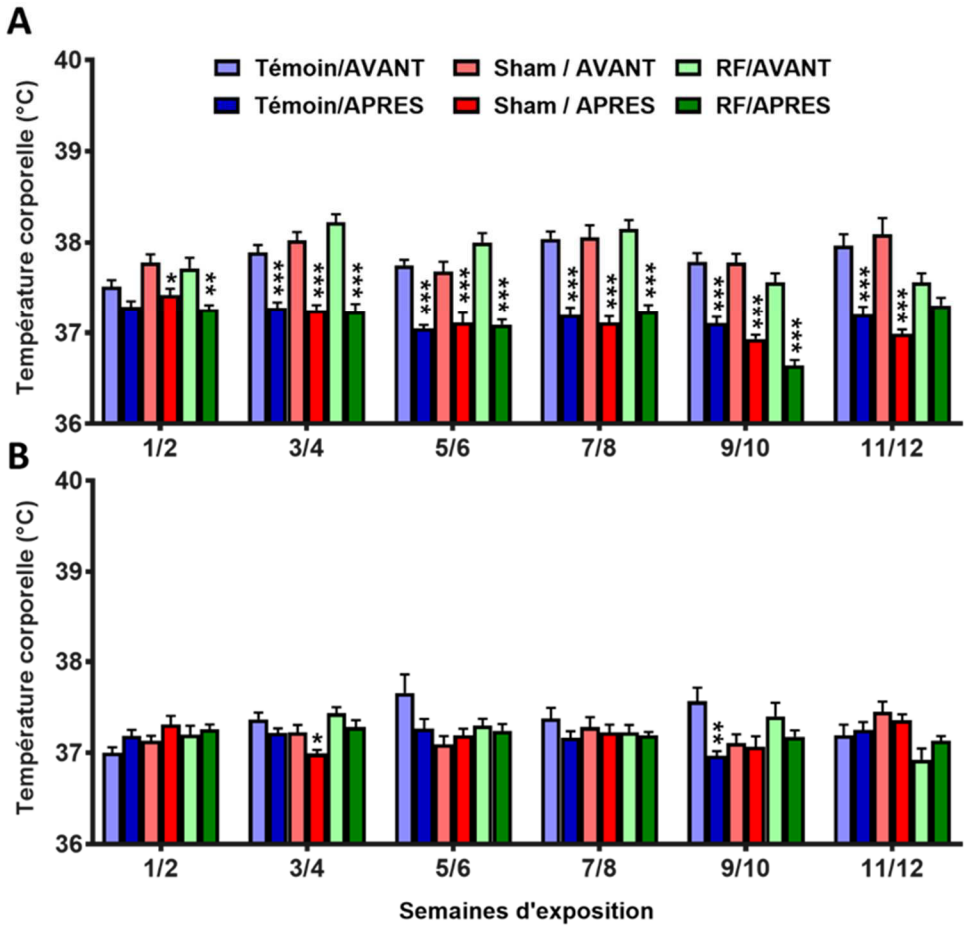


Figure 37 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le premier lot de rats "Ados".

A : Température prise avant et après les 4 h d'exposition ***le matin.*** *B : Température prise avant et après les 4 h d'exposition* ***l'après-midi.*** *Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001, différences significatives entre les températures AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition du matin (Figure 37A) semaine par semaine, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque semaine. Pour les semaines 1/2 et 9/10, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) > 10$; $p<0,001$) avec un effet Groupe ($F(2,66) > 3,18$; $p<0,05$) sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) < 1,2$; ns pour tous). Pour les semaines 3/4, 5/6, 7/8, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) > 111$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,66) < 2,83$; ns pour tous), ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) < 3$; ns pour tous). Pour les semaines 11/12, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 60,91$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,66) = 0,96$; ns) mais avec une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 7,31$; $p<0,01$).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour le matin** (Figure 37A), met en évidence une baisse significative de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins pour les semaines de 3/4 à 11/12 ($p<0,001$); chez les Sham pour les semaines 1/2 ($p<0,05$), et les semaines de 3/4 à 11/12 ($p<0,001$); et chez les RF pour les semaines 1/2 ($p<0,01$) et les semaines de 3/4 à 9/10 ($p<0,001$).

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour le matin, avant l'exposition (Figure 37A), l'analyse statistique montre un effet Semaine ($F(5,165) = 9,22$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,33) = 0,53$; ns) mais avec une interaction entre les deux (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 3,44$; $p<0,001$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre, chez les Témoins, une augmentation significative de la température entre les semaines 1/2 *vs* 3/4, 7/8 et 11/12 ($p<0,05$ ou $p<0,01$), chez les Sham entre les semaines 5/6 et 11/12 ($p<0,05$) et chez les RF, une augmentation de la température entre les semaines 1/2 *vs* 3/4, 5/6, et 7/8 ($p<0,05$ ou $p < 0,01$), et une baisse de la température entre les semaines 5/6 *vs* 9/10 et 11/12 ($p<0,01$) et entre les semaines 3/4 *vs* 9/10 et 11/12, et les semaines 7/8 *vs* 9/10 et 11/12 ($p<0,001$).

Pour le matin, après l'exposition (Figure 37A), l'analyse statistique montre un effet Semaine ($F(5,165) = 32,72$; $p<0,001$) avec un effet Groupe ($F(2,33) = 29,97$; $p<0,001$) ainsi qu'une interaction entre les deux (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 20,30$; $p<0,001$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre, chez les rats Sham, une baisse significative de la température entre les semaines 1/2 *vs* 5/6, 7/8, 9/10 et 11/12 ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$ ou $p<0,001$), et les semaines 3/4 *vs* 9/10 et 11/12 ($p<0,05$). Chez les rats RF, on observe une augmentation significative de la température entre les semaines 9/10 *vs* 1/2, 3/4 et 7/8, et une augmentation entre les semaines 9/10 et 11/12 ($p<0,001$). Aucun effet significatif n'est observé pour les rats Témoins.

<u>En résumé, le matin,</u> on observe une diminution de la température corporelle pour tous les groupes après *vs* avant l'exposition. De plus, si on considère la température avant l'exposition, celle-ci baisse chez les rats RF à partir de la 9^{e} semaine d'exposition. Il en va de même pour la température après l'exposition chez les rats Sham et les rats RF, dans les 10

premières semaines. Cette baisse globale de la température après l'exposition au cours du temps n'est pas observée chez les rats Témoins, indiquant un effet "chambre".

Pour les comparaisons avant et après l'exposition de l'après-midi (Figure 37B), l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque semaine. Pour les semaines 1/2, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 5,3$; $p<0,05$) sans effet Groupe ($F(2,66) = 2,18$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 0,45$; ns). Pour les semaines 3/4, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 10,49$; $p<0,01$) avec un effet Groupe ($F(2,66) = 7,42$; $p<0,01$), mais sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 0,25$; ns). Pour les semaines 5/6 et 11/12, l'analyse statistique ne montre pas d'effet Moment ($F(1,66) < 1,62$; ns pour tous), mais seulement un effet Groupe ($F(2,66) > 7,61$; $p<0,05$), sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) < 2,50$; ns pour tous). Pour les semaines 9/10, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 10,13$; $p<0,01$) sans effet Groupe ($F(2,66) = 1,96$; ns), mais avec une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 3,28$; $p<0,05$). Pour les semaines 7/8, l'analyse statistique ne montre aucun effet des facteurs Moment ($F(1,66) = 1,95$; ns), ni Groupe ($F(2,66) = 0,27$; ns) ni interaction entre eux (Moment x Groupe, $F(2,66) = 0,58$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour l'après-midi** (Figure 37B), met en évidence une baisse significative de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins pour les semaines 9/10 ($p<0,01$); chez les Sham pour les semaines 3/4 ($p<0,05$). Aucun effet pour les rats RF n'est observé.

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour l'après-midi, avant l'exposition (Figure 37B), l'analyse statistique montre un effet Semaine ($F(5,165) = 2,94$; $p<0,05$) sans effet Groupe ($F(2,33) = 1,85$; ns) mais avec une interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 3,75$; $p<0,001$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre, chez les Témoins, une baisse significative de la température entre les semaines 5/6 *vs* 1/2 et 11/12 ($p<0,05$ ou $p<0,001$) et entre les semaines 9/10 *vs* 1/2 ($p<0,01$). Chez les RF, une baisse significative de

la température est observée entre les semaines 9/10 *vs* 11/12 ($p<0,05$), et les semaines 3/4 *vs* 11/12 ($p<0,01$), aucune différence n'est notée chez les Rats Sham.

Pour l'après-midi après l'exposition (Figure 37B), l'analyse statistique montre un effet Semaine ($F(5,165) = 3,22$; $p<0,01$) sans effet Groupe ($F(2,33) = 0,23$; ns), mais avec une interaction entre les deux (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 2,28$; $p<0,05$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre, chez les Témoins, une augmentation significative de la température entre les semaines 9/10 *vs* 3/4, 5/6 et 11/12 ($p<0,05$). Chez les Sham, une baisse de la température est notée entre les semaines 9/10 *vs* 11/12 ($p<0,05$) et les semaines 1/2 *vs* 3/4 et 11/12 *vs* 3/4 ($p<0,01$) ; aucune différence n'est notée chez les rats RF.

<u>En résumé, l'après-midi,</u> on observe beaucoup moins de variations de la température corporelle avant *vs* après à l'exposition et uniquement des fluctuations de la température au cours des semaines d'exposition, sans profil caractéristique intra-groupe, et qui demeurent modestes en amplitude. Ceci est différent de ce qui est observé le matin.

De manière générale, aucun effet propre des RF sur la température corporelle n'est visible, que ce soit ponctuellement (avant/après l'exposition), ni au cours des semaines d'exposition, chez le groupe de rats "Ados". Cependant, une baisse de la température corporelle le matin, après l'exposition de 4h au cours des 3 mois d'expérience est observée chez les rats Sham et RF, montrant un effet "chambre d'exposition". Ces résultats sont également observés dans le deuxième lot avec une baisse de la température corporelle après l'exposition le matin, mais également l'après-midi. Cependant, il faut noter que ces variations de température restent modestes < 0,2-0,3°C, et correspondent probablement à des variations diurnes (avant vs après) et/ou physiologiques.

II.2. Groupes des rats "Adultes"

Comme pour l'étude du poids corporel, la prise de température est réalisée au cours de l'exposition des rats "Adultes", comme présenté dans la Figure 38. A noter que tous les résultats (deuxième lot de rats et tous les tableaux des analyses statistiques) sont visibles dans l'Annexe 3.

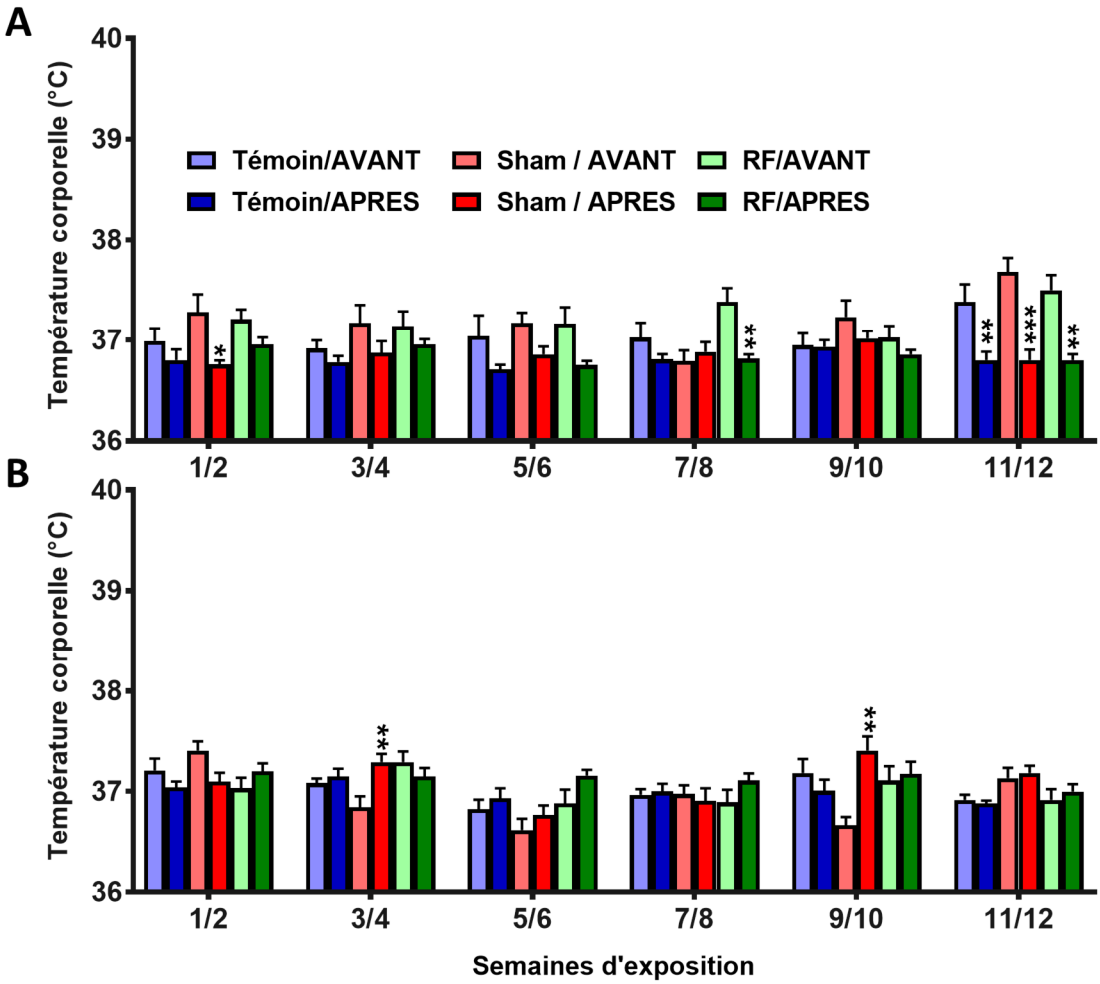


Figure 38 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le premier lot de rats "Adultes".

A : Température prise avant et après les 4 h d'exposition ***le matin.*** *B : Température prise avant et après les 4 h d'exposition* ***l'après-midi.*** *Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition du matin (Figure 38A), l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque semaine. Pour les semaines 1/2, 3/4, 5/6 et 11/12, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) > 4,80$; $p<0,05$) sans effet Groupe ($F(2,66) < 1,82$; ns pour tous) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) < 1,28$; ns pour tous). Pour les semaines 7/8, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 7,10$; $p<0,01$) avec un effet Groupe ($F(2,66) < 3,23$; $p<0,05$), et une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 4,83$; $p<0,05$). Pour les semaines 9/10, l'analyse statistique ne montre ni effet Moment ($F(1,66) = 2,37$; ns) ni effet

Groupe (F(2,66) = 2 ; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, F(2,66) = 0,48; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour le matin** (Figure 38A), met en évidence une baisse significative de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins pour les semaines 11/12 ($p<0,001$); chez les Sham pour les semaines 1/2 ($p<0,05$), et 11/12 ($p<0,001$); et chez les RF pour les semaines 7/8 et 11/12 ($p<0,01$).

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour le matin, avant l'exposition (Figure 38A), l'analyse statistique montre un effet Semaine ($F(5,165) = 9,18$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,33) = 1,29$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 1,55$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les rats Sham une baisse significative de la température entre les semaines 1/2 *vs* 7/8 et les semaines 11/12 *vs* 1/2, 3/4, 5/6, 7/8, 9/10 ($p<0,05$ ou $p<0,001$). Aucun effet pour les rats Témoins et RF n'est observé.

Pour le matin, après l'exposition (Figure 38A), l'analyse statistique ne montre aucun effet Semaine ($F(5,165) = 1,97$; ns) ni effet Groupe ($F(2,33) = 0,93$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 1,06$; ns).

En résumé, le matin, on observe de manière moins marquée et le plus souvent non significative (sauf semaine11/12), une baisse de la température corporelle après *vs* avant l'exposition. De même, à la différence du groupe "Ados", la température corporelle n'évolue pas significativement au cours des 3 mois d'exposition que ce soit avant ou après l'exposition, sauf pour le groupe Sham avant l'exposition (valeur élevée de la température avant exposition en semaines 11/12).

Pour les comparaisons avant et après l'exposition de l'après-midi, (Figure 38B), l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque semaine. Pour les semaines 1/2 et 3/4, l'analyse statistique ne montre pas effet Moment ($F(1,66) < 3,12$; ns pour tous) ni effet Groupe ($F(2,66) < 1,65$; ns pour tous) mais avec une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) > 3,54$; $p<0,05$). Pour les semaines 5/6, l'analyse statistique

montre un effet Moment ($F(1,66) = 4,61$; $p<0,05$) avec un effet Groupe ($F(2,66) = 5,31$; $p<0,01$), mais sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 0,37$; ns). Pour les semaines 11/12, l'analyse statistique ne montre pas d'effet Moment ($F(1,66) = 0,28$; ns), mais seulement un effet Groupe ($F(2,66) = 6,14$; $p<0,01$) sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 0,30$; ns). Pour les semaines 9/10, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 4,34$; $p<0,05$) sans effet Groupe ($F(2,66) = 0,35$; ns), mais avec une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 7,32$; $p<0,01$). Pour les semaines 7/8, l'analyse statistique ne montre aucun effet des facteurs Moment ($F(1,66) = 0,64$; ns), ni Groupe ($F(2,66) = 0,21$; ns) ni interaction entre eux (Moment x Groupe, $F(2,66) = 1,18$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour l'après-midi** (Figure 38B), met en évidence une augmentation significative de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les rats Sham pour les semaines 3/4 et 9/10 ($p<0,01$). Aucun effet pour les rats Témoins et RF n'est observé.

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour l'après-midi, avant l'exposition (Figure 38B), l'analyse statistique montre un effet Semaine ($F(5,165) = 6,58$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,33) = 10,87$; ns) mais avec une interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 3,86$; $p<0,001$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre, chez les Sham, une baisse significative de la température entre les semaines 1/2 *vs* 3/4, 5/6, 7/8, 9/10 et 11/12 ($p<0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$), et entre les semaines 11/12 *vs* 5/6 et 9/10 ($p<0,01$). Chez les RF, une baisse de la température est également observée entre les semaines 3/4 *vs* 5/6, 7/8 et 11/12 ($p<0,05$). Aucun effet pour les rats Témoins n'est observé.

Pour l'après-midi après l'exposition (Figure 38B), l'analyse statistique montre un effet Semaine ($F(5,165) = 4,78$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,33) = 2,08$; ns) mais avec une interaction entre les deux (Groupe x Semaine, $F(10,165) = 2,86$; $p<0,01$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre, chez les Sham, une baisse significative de la température entre les semaines 1/2 *vs* 5/6, 3/4 *vs* 5/6 et 7/8 ($p < 0,05$, $p < 0.01$ ou $p < 0,001$) et une augmentation significative de la température entre les semaines 1/2 *vs* 9/10, 5/6 *vs* 9/10 et 11/12 et 7/8 *vs* 9/10 et 11/12 ($p<0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$). Aucun effet pour les rats Témoins et RF n'est observé.

<u>En résumé, l'après-midi,</u> on observe peu de variations de la température corporelle liées à l'exposition sauf chez les rats Sham (semaines 3/4 et 9/10) et des fluctuations significatives de la température avant et après l'exposition au cours des 3 mois d'exposition chez les rats Sham et avant l'exposition chez les rats RF.

De manière générale, aucun effet propre des RF sur la température corporelle n'est visible, que ce soit ponctuellement (pour une prise donnée), ni au cours des semaines d'exposition chez le groupe de rats "Adultes". Aucune variation de la température n'est observée au cours des 3 mois d'exposition le matin. Cependant, une baisse significative de la température corporelle l'après-midi, avant et après l'exposition de 4h au cours des 3 mois d'expérience est observée chez les rats Sham et à un degré moindre chez les rats RF avant l'exposition. Les résultats du second lot sont semblables à ceux détaillés ci-dessus. Cependant, on note une diminution de la température après l'exposition l'après-midi chez les Témoins et les Sham uniquement. Comme pour les rats "Ados", ces variations de température restent modestes < 0,5°C, et correspondent probablement à des variations diurnes (avant vs après) et/ou physiologiques.

II.3. Groupes des rats "âgés"

Comme pour l'étude du poids corporel, la prise de température est réalisée au cours de l'exposition des rats "Agés", comme présenté dans la Figure 39. A noter que tous les résultats (deuxième lot de rats et tous les tableaux des analyses statistiques) sont visibles dans l'Annexe 3. Pour ce groupe de rats, la température n'a été prise qu'une fois par mois le matin et idem pour l'après-midi.

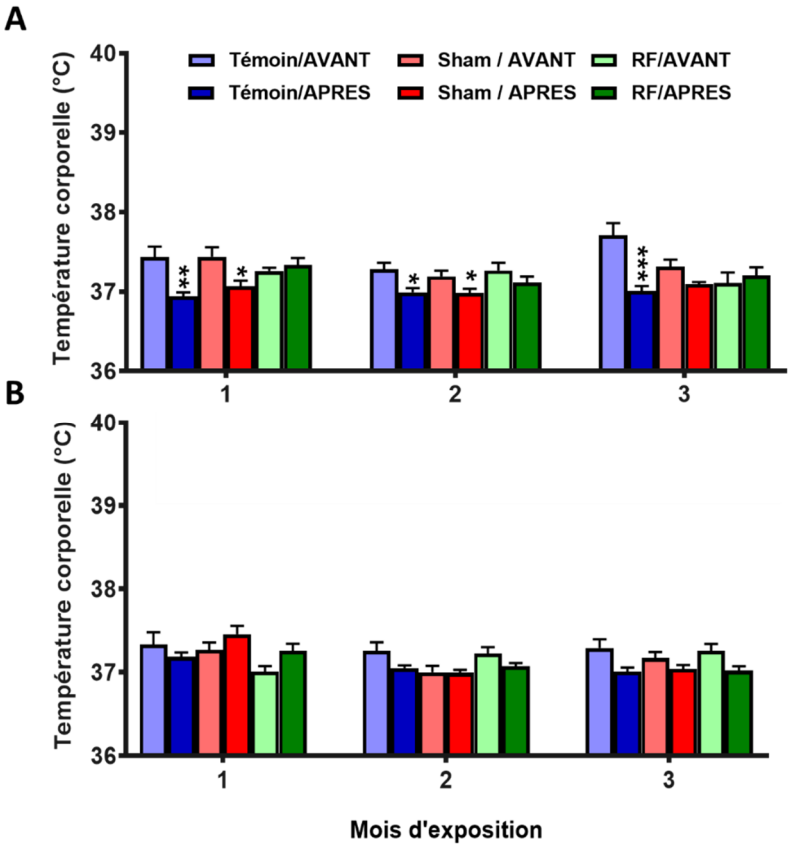


Figure 39 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le premier lot de rats "Agés".

*A : Température prise avant et après les 4 h d'exposition le matin. B : Température prise avant et après les 4 h d'exposition l'après-midi. Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001, différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition du matin (Figure 39A), l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) montre, pour les mois 1 et 3, un effet Moment ($F(1,68) > 11,2$; $p<0,01$) sans effet Groupe ($F(2,68) < 2,6$; ns pour tous), mais avec une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,68) > 5,25$; $p<0,01$). Pour le mois 2, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,68) = 13,77$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,68) = 1,06$; ns), ni d'interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,68) = 0,48$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour le matin** (Figure 39A), met en évidence une diminution significative de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins pour les mois 1 ($p<0,01$), mois 2 ($p<0,05$), mois 3 ($p<0,001$) et chez les Sham pour le mois 2 ($p < 0,05$). Aucun effet pour les rats RF n'est observé.

Ensuite, une analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Mois) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour le matin, avant l'exposition (Figure 39A), l'analyse statistique ne montre aucun effet Semaine ($F(2,68) = 1,68$; ns), mais montre un effet Groupe ($F(2,34) = 3,77$; $p<0,05$) avec une interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,68) = 2,58$; $p<0,05$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre une différence significative de la température chez les Témoins entre les mois 2 et 3 ($p<0,05$). Aucun effet pour les rats Sham et RF n'est observé.

Pour le matin, après l'exposition (Figure 39A), l'analyse statistique ne montre aucun effet Mois ($F(2,68) = 1,36$; ns) mais un effet Groupe ($F(2,34) = 9,11$; $p<0,001$) et sans interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,68) = 1,14$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence significative chez les trois groupes.

En résumé, le matin, on observe peu de fluctuations significatives de la température corporelle, que ce soit ponctuellement (avant *vs* après) ou au cours du temps. Seuls les rats Témoins présentent de manière constante au cours de l'exposition une baisse de la température Après *vs* Avant.

Pour les comparaisons avant et après l'exposition de l'après-midi, (Figure 39B), l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) pour le mois, ne montre pas d'effet Moment ($F(1,69) = 1,45$; ns) ni d'effet Groupe ($F(2,69) = 3,01$; ns) ni d'interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,69) = 2,42$; ns). Pour le mois 2, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,69) = 5,06$; $p<0,05$) avec un effet Groupe ($F(2,69) = 3,82$; $p<0,05$), mais sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 1,28$; ns). Pour le mois 3, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,69) = 14,21$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,669) = 0,21$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,69) = 0,68$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour l'après-midi** (Figure 39B), ne montre aucune différence significative entre les températures avant et après l'exposition (effet du facteur Moment) pour tous les groupes.

Ensuite, une analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Mois) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour l'après-midi, avant l'exposition (Figure 39B), l'analyse statistique ne montre aucun effet Mois ($F(2,70) = 0,46$; ns) mais un effet Groupe ($F(2,35) = 3,89$; $p<0,05$), sans interaction entre les deux facteurs (Groupe x Mois, $F(4,70) = 1,66$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre des différences significatives chez les Témoins entre les mois 2 et 3 ($p<0,05$). Aucun effet pour les rats Sham et RF n'est observé.

Pour l'après-midi après l'exposition (Figure 39B), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,68) = 18,25$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,34) = 1,17$; ns) et sans interaction entre les deux facteurs (Groupe x Mois, $F(4,68) = 2,30$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre des différences significatives chez les Sham entre le premier mois et les deux suivants ($p<0,001$), et chez les Témoins entre le mois 1 et 3 ($p<0,05$).

<u>En résumé, l'après-midi,</u> on n'observe aucune variation significative de la température corporelle liée à l'exposition, ni de variations au cours du temps.

De manière générale, aucun effet propre des RF sur la température corporelle n'est visible, que ce soit ponctuellement (pour une prise donnée), ni au cours des semaines d'exposition chez le groupe de rats "Agés". Comparativement aux 2 autres groupes d'âges, les fluctuations de la température avant vs après les 4h d'exposition et au cours des 3 mois d'exposition sont très atténuées, notamment le matin et pour les rats exposés dans la chambre (RF, Sham). Les résultats du second lot de rats "Agés" montrent des résultats identiques à ceux détaillés ci-dessus avec des fluctuations de la température avant vs après tout au long de l'exposition. Comme pour les 2 groupes d'âge précédents, les variations de température restent modestes < 0,5°C, et correspondent probablement à des variations diurnes (avant vs après) et/ou physiologiques.

Chez les trois groupes d'âges, aucune différence liée à l'exposition aux RF n'est visible au niveau de la température corporelle. Après les 4h d'exposition, la température corporelle diminue essentiellement le matin, en lien avec les variations diurnes, et dans tous les

groupes (Témoin, Sham et RF). Pour les expositions l'après-midi, la température corporelle reste relativement stable au cours des 4h d'exposition à la chambre (RF, Sham) ou à l'extérieur (Témoins) pour les 3 groupes. On notera aussi des fluctuations qui restent modestes à long terme avec une hausse ou une baisse de la température corporelle au cours des semaines d'exposition. Notamment, chez les rats du groupe "Ados", on observe un effet "chambre" avec une baisse globale de la température, surtout pour les expositions du matin, et chez le groupe "Adulte" cet effet "chambre" est observé l'après-midi. On peut noter que chez les rats Agés, les variations de la température corporelle sont moindres dans les différentes conditions et comparaisons, sauf pour les rats Témoins qui présentent, comme les rats plus jeunes, une baisse significative de la température corporelle après vs avant l'exposition du matin.

III. Mortalité au sein des différents groupes d'âge

La mortalité chez les rats exposés est prise en compte sur toute la durée du protocole, soit du début de l'exposition jusqu'à la fin des tests comportementaux (soit sur une période de 4-5 mois) et donc avant la mise à mort. Le nombre d'animaux morts par rapport au nombre d'animaux vivants à la fin des expériences est illustré dans le Tableau 1.

	Ados			**Adultes**			**Agés**		
Total	*108*			*108*			*121*		
Rats	Témoins	Sham	RF	Témoins	Sham	RF	Témoins	Sham	RF
	36	36	36	36	36	36	43	38	40
Survie	36	36	36	33	35	36	31	30	30
	100%	100%	100%	92%	97%	100%	72%	79%	75%
Mortalité	0	0	0	3	1	0	12	8	10
	0%	0%	0%	8%	3%	0%	28%	21%	25%

Tableau 1 : Mortalité et survie pour les trois groupes d'âge (Ados, Adultes et Agés).

Les analyses statistiques (Chi-deux) sont réalisées sur chaque groupe d'âge séparément. Pour les groupes des "Ados", aucun rat n'est mort avant la fin de l'expérience (n = 36/groupe d'exposition). Pour les "Adultes" (n = 36/groupe d'exposition), trois rats sont morts dans le groupe Témoin, un rat chez les Sham et aucun rat chez les RF. Le test du Chi-deux ne montre aucune différence significative (X^2 (2, 108) = 3,64 ; ns). Pour le groupe des "Agés" (n = 38-43 rats/groupe d'exposition), la mortalité est comprise entre 21 et 28% entre l'âge de 18

et 21,5 mois (du début de l'exposition jusqu'à la mise à mort) et ne diffère pas significativement entre les 3 groupes (X^2 (2, 121) = 0,51 ; ns). Les causes de la mortalité sont liées à des problèmes de santé dus à l'âge : ils apparaissent de manière équivalente dans les trois groupes d'exposition (Témoin, Sham et RF) (voir Annexe 4).

La mortalité est nulle voire très faible pour les rats les plus jeunes (Ados et Adultes) et bien que plus élevée chez les rats "Agés", elle n'apparaît pas liée à un effet des RF, mais bien à un effet de l'âge.

Partie 2 : Effet d'une exposition chronique à un signal RF de type 4G sur le comportement

Dans cette partie, les résultats sont présentés dans l'ordre où les tests de comportements ont été réalisés après la fin de l'exposition aux RF.

I. Effet des RF sur l'anxiété

L'anxiété des rats est évaluée en premier (48h après la fin de l'exposition aux RF) par le test du labyrinthe en croix surélevée pendant 5 min. Au début de l'expérience, les rats restent 5 min seuls dans la pièce de test. Ils sont ensuite placés dans le labyrinthe pendant 5 min. Dans les deux cas, les fèces sont comptabilisées et considérées comme un indicateur de stress. Le test est réalisé entre 10h et 14h sur deux jours (18 des rats/jour). Les données recueillies sont le nombre d'entrées, ainsi que le temps passé dans les bras ouverts et les bras fermés, le temps passé dans le centre du labyrinthe, le nombre de toilettages et de redressements, et le nombre de fèces dans la cage d'habituation (5 min) et dans le labyrinthe.

I.1. Groupe des rats "Ados"

L'expérience a porté sur 36 rats âgés de 9 mois (soit n = 12/groupe) et les résultats sont illustrés sur la Figure 40.

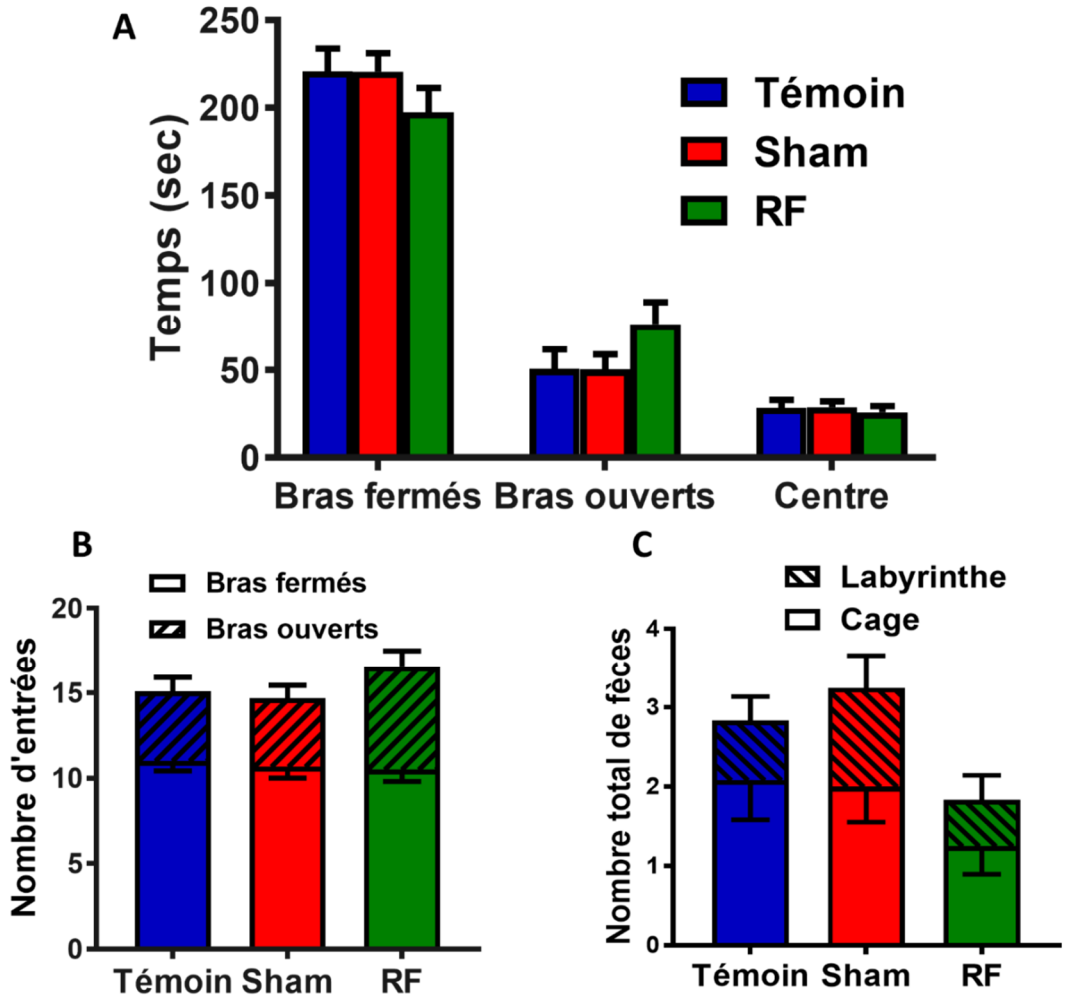


Figure 40 : Evaluation de l'anxiété chez le groupe de rats "Ados".
A : Temps total passé dans les différentes zones du labyrinthe, B : Nombre total d'entrées dans chaque bras ouverts ou fermés, C : Nombre de fèces observées chez les rats "Ados" dans la cage et le labyrinthe. Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 12 rats/groupe.

L'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) pour **le temps passé dans les bras ouverts et fermés et au centre** (Figure 40A) montre un effet Zone ($F(2,99) = 303,5$; $p<0,001$) mais sans effet Groupe ($F(2,99) = 1,68.10^{-9}$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Zone $F(4,99) = 2,1$; $p = 0,09$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que les rats passent plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts ($p<0,001$ pour tous), et plus de temps dans les bras ouverts que le centre ($p<0,001$ pour les RF).

Concernant le **nombre d'entrées dans les bras ouverts ou fermés** (Figure 40B), les résultats sont semblables aux précédents. L'analyse par ANOVA à deux facteurs montre un effet Zone ($F(1,66) = 96,87$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,66) = 0,91$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Zone $F(2,66) = 1,7$; ns). L'analyse post-hoc en

comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que le nombre d'entrées est plus important dans les bras fermés que dans les bras ouverts ($p<0,001$ pour tous les groupes).

L'effet Zone indique, comme attendu, que les rats préfèrent et passent plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts ou au centre, et ceci, pour les 3 groupes.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs, **pour le nombre de fèces** (Figure 40C), montre un effet Place ($F(1,66) = 8,14$, $p<0,01$) mais sans effet Groupe ($F(2,66) = 1,71$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Place ($F(2,66) = 0,43$, ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence entre les groupes. L'effet Place montre que les fèces sont plus importantes pendant les 5 min précédant le test, lorsque l'animal est dans une cage dans la salle de test.

Enfin, l'étude du nombre de **redressements et du nombre de toilettages** dans le labyrinthe (Annexe 5) ne montre aucune différence entre les trois groupes d'exposition (ANOVA à un facteur, $F(2,33) < 0,8$; ns pour tous).

Chez le jeune rat (4 mois), aucun effet des RF n'est observé sur les divers paramètres de mesure de l'anxiété.

I.2. Groupe des rats "Adultes"

L'expérience a porté sur 36 rats âgés de 9 mois (soit n = 12/groupe) et les résultats sont illustrés sur la Figure 41.

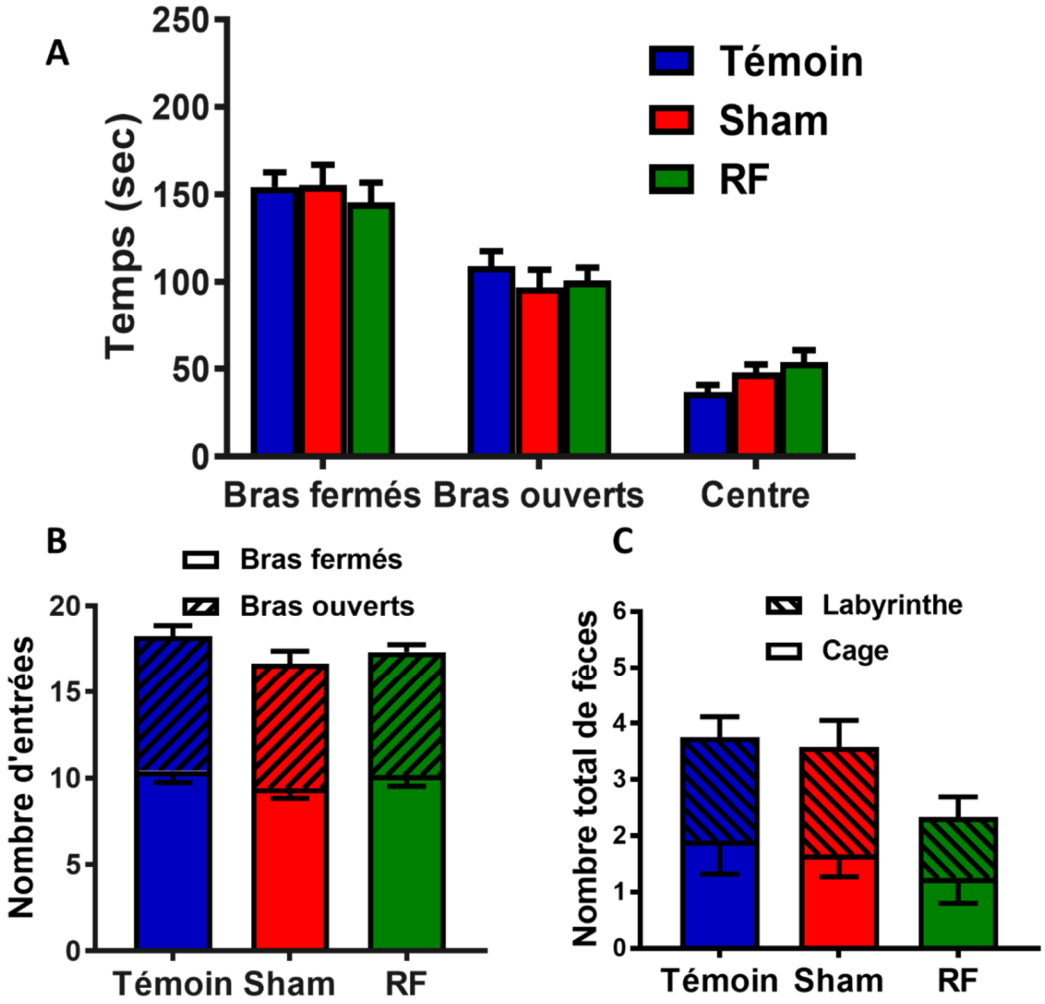


Figure 41 : Evaluation de l'anxiété chez le groupe de rats "Adultes".
A : Temps total passé dans les différentes zones du labyrinthe, B : Nombre total d'entrées dans chaque bras ouverts ou fermés, C : Nombre de fèces observées chez les rats "Adultes" dans la cage et le labyrinthe. Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 12 rats/groupe.

L'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) pour **le temps passé dans les bras ouverts et fermés et au centre** (Figure 41A) montre un effet Zone ($F(2,99) = 116,1$; $p<0,001$) mais sans effet Groupe ($F(2,99) = 0$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Zone $F(4,99) = 0,99$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que les rats passent plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts ($p<0,001$ pour tous), et plus de temps dans les bras ouverts que le centre ($p<0,001$ pour tous).

Concernant le **nombre d'entrées dans les bras ouverts ou fermés** (Figure 41B), les résultats sont semblables aux précédents. L'analyse par ANOVA à deux facteurs montre un effet Zone ($F(1,66) = 26,51$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,66) = 0,84$; ns) ni interaction

entre les deux facteurs (Groupe x Zone F(2,66) = 0,23; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que le nombre d'entrées est plus important dans les bras fermés que dans les bras ouverts ($p<0,05$ pour tous les Témoins et RF).

L'effet Zone indique, comme attendu, que les rats préfèrent et passent plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts ou au centre, et ceci, pour les 3 groupes.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs, **pour le nombre de fèces** (Figure 41C), ne montre aucun effet Place (F(1,66) = 0, ns) ni effet Groupe (F(2,66) = 1,51; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Place (F(2,66) = 0,12, ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence entre les groupes.

Enfin, l'étude du nombre de **redressements et du nombre de toilettages** n'a pas pu être réalisée sur ce groupe.

Chez le rat adulte (9 mois), aucun effet des RF n'est observé sur les divers paramètres de mesure de l'anxiété.

I.3. Groupe des rats "Agés"

L'expérience a porté sur 33 rats âgés de 21 mois (soit n = 11/groupe) et les résultats sont illustrés sur la Figure 42.

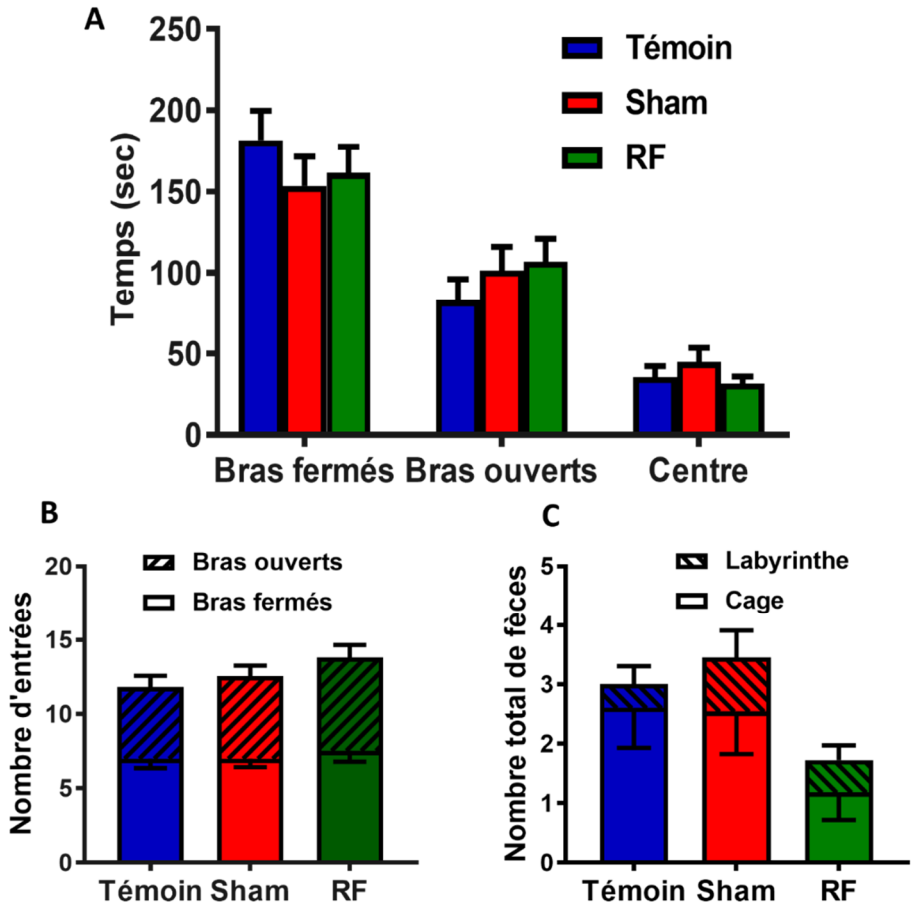


Figure 42 : Evaluation de l'anxiété chez le groupe de rats "Agés".
A : Temps total passé dans les différentes zones du labyrinthe, B : Nombre total d'entrées dans chaque bras ouverts ou fermés, C : Nombre de fèces observées chez les rats "Agés" dans la cage et le labyrinthe. Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 11 rats/groupe.

L'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) pour **le temps passé dans les bras ouverts et fermés et au centre** (Figure 42A) montre un effet Zone ($F(2,87) = 67,1$; $p<0,001$) mais sans effet Groupe ($F(2,87) = 1,85.10^{-9}$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Zone $F(4,87) = 1,11$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que les rats passent plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts ($p<0,01$ pour tous), et plus de temps dans les bras ouverts que le centre ($p<0,05$ pour tous).

Concernant le **nombre d'entrées dans les bras ouverts ou fermés** (Figure 42B), les résultats sont semblables aux précédents. L'analyse par ANOVA à deux facteurs montre un effet Zone ($F(1,58) = 7,73$; $p<0,01$) sans effet Groupe ($F(2,58) = 0,99$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Zone $F(2,58) = 0,22$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence significative entre le nombre d'entrées dans les bras fermés et dans les bras ouverts.

L'effet Zone indique, comme attendu, que les rats préfèrent et passent plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts ou au centre, et ceci, pour les 3 groupes.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs, **pour le nombre de fèces (**Figure 42C), montre un effet Place ($F(1,58) = 12,96$, $p<0,001$) mais sans effet Groupe ($F(2,58) = 1,60$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Place ($F(2,58) = 1,21$, ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que les rats Témoins et Sham défèquent plus dans la cage que dans le labyrinthe ($p<0,05$), aucune différence pour les RF. L'effet Place montre que les fèces sont plus importantes pendant les 5 min précédant le test, lorsque l'animal est dans une cage dans la salle de test.

Enfin, l'étude du nombre de **redressements et du nombre de toilettages** (Annexe 5) ne montre aucune différence entre les trois groupes d'exposition (ANOVA à un facteur, $F(2,29) < 0,8$; ns pour tous).

Chez le rat âgé (21 mois), aucun effet des RF n'est observé sur les divers paramètres de mesure de l'anxiété.

Au niveau de l'anxiété, les résultats sur les différents groupes d'âges sont semblables : les rats exposés au signal RF de type 4G ne montrent aucune différence par rapport aux rats Sham et Témoin.

II. Effet des RF sur l'activité locomotrice …

L'étude de l'activité locomotrice est réalisée sur 24h (de 10h à 10h), et comprend 3 périodes : 2h d'habituation (10h-12h au début de l'enregistrement en phase diurne), période 2 = 10h + 2h de jour (12h-20h et 8h-10h) et 12h de nuit (20h-8h). Les rats sont placés à un par cage avec eau et nourriture *ad libitum* et restent libres de leurs mouvements, sans aucune interaction avec l'expérimentateur pendant toute la durée du test. Pour rappel, le nombre de fois que l'animal traverse les 2 faisceaux infrarouges est enregistré toutes les 15 min ; ces résultats sont ensuite additionnés par 4 pour donner l'activité par heure. La lumière s'éteint à 20h et s'allume à 8h le lendemain.

II.1. Groupe des rats "Ados"

L'expérience a porté sur 36 rats âgés de 4 mois (n=12/groupe), les résultats sont présentés sur la Figure 43A et cumulés pour chaque période sur la Figure 43B.

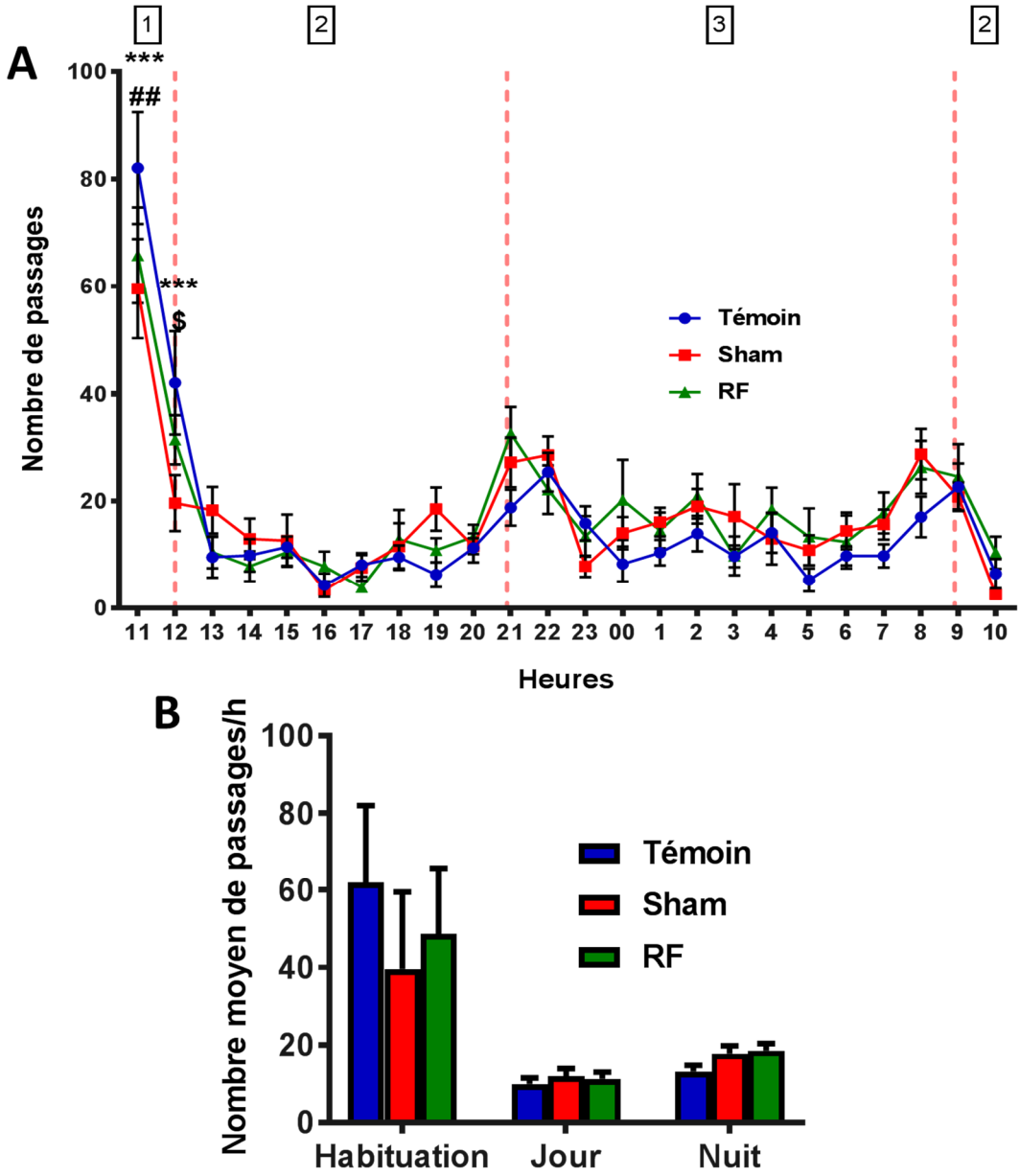


Figure 43 : Activité locomotrice en cage d'élevage pour le groupe des "Ados".
*A : Nombre de passages par heure 1-phase d'habituation de 2h, 2-phase diurne (10h, entre 12-20h et 8-10h) et 3- phase nocturne (12h entre 20h à 8h). B : Nombre moyen de passages par heure pour chaque période (habituation, jour et nuit). Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 12 rats/groupe, ***p<0,001 différences significatives entre les Sham et Témoin, ##p<0,01 différences significatives entre les RF et Témoins* et $p<0,05 *différences significatives entre les RF et Sham.*

L'étude de l'activité locomotrice révèle une différence au cours de la journée avec un nombre de passages fluctuant en fonction des heures (Figure 43A). L'ANOVA à 2 facteurs (Groupe, Heure) montre un effet de l'Heure ($F(23,759) = 29,61$; $p<0,001$), pas d'effet Groupe ($F(2,33) = 0,73$; ns) avec une interaction entre les 2 facteurs (Heure x Groupe, $F(46,759) = 1,48$; $p<0,05$). L'analyse post-hoc (NK) montre des différences significatives pendant l'habituation, entre les rats Sham et les Témoins ($p<0,001$ pour 10h et 11h), entre les rats RF et les Témoins ($p<0,01$ pour 10h) et entre les RF et les Sham ($p<0,05$ pour 11h).

Lorsque l'on moyenne le nombre de passages par période (Figure 43B), l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Période ($F(2,63) = 55,24$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,63) = 1,34$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Période, $F(4,63) = 2,44$; $p = 0,06$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que les rats sont plus actifs pendant la phase d'habituation que pendant les deux autres périodes ($p<0,01$ pour tous les groupes) et pendant la période nuit que pendant le jour, uniquement chez les RF ($p<0,05$). L'effet Période indique une activité locomotrice plus élevée au cours de l'habituation et plus faible pendant la période jour, correspondant à la période de repos des animaux.

Chez les rats du groupe "Ados", un effet des RF est mis en évidence avec une activité locomotrice significativement plus élevée la nuit que le jour. Cette différence jour-nuit n'apparaît pas dans les 2 autres groupes (Témoin, Sham). De plus, à l'habituation, les rats exposés à la chambre (RF, Sham) présentent une hyperactivité réactionnelle à la nouveauté moindre que les rats témoins.

II.2. Groupe des rats "Adultes"

L'expérience a porté sur 36 rats âgés de 9 mois (n=12/groupe), les résultats sont présentés sur la Figure 44A et cumulés pour chaque période sur la Figure 44B.

Suite à des problèmes techniques liés au non-fonctionnement de cellules photoélectriques, le nombre de rats par groupe est au final de 10 pour les Sham et Témoin et de 12 pour les RF.

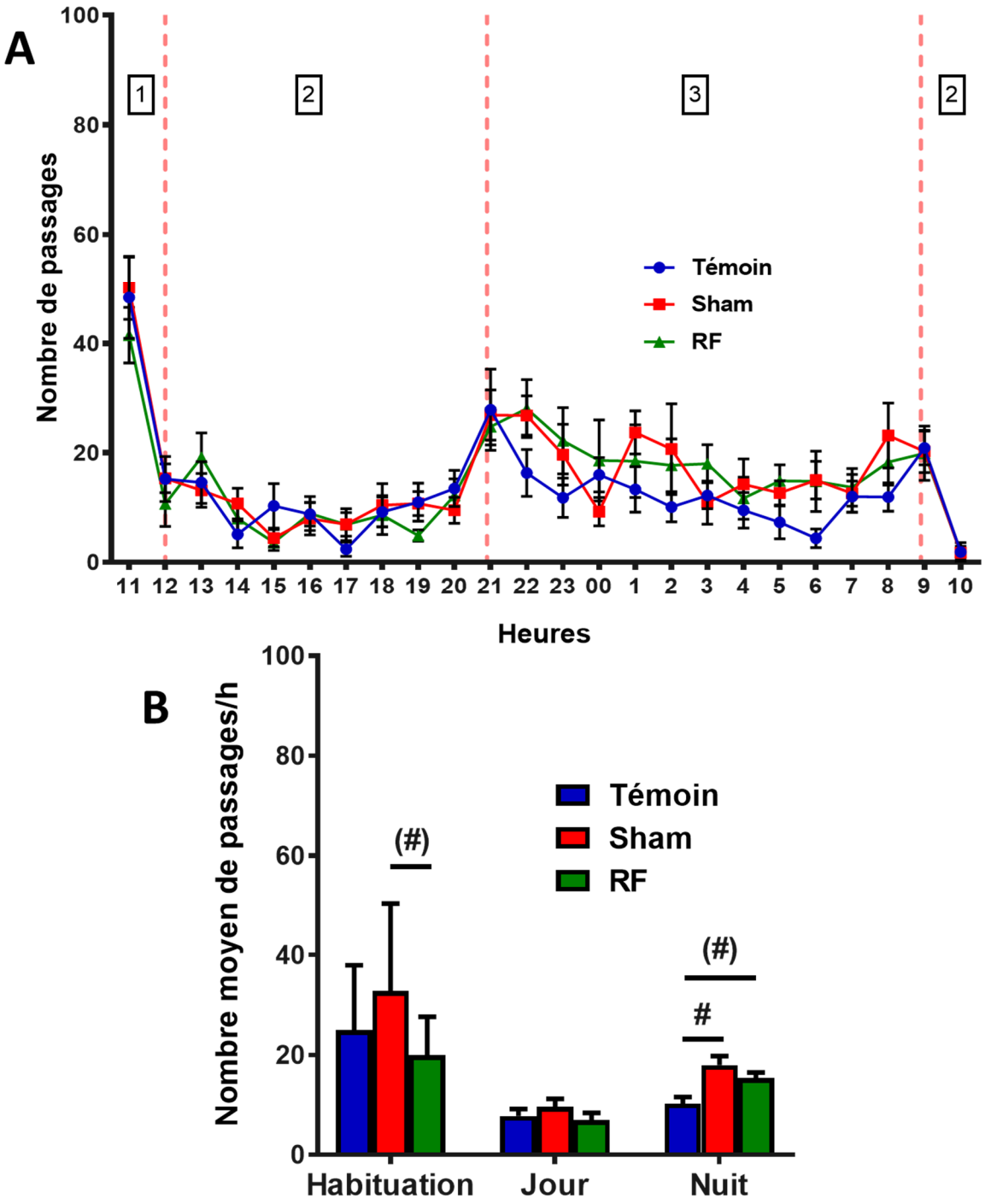


Figure 44 : Activité locomotrice en cage d'élevage pour le groupe des "Adultes".
A : Nombre de passages par heure 1-phase d'habituation de 2h, 2-phase diurne (10h, entre 12-20h et 8-10h) et 3- phase nocturne (12h entre 20h à 8h). B : Nombre moyen de passages par heure pour chaque période (habituation, jour et nuit), (#)p<0,01 et #p<0,05 différences statistiquement significatives entre deux groupes. Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 10-12 rats/groupe.

L'étude de l'activité locomotrice révèle une différence au cours de la journée avec un nombre de passages fluctuant en fonction des heures (Figure 44A). L'ANOVA à 2 facteurs (Groupe, Heure) montre un effet de l'Heure ($F(23,667) = 15$; $p<0,001$), pas d'effet Groupe ($F(2,29) = 2,64$; $p=0,09$) ni interaction entre les 2 facteurs (Heure x Groupe, $F(46,667) = 0,80$; ns). L'analyse post-hoc (NK) montre des différences significatives entre 11h et les autres heures ($p<0,01$ pour tous les groupes).

Lorsque l'on moyenne le nombre de passages par période (Figure 44B), l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Période ($F(2,63) = 22,21$; $p<0,001$) avec un effet Groupe ($F(2,63) = 3,77$; $p<0,05$), mais sans interaction entre les deux facteurs (Groupe x Période, $F(4,63) = 1,47$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre que les rats sont plus actifs pendant la phase d'habituation que pendant les deux autres périodes ($p<0,05$ pour tous les groupes) et pendant la période nuit que pendant le jour, chez les RF et les Sham ($p<0,01$). L'effet Période indique une activité locomotrice plus élevée au cours de l'habituation et plus faible pendant la période jour, correspondant à la période de repos des animaux. L'effet Groupe indique pour l'essentiel une activité légèrement plus élevée chez les rats Sham et RF par rapport au groupe Témoin en période nuit.

Chez les rats du groupe "Adultes", aucun effet des RF n'est mis en évidence sur l'activité locomotrice, sur 24h. Seul un effet "chambre' est observé, avec une hyperactivité nocturne des rats RF et Sham par rapport aux rats témoins. On peut noter que chez les rats adultes de 9 mois, l'activité au cours de l'habituation est moins élevée par rapport aux rats de 4 mois dans les 3 groupes.

II.3. … chez le rat âgé

L'expérience a porté sur 33 rats âgés de 21 mois (n=11/groupe), les résultats sont présentés sur la Figure 45A et cumulés pour chaque période sur la Figure 45B.

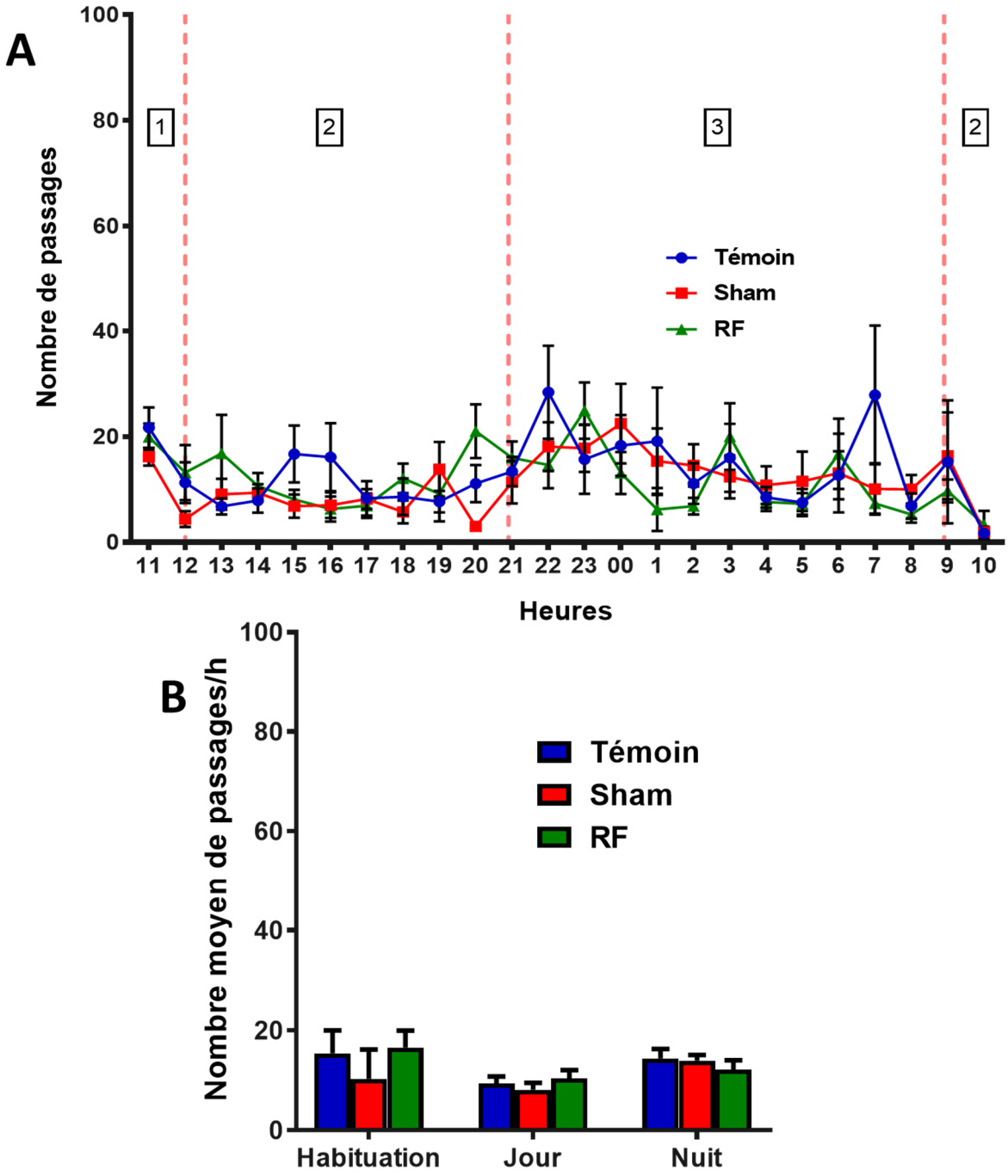


Figure 45 : Activité locomotrice en cage d'élevage pour le groupe des "Agés".
A : Nombre de passages par heure 1-phase d'habituation de 2h, 2-phase diurne (10h, entre 12-20h et 8-10h) et 3- phase nocturne (12h entre 20h à 8h). B : Nombre moyen de passages par heure pour chaque période (habituation, jour et nuit). Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 11 rats/groupe.

L'étude de l'activité locomotrice révèle une différence au cours de la journée avec un nombre de passages fluctuant en fonction des heures (Figure 45A). L'ANOVA à 2 facteurs (Groupe, Heure) montre un effet de l'Heure ($F(23,667) = 2,82$; $p<0,001$), pas d'effet Groupe

(F(2,29) = 0,44; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Heure x Groupe, F(46,667) = 1,12; ns). L'analyse post-hoc (NK) montre des fluctuations sur les 24h d'enregistrement, et cela pour tous les groupes.

Lorsque l'on moyenne le nombre de passages par période (Figure 45B), l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Période (F(2,63) = 5,61; p<0,01) sans effet Groupe (F(2,63) = 0,78; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Groupe x Période, F(4,63) = 0,76; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence d'activité entre les différentes périodes, sauf pour les Sham qui sont moins actifs le jour que la nuit (p<0,05).

Chez les rats du groupe "Agés", aucun effet des RF n'est mis en évidence sur l'activité locomotrice, sur 24h. On peut noter que chez le rat âgé, la distinction entre les différentes périodes s'estompe par rapport aux rats plus jeunes et surtout que le niveau d'activité à l'habituation s'effondre pour atteindre des valeurs autour de 10-15 passages/h vs 40-60 chez les rats de 4 mois (Groupe "Ados") et 20-30 chez les rats de 9 mois (Groupe "Adultes").

L'étude de l'activité locomotrice pendant 24h ne montre aucun effet de l'exposition chronique à un signal de type 4G, et ce quel que soit l'âge de l'animal. Cependant, une différence est observée chez les rats des groupes "Ados" et "Adultes" exposés dans la chambre (Sham et RF) : ces animaux présentent une activité locomotrice légèrement plus élevée la nuit que chez le groupe Témoin, placé à l'extérieur de la chambre. Chez les "Ados", on observe aussi une diminution de l'activité locomotrice à l'habituation chez les rats exposés à la chambre (Sham, RF) vs Témoins.

III. Effet des RF sur l'apprentissage et la mémoire spatiale à long terme …

Pour rappel, le test de la piscine de Morris est une tâche de mémoire spatiale réalisée en deux temps : une phase de 8 jours d'apprentissage (4 essais/jour) où le rat doit mémoriser l'emplacement d'une plateforme cachée (position identique chaque jour, étude de la distance et latence moyenne parcourue chaque jour pour atteindre la plateforme) puis le rappeler pendant les deux tests de rappel d'une mémoire à long-terme (24h après 4 jours d'apprentissage et 8 ou

25 jours après le dernier (8e) jour d'apprentissage). Lors de ces rappels (appelés également probe test), la plateforme est retirée et, parmi les paramètres, on mesure le temps passé dans le quadrant cible (qui contenait la plateforme lors de l'apprentissage) et dans les 3 autres quadrants, puis on analyse les résultats. Les autres paramètres pris en compte sont la thigmotaxie (temps passé dans une zone de 10 cm le long de la paroi de la piscine, et qui témoigne du niveau d'anxiété et de peur de l'animal) et la vitesse de nage. L'ordre de passage des rats est différent chaque jour, en alternant les trois groupes d'exposition.

III.1. … chez le groupe "Ados" …

Une semaine après l'arrêt de l'exposition, 36 rats de 4 mois ont commencé le protocole d'apprentissage en piscine de Morris. Après le deuxième rappel et après l'analyse de l'ensemble des performances, un rat est éliminé pour mauvaises performances à l'apprentissage, donc le nombre final de rats par groupe est de 11 pour les Sham et 12 animaux pour les groupes RF et Témoin.

III.1.1. … lors de l'apprentissage

L'ANOVA à mesures répétées montre un effet Jour pour **la distance parcourue** (Figure 46A) par les animaux ($F(7,224) = 51,41$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,32) = 0,23$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Jour x Groupe, $F(14,224) = 0,61$; ns). Cette dernière diminue au cours du temps montrant un bon apprentissage puisque l'animal trouve la plateforme plus vite chaque jour en parcourant une distance de plus en plus courte pour y arriver. L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence des différences significatives pour **la distance parcourue** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les autres jours ($p<0,05$ pour tous les groupes), entre le jour 2 et les autres jours ($p<0,05$ pour tous les groupes), entre le jour 3 et les jours 6, 7 et 8 ($p<0,05$ pour tous les groupes) et entre les jours 4 et 8 ($p<0,05$ pour les RF).

Cet apprentissage est également visible par l'étude de **la latence** (Figure 46B) (temps nécessaire à l'animal pour atteindre la plateforme) avec un effet Jour ($F(7,224) = 35,42$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,32) = 0,31$; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Jour x Groupe, $F(14,224) = 0,74$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence des différences significatives pour **la latence** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les jours de 3 à 8 ($p<0,05$ pour tous les groupes), entre le jour 2 et les

jours de 4 à 8 ($p<0,05$ pour tous les groupes), entre le jour 3 et les jours 6, 7 et 8 ($p<0,05$ pour les groupes Sham et Témoins).

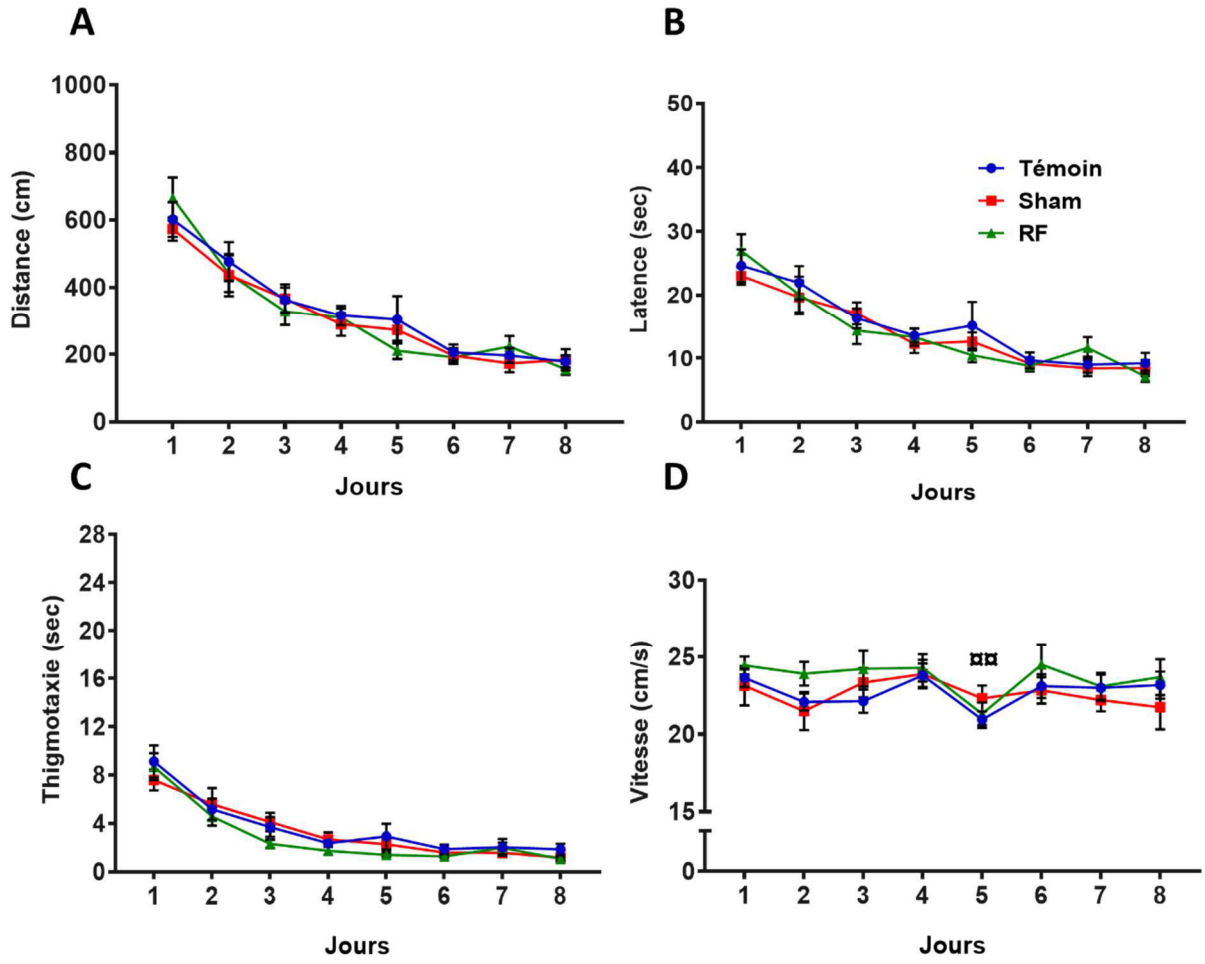


Figure 46 : Paramètres étudiés lors de l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale (Piscine de Morris) chez les rats "Ados".

*A : **Distance parcourue** pour atteindre la plateforme ; B : **Latence** pour atteindre la plateforme ; C : Temps passé le long de la paroi de la piscine (**thigmotaxie**) ; D : **Vitesse** de nage, ¤¤p<0,01 vs autres jours. Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 11-12 rats/groupe. ¤¤p<0,01 différence statistiquement significative vs autres jours (tous les groupes)*

Cet effet Jour est également visible sur l'étude de la **thigmotaxie** (Figure 46C) qui diminue au cours des jours ($F(7,224) = 45,5$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,32) = 1,02$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Jour x Groupe, $F(14,224) = 0,65$, ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), met en évidence des différences significatives pour la **thigmotaxie** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les autres jours ($p<0,05$ pour tous les groupes), entre le jour 2 et les autres jours ($p<0,05$ pour tous les groupes), entre le jour 3 et les jours 6, 7 et 8 ($p<0,05$ pour les Sham).

Ceci montre une diminution du stress du rat au cours des jours, sans différence entre les groupes d'exposition, liée à sa familiarisation avec le dispositif et la tâche.

Enfin, on notera un effet du facteur Jour sur **la vitesse** ($F(7,231) = 3,43$; $p<0,01$) sans effet Groupe ($F(2,33) = 0,90$; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Heure x Groupe, $F(14,231) = 0,80$; ns). L'analyse post-hoc (NK) montre une diminution significative ($p<0,01$) de la vitesse de nage pour tous les groupes le 5ème jour (jour du test de rappel en mémoire à long terme récente) (Figure 46D).

En résumé, chez les rats du groupe "Ados", l'apprentissage en piscine de Morris (mémoire spatiale) n'est pas impacté par les RF.

III.1.2. … lors du rappel (mémoire récente et ancienne)

Lors des deux tests de rappel, les animaux nagent librement pendant 60 sec au sein du dispositif, la plateforme étant retirée. Le temps passé dans le quadrant cible (qui contenait la plateforme pendant l'apprentissage) *vs* les autres quadrants (dessinés virtuellement sur le logiciel de tracking) est analysé et exprimé en pourcentages. Le nombre de croisements au niveau de l'annulus (zone virtuelle de 30 cm centrée sur la plateforme), **la latence du 1er passage dans la zone la plateforme**, ainsi que la thigmotaxie sont également analysés (Figure 47).

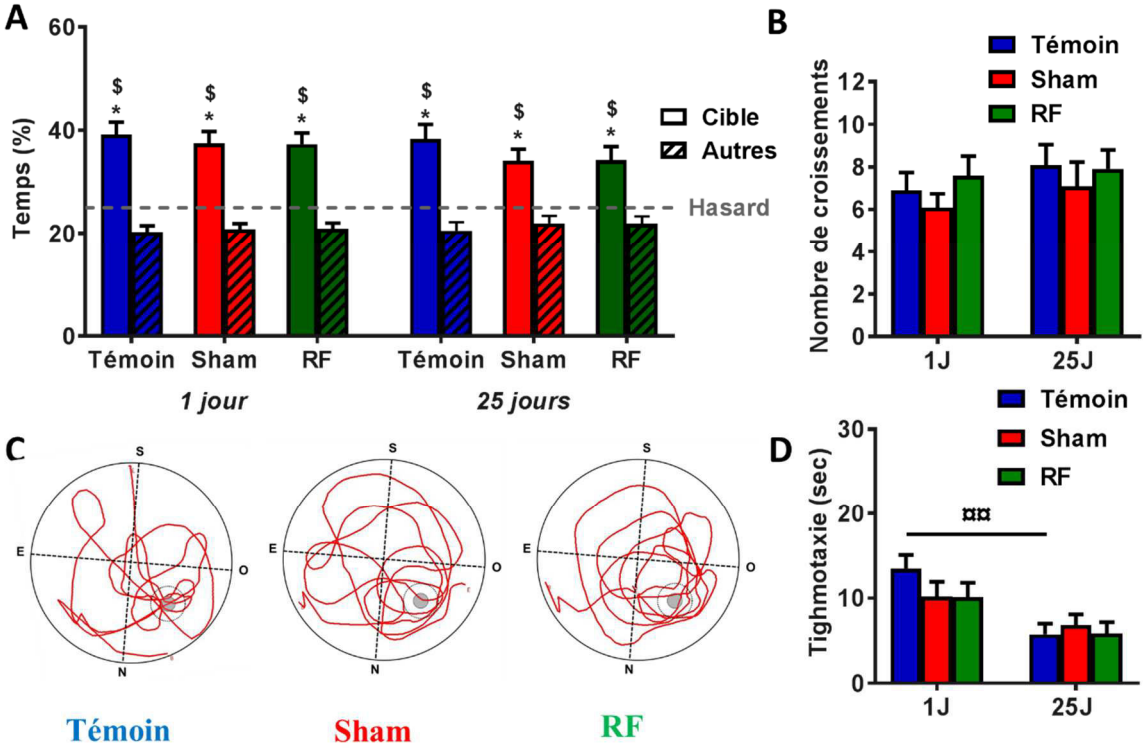


Figure 47 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale chez les "Ados" : récente (1 jour) et ancienne (25 jours).

*A : **Le temps** (%) passé dans le quadrant cible est comparé à celui passé dans les autres quadrants ($p<0,001). Le trait en pointillés illustre le hasard fixé à 25% : lorsque les animaux se souviennent de l'emplacement de la plateforme, le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible est supérieur au hasard (*p<0,001 vs hasard). B : **Nombre de croisements** au niveau de l'annulus (zone virtuelle de 30 cm centrée sur la plateforme). C : Exemples de tracés de la trajectoire d'un rat représentatif de chaque groupe lors du rappel à 25J. D : Temps passé le long de la paroi de la piscine (**thigmotaxie**), ¤¤p<0,01 différence statistiquement significative 1 jour vs 25 jours (groupe Témoin).*

Lors du rappel à 1 jour après le dernier essai du 4e jour, les trois groupes d'exposition (Témoin, Sham et RF) passent significativement (p<0,001) plus de 25% du **temps dans le quadrant cible** (test de Student, avec comparaison de la moyenne à un standard fixé à 25%, Figure 47A). Ceci met en évidence un bon rappel de la place de la plateforme (mémoire récente). De plus, l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Quadrant (F(1,134) = 155,6; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,134) = 0,08; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Quadrant x Groupe, F(2,134) = 0,33; ns. L'effet Quadrant montre que les rats des 3 groupes passent plus de temps dans le quadrant cible *vs* les autres quadrants (p < 0,001).

Lors du rappel à 25 jours, les trois groupes d'exposition (Témoin, Sham et RF) passent significativement (p<0,001) plus de 25% de **leur temps dans le quadrant cible**

(Figure 47A). Ceci met en évidence un bon rappel de la place de la plateforme en mémoire ancienne. Ainsi, l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Quadrant ($F(1,134) = 65,38$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,134) = 0,29$; ns) ni interaction entre eux (Quadrant x Groupe, $F(2,134) = 1,14$; ns). L'effet Quadrant montre que les rats des 3 groupes passent plus de temps dans le quadrant cible *vs* les autres quadrants ($p < 0,001$).

De plus, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe, Délai) pour le temps passé dans le quadrant cible aux Délais 1J et 25J ne montre aucun effet Groupe ($F(2,64) = 1,00$; ns), ni d'effet Délai ($F(1,64) = 1,47$; ns), ni d'interaction (Groupe x Délai, $F(2,64) = 0,16$; ns). Ceci montre qu'il n'y a aucune différence sur le temps passé dans le quadrant cible entre le rappel en mémoire récente (1J) et ancienne (25J) et ceci pour les 3 groupes.

La Figure 47C montre un exemple de la trajectoire d'un rat représentatif de chaque groupe d'exposition lors du rappel à 25J.

Enfin, l'étude d'autres paramètres par une ANOVA à 2 facteurs (Groupe, Délai) tels que la **vitesse de nage, la latence du 1er passage dans la zone de la plateforme** (Annexe 6) et **le nombre de passages dans l'annulus** (Figure 47B) ne montre aucune différence pour le facteur Groupe (ANOVA à deux facteurs, $F(2,66) < 2$; ns pour tous), ni d'effet du Délai ($F(1,66) < 1,25$; ns pour tous), ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Délai, $F(2,64) < 1,75$; ns pour tous). Cependant, pour la **thigmotaxie** (Figure 47D), l'ANOVA à 2 facteurs (Délai, Groupe) montre une diminution significative de la thigmotaxie lors du rappel à 25J sans effet Groupe ni interaction entre les 2 facteurs (Délai, $F(1,66) = 17,6$; $p<0,001$; Groupe, $F(2,66) = 0,63$; ns ; Groupe x Délai, $F(2,66) = 1,21$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), met en évidence une différence significative pour la **thigmotaxie** (effet du facteur Délai) entre les deux rappels ($p<0,01$) chez les Témoins.

Ces résultats pour le groupe des rats "Ados" ne montrent aucun effet des RF sur l'apprentissage, ni sur le rappel d'une mémoire récente et ancienne. Cependant, une diminution de la vitesse de nage est visible au 5ème jour d'apprentissage (jour du rappel à 1J) chez tous les groupes et pourrait être liée au test de rappel réalisé juste avant ce même jour.

III.2. … chez le groupe "Adultes" …

Une semaine après l'arrêt de l'exposition, 36 rats de 9 mois ont commencé le protocole d'apprentissage en piscine de Morris. Après le deuxième rappel et après l'analyse de

l'ensemble des performances, un rat est éliminé pour mauvaises performances à l'apprentissage et deux pour cause de comportements agressifs dans la cage d'élevage, donc le nombre final de rats par groupe est de 12 pour les Témoins, de 11 pour les Sham et 10 animaux pour le groupe RF.

III.2.1. … lors de l'apprentissage

L'ANOVA à mesures répétées montre un effet Jour pour **la distance parcourue** (Figure 48A) par les animaux ($F(7,210) = 44,24$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,30) = 2,36$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Jour x Groupe, $F(14,210) = 1,2$; ns). Cette dernière diminue au cours du temps montrant un bon apprentissage puisque l'animal trouve la plateforme plus vite chaque jour en parcourant une distance de plus en plus courte pour y arriver. L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence des différences significatives pour **la distance parcourue** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les autres jours ($p<0,001$ pour les groupes Sham et RF) et entre le jour 1 et les jours 2 à 7 ($p<0,001$ pour les Témoins), entre le jour 2 et les autres jours ($p<0,05$ pour les groupes Sham et Témoins), entre le jour 3 et les jours 6, 7 et 8 ($p<0,05$ pour les groupes RF et Témoins) et entre les jours 3 et 7 ($p<0,05$ pour les Sham).

Cet apprentissage est également visible par l'étude de **la latence** (Figure 48B) (temps nécessaire à l'animal pour atteindre la plateforme) avec un effet Jour ($F(7,210) = 32,82$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,30) = 1,83$; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Jour x Groupe, $F(14,210) = 0,94$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), met en évidence des différences significatives pour **la latence** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les autres jours ($p<0,001$ pour les groupes Sham et RF) et entre le jour 1 et les jours 2 à 7 ($p<0,001$ pour les Témoins), entre le jour 2 et les jours 4 à 8 ($p<0,05$ pour les groupes Sham et Témoins), entre le jour 3 et les jours 7 et 8 ($p<0,05$ pour les Témoins) et entre jour 4 et les jours 7 et 8 ($p<0,05$ pour les Témoins).

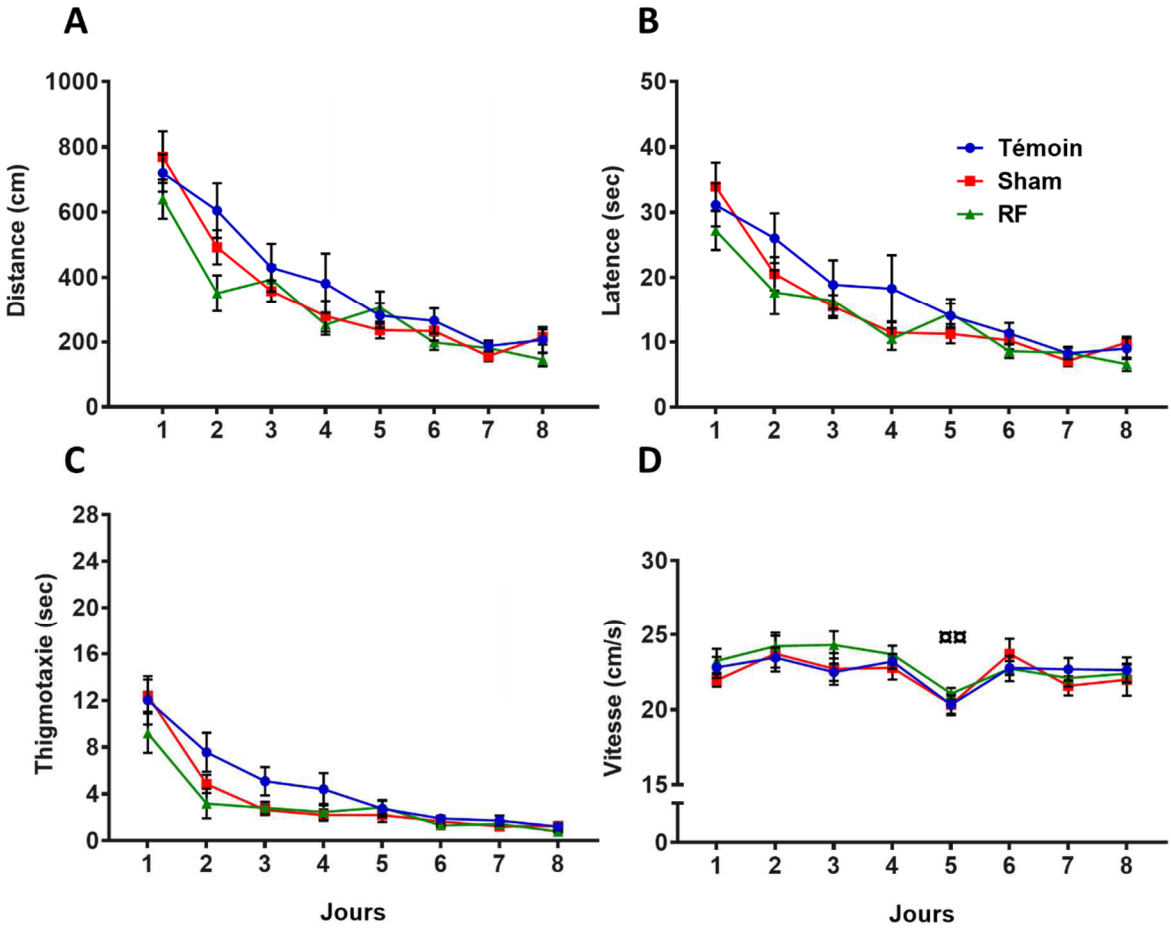


Figure 48 : Paramètres étudiés lors de l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale (Piscine de Morris) chez les rats "Adultes".

*A : **Distance parcourue** pour atteindre la plateforme; B: **Latence** pour atteindre la plateforme ; C: Temps passé le long de la paroi de la piscine (**thigmotaxie**); D : **Vitesse** de nage, ¤¤p<0,01 différence statistiquement significative vs autres jours (tous les groupes). Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 10-12 rats/groupe.*

Cet effet Jour est également visible sur la **thigmotaxie** (Figure 48C) qui diminue au cours des jours ($F(7,210) = 49,94$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,30) = 1,91$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Jour x Groupe, $F(14,210) = 1,42$, ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), met en évidence des différences significatives pour la **thigmotaxie** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les autres jours ($p<0,001$ pour tous les groupes), entre le jour 2 et les autres jours ($p<0,05$ pour le groupe Témoin) et entre le jour 2 et les jours 6, 7 et 8 ($p<0,05$ pour le groupe Sham), entre le jour 3 et les jours 6, 7 et 8 ($p<0,05$ pour le groupe Témoin), et entre le jour 4 et le jour 8 ($p<0,05$ pour le groupe Témoin).

Ceci montre une diminution du stress du rat au cours des jours sans différence entre les groupes d'exposition.

Enfin, on notera un effet du facteur Jour sur **la vitesse** ($F(7,210) = 8,22$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,30) = 0,35$; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Heure x Groupe, $F(14,210) = 0,75$; ns). L'analyse post-hoc (NK) montre une diminution significative ($p<0,01$) de la vitesse de nage pour tous les groupes le 5ème jour (jour du test de rappel en mémoire à long terme récente) (Figure 48D).

En résumé, chez les rats du groupe "Adultes", l'apprentissage en piscine de Morris (mémoire spatiale) n'est pas impacté par les RF.

III.2.2. … lors du rappel (mémoire récente et ancienne)

Lors des deux tests de rappel, les animaux nagent librement pendant 60 sec au sein du dispositif, la plateforme est retirée. Le temps passé dans le quadrant cible (qui contenait la plateforme pendant l'apprentissage) *vs* les autres quadrants (dessinés virtuellement sur le logiciel de tracking) est analysé et exprimé en pourcentages. Le nombre de croisements au niveau de l'annulus (zone virtuelle de 30 cm centrée sur la plateforme), **la latence du 1er passage dans la zone la plateforme** ainsi que la thigmotaxie et la vitesse sont également analysés (Figure 49).

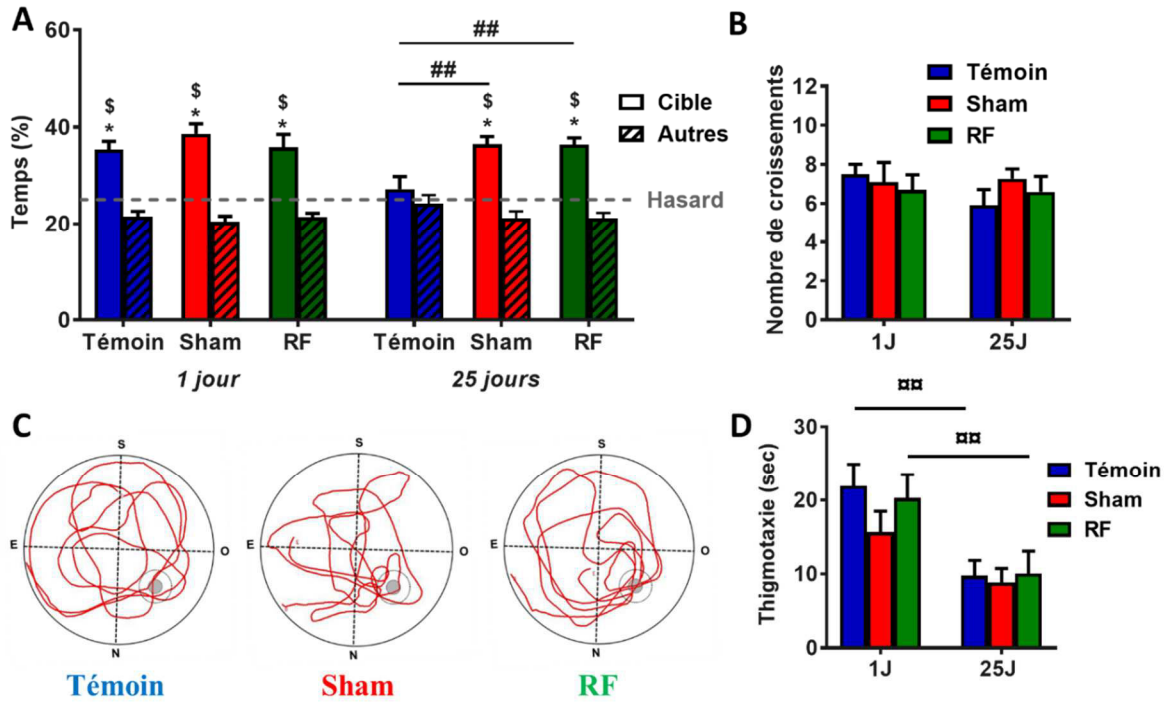


Figure 49 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale chez les "Adultes" : récente (1 jour) et ancienne (25 jours).

*A : **Le temps** (%) passé dans le quadrant cible est comparé à celui passé dans les autres quadrants ($p<0,001). Le trait en pointillés illustre le hasard fixé à 25% : lorsque les animaux se souviennent de l'emplacement de la plateforme, le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible est supérieur au hasard (*p<0,001 vs hasard), ##p<0,01, différences statistiquement significatives entre deux groupes. B : **Nombre de croisements** au niveau de l'annulus (zone virtuelle de 30 cm centrée sur la plateforme). C : Exemples de tracés de la trajectoire d'un rat représentatif de chaque groupe lors du rappel à 25J. D : Temps passé le long de la paroi de la piscine (**thigmotaxie**), ¤¤p<0,01 différence statistiquement significative 1 jour vs 25 jours (Groupe Témoin).*

Lors du rappel à 1 jour après le dernier essai du 4e jour, les trois groupes d'exposition (Témoin, Sham et RF) passent significativement (p<0,001) plus de 25% du **temps dans le quadrant cible** (test de Student, avec comparaison de la moyenne à un standard fixé à 25%, Figure 49A). Ceci met en évidence un bon rappel de la place de la plateforme (mémoire récente). De plus, l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Quadrant (F(1,126) = 153; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,126) = 0,29; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Quadrant x Groupe, F(2,126) = 1,16; ns. L'effet Quadrant montre que les rats des 3 groupes passent plus de temps dans le quadrant cible *vs* les autres quadrants (p < 0,001).

Lors du rappel à 25 jours, seuls les groupes Sham et RF passent significativement (p<0,001) plus de 25% de **leur temps dans le quadrant cible** (Figure 49A). Ceci met en

évidence un bon rappel de la place de la plateforme en mémoire ancienne uniquement pour les rats exposés dans la chambre réverbérante. Ainsi, l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Quadrant ($F(1,126) = 46,66$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,126) = 0,19$; ns) mais avec une interaction entre eux (Quadrant x Groupe, $F(2,126) = 6,65$; $p<0,01$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre une différence significative entre le quadrant cible et les autres quadrants ($p<0,001$) pour les groupes RF et Sham. Aucune différence entre les quadrants n'est visible pour le groupe Témoin.

De plus, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe, Délai) pour le temps passé dans le quadrant cible aux Délais 1J et 25J, montre un effet Groupe ($F(2,60) = 5,27$; $p<0,01$), sans effet Délai ($F(1,60) = 3,66$; $p = 0,06$), ni d'interaction (Groupe x Délai, $F(2,60) = 2,40$; ns). L'effet Groupe montre qu'en mémoire ancienne (25J), les rats témoins diffèrent des 2 autres groupes (analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls $p < 0,01$).

La Figure 49C montre un exemple de la trajectoire d'un rat représentatif de chaque groupe d'exposition lors du rappel à 25J.

L'étude du **nombre de passages dans l'annulus** (Figure 49B) (ANOVA à 2 facteurs : Groupe, Délai) ne montre aucune différence pour le facteur Groupe (ANOVA à deux facteurs, $F(2,60) = 0,30$; ns), ni d'effet du Délai ($F(1,60) = 0,66$; ns), ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Délai, $F(2,60) = 0,84$; ns).

La latence du 1er passage dans la zone de la plateforme (Annexe 6) est analysée par ANOVA à 2 facteurs (Groupe et Délai). L'analyse statistique montre un effet Groupe ($F(2,60) = 3,50$; $p<0,05$), sans effet Délai ($F(1,60) = 1,14$; ns), ni d'interaction entre les deux facteurs ($F(2,60) = 1,19$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre une différence significative entre les groupes Sham et Témoin au rappel 1J.

Pour la **thigmotaxie et la vitesse de nage** (Figure 49D et Annexe 6), l'ANOVA à 2 facteurs (Délai, Groupe) montre une diminution significative de la thigmotaxie et de la vitesse de nage lors du rappel à 25J sans effet Groupe ni interaction entre les 2 facteurs (Délai, $F(1,60) > 8$; $p<0,01$; Groupe, $F(2,60) < 1,9$; ns pour tous; Groupe x Délai, $F(2,60) < 0,55$; ns pour tous). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), met en évidence des différences significatives pour la **thigmotaxie** (effet du facteur Délai) entre les deux rappels ($p<0,05$) chez les Témoins et les RF. Aucune différence n'est visible entre 1J et 25J pour la vitesse de nage et 3 groupes, avec l'analyse post-hoc.

Ces résultats pour le groupe des rats "Adultes" ne montrent aucun effet des RF sur l'apprentissage, ni sur la mémoire récente et ancienne. On peut noter que lors du rappel en mémoire ancienne, on observe un "effet chambre" car seuls les groupes RF et Sham présentent un souvenir.
Une diminution de la vitesse de nage est visible au 5ème jour d'apprentissage (jour du rappel à 1J) chez tous les groupes et pourrait être liée au test de rappel réalisé juste avant ce même jour.

III.3. … chez le groupe "Agés" …

Une semaine après l'arrêt de l'exposition, 36 rats de 4 mois ont commencé le protocole d'apprentissage en piscine de Morris. Après le deuxième test de rappel et après l'analyse de l'ensemble des performances, 2 rats sont éliminés pour mauvaises performances (malades), donc le nombre final de rats par groupe est de 11 pour les Sham et 10 animaux pour les groupes RF et Témoin.

III.3.1. … lors de l'apprentissage

L'ANOVA à mesures répétées montre un effet Jour pour **la distance parcourue** (Figure 50A) par les animaux ($F(7,203) = 39,78$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,29) = 2,32$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Jour x Groupe, $F(14,203) = 1,20$; ns). Cette dernière diminue au cours du temps, montrant un bon apprentissage puisque l'animal trouve la plateforme plus vite chaque jour en parcourant une distance de plus en plus courte pour y arriver. L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence des différences significatives pour **la distance parcourue** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les autres jours ($p<0,05$ pour tous les groupes), entre le jour 2 et les autres jours ($p<0,01$ pour le groupe RF) et entre le jour 2 et les jours 5 à 8 ($p<0,05$ pour les groupes Sham et RF), entre le jour 3 et les jours 5 à 8 ($p<0,01$ pour les groupes Témoin et Sham) et entre les jours 4 et 8 ($p<0,05$ pour les groupes Témoin et Sham).

Cet apprentissage est également visible par l'étude de **la latence** (Figure 50B) (temps nécessaire à l'animal pour atteindre la plateforme) avec un effet Jour ($F(7,203) = 28,88$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,29) = 1,29$; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Jour x Groupe, $F(14,203) = 1,32$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence des différences significatives pour **la latence** (effet du facteur

Jour) entre le jour 1 et les autres jours (p<0,05 pour tous les groupes), entre le jour 2 et les autres jours (p<0,05 pour le groupe RF) et entre le jour 2 et les jours 5 à 8 (p<0,05 pour le groupe Sham), entre le jour 3 et les jours 5 à 8 (p<0,05 pour le groupe Témoin).

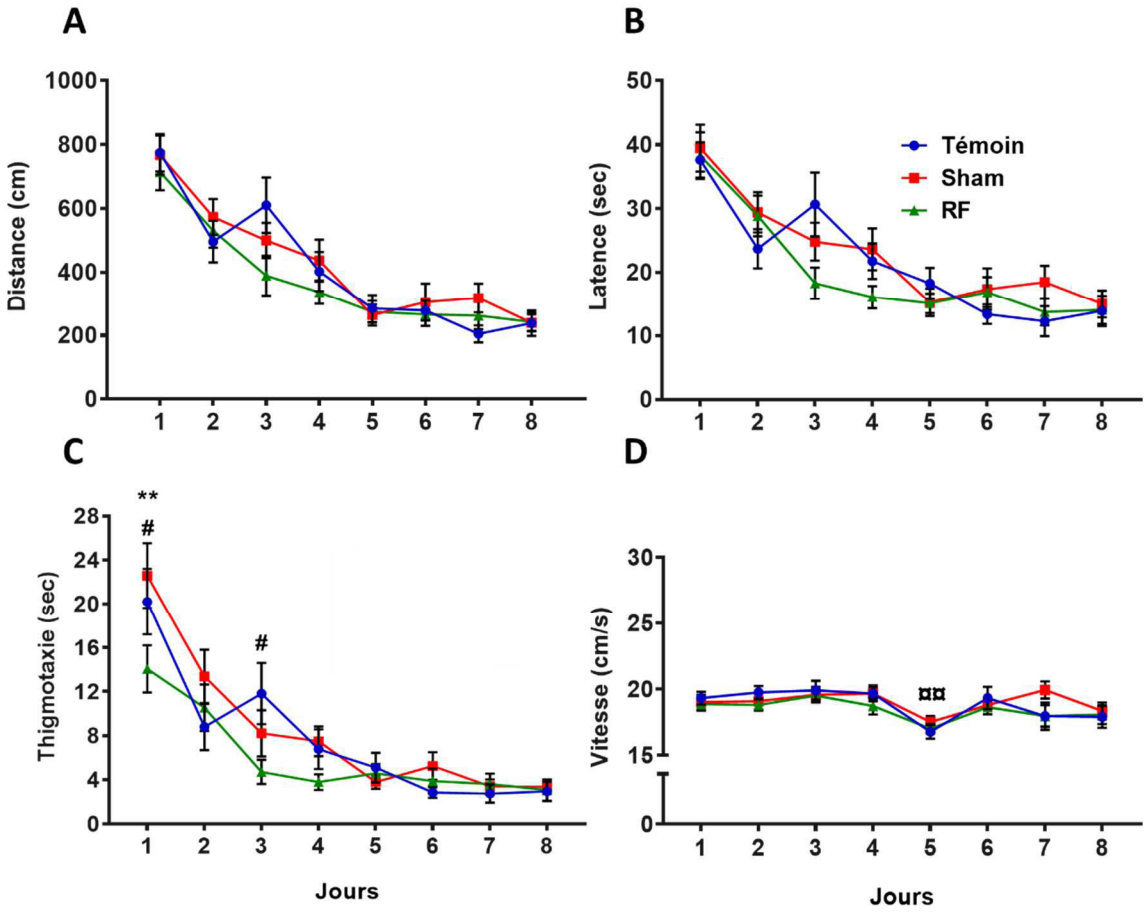


Figure 50 : Paramètres étudiés lors de l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale (Piscine de Morris) chez les rats "Agés".

*A : **Distance parcourue** pour atteindre la plateforme; B: **Latence** pour atteindre la plateforme ; C: Temps passé le long de la paroi de la piscine (**thigmotaxie**), ** p < 0.001, différence statistiquement significative entre le groupe Sham vs RF #p<0,05 différence statistiquement significative entre le groupe Témoin vs RF; D : **Vitesse** de nage, ¤¤p<0,01 différence statistiquement significative vs autres jours (tous les groupes). Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 10-11 rats/groupe.*

Cet effet Jour est également visible sur l'étude de la **thigmotaxie** (Figure 50C) qui diminue au cours des jours (F(7,203) = 40,33; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,29) = 2,02; ns) mais avec une interaction entre les deux facteurs (Jour x Groupe, F(14,203) = 2,11, p<0,05). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), met en évidence des différences significatives pour la **thigmotaxie** (effet du facteur Jour) entre le jour 1 et les autres jours (p<0,05 pour tous les groupes), entre le jour 2 et les autres jours (p<0,05 pour

tous les groupes), entre le jour 3 et les jours 6, 7 et 8 ($p<0,05$ pour les Sham). De plus, l'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence des différences significatives pour le facteur Groupe, entre RF et Témoin ($p<0,05$, pour les jours 1 et 3) et entre Sham et RF ($p<0,001$, pour le jour 1)

Ceci montre une diminution du stress du rat au cours des jours. Le premier jour, le niveau de stress est plus important chez les Témoins par rapport aux Sham et RF.

Enfin, on notera un effet du facteur Jour sur **la vitesse** ($F(7,203) = 8,44$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,29) = 0,56$; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Heure x Groupe, $F(14,203) = 0,98$; ns). L'analyse post-hoc (NK) montre une diminution significative ($p<0,01$) de la vitesse de nage pour tous les groupes le 5ème jour (jour du test de rappel en mémoire à long terme récente) (Figure 50D).

En résumé, chez les rats du groupe "Agés", l'apprentissage en piscine de Morris (mémoire spatiale) n'est pas impacté par les RF.

III.3.2. … lors du rappel (mémoire récente et ancienne)

Lors des deux tests de rappel, les animaux nagent librement pendant 60 sec au sein du dispositif, la plateforme est retirée. Le temps passé dans le quadrant cible (qui contenait la plateforme pendant l'apprentissage) *vs* les autres quadrants (dessinés virtuellement sur le logiciel de tracking) est analysé et exprimé en pourcentages. Le nombre de croisements au niveau de l'annulus (zone virtuelle de 30 cm centrée sur la plateforme), **la latence du 1er passage dans la zone la plateforme** ainsi que la vitesse de nage et la thigmotaxie sont également analysés (Figure 51).

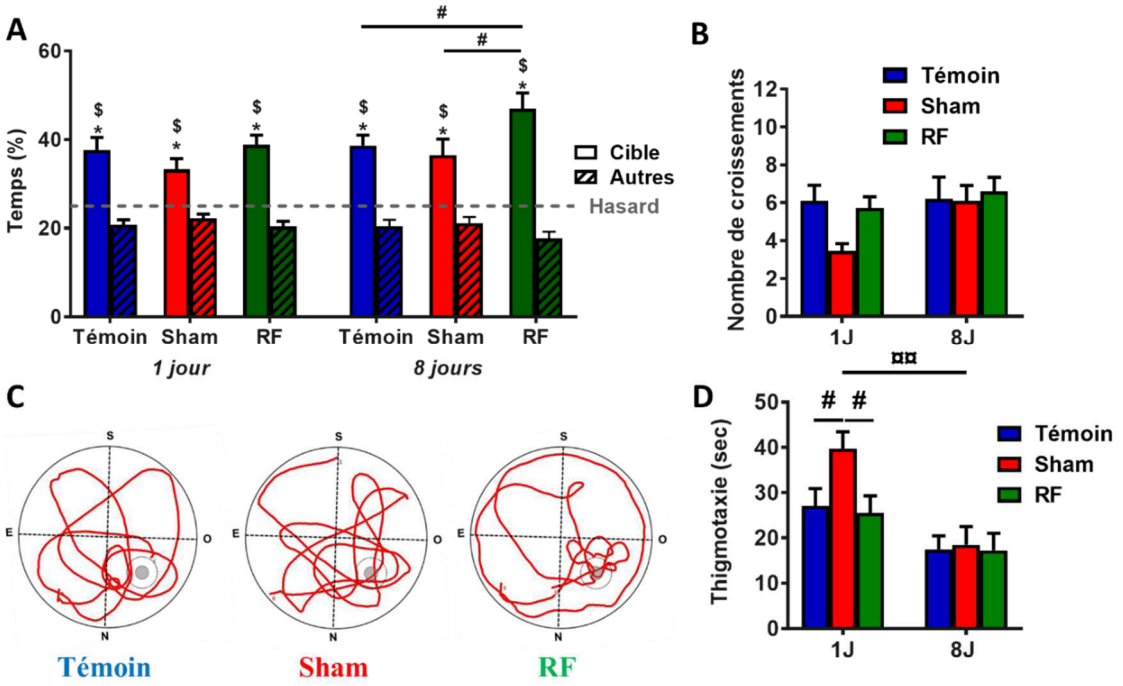


Figure 51 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale chez les "Agés" : récente (1 jour et 8 jours).

*A : **Le temps** (%) passé dans le quadrant cible est comparé à celui passé dans les autres quadrants ($p<0,001). Le trait en pointillés illustre le hasard fixé à 25% : lorsque les animaux se souviennent de l'emplacement de la plateforme, le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible est supérieur au hasard (*p<0,001 vs hasard), #p<0,05, différences statistiquement significatives entre deux groupes. B : **Nombre de croisements** au niveau de l'annulus (zone virtuelle de 30 cm centrée sur la plateforme). C : Exemples de tracés de la trajectoire d'un rat représentatif de chaque groupe lors du rappel à 8J. D : Temps passé le long de la paroi de la piscine (**thigmotaxie**), ¤¤p<0,01 différence statistiquement significative 1 jour vs 8 jours (groupe Sham), #p<0,05, différences statistiquement significatives entre deux groupes.*

Lors du rappel à 1 jour après le dernier essai du 4e jour, les trois groupes d'exposition (Témoin, Sham et RF) passent significativement (p<0,001) plus de 25% du **temps dans le quadrant cible** (test de Student, avec comparaison de la moyenne à un standard fixé à 25%, Figure 51A). Ceci met en évidence un bon rappel de la place de la plateforme (mémoire récente). De plus, l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Quadrant (F(1,118) = 122,7; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,118) = 0,72; ns) ni interaction entre les 2 facteurs (Quadrant x Groupe, F(2,118) = 2,87; p=0,06. L'effet Quadrant montre que les rats des 3 groupes passent plus de temps dans le quadrant cible *vs* les autres quadrants (p < 0,001).

Lors du rappel à 8 jours, les trois groupes d'exposition (Témoin, Sham et RF) passent significativement (p<0,001) plus de 25% de **leur temps dans le quadrant cible**

(Figure 51A). Ceci met en évidence un bon rappel de la place de la plateforme en mémoire ancienne. Ainsi, l'analyse par ANOVA à 2 facteurs montre un effet Quadrant ($F(1,118) = 132,8$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,118) = 1,36$; ns) mais avec une interaction entre eux (Quadrant x Groupe, $F(2,118) = 5,43$; $p<0,01$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence des différences significatives entre les groupes RF et Sham *vs* le groupe Témoin ($p<0,05$) pour le temps passé dans la zone cible.

La Figure 51C montre un exemple de la trajectoire d'un rat représentatif de chaque groupe d'exposition lors du rappel à 8J.

Enfin, l'étude d'autres paramètres par une ANOVA à 2 facteurs (Groupe, Délai) tels que **la latence du 1er passage dans la zone la plateforme** (Annexe 6) et **le nombre de passages dans l'annulus** (Figure 51B) (zone virtuelle de 30 cm de diamètre autour de la plateforme) ne montre aucune différence pour le facteur Groupe (ANOVA à deux facteurs, $F(2,57) < 2,17$; ns pour tous), ni d'effet du Délai ($F(1,66) < 3,60$; ns pour tous), ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Délai, $F(2,64) < 1, 42$; ns pour tous). Cependant, pour la **thigmotaxie** (Figure 51D) et **la vitesse de nage** (Annexe 6), l'ANOVA à 2 facteurs (Délai, Groupe) montre une diminution significative (pour les deux paramètres) lors du rappel à 8J sans effet Groupe ni interaction entre les 2 facteurs (Délai, $F(1,57) > 6,81$; $p<0,01$; Groupe, $F(2,57) < 2,64$; ns ; Groupe x Délai, $F(2,57) < 1,88$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence une différence significative pour la **thigmotaxie** (effet du facteur Délai) entre les deux rappels ($p<0,01$) chez les Sham. Pour la vitesse de nage, aucune différence significative entre les deux rappels n'est visible.

Ces résultats pour le groupe des rats "Agés" ne montrent aucun effet des RF sur l'apprentissage, ni sur la mémoire récente à 1J. On peut noter qu'à 8J les performances des RF sont meilleures, bien que les autres paramètres (croisement annulus, vitesse de nage, vs latence, …) ne diffèrent pas entre les groupes. Il est à noter que le 2e rappel a été effectué à 8j et non 25j comme pour les 2 autres groupes d'âge, expliquant d'une part les bonnes performances et d'autre part, l'impossibilité de vérifier l'existence d'un effet chambre tel qu'observé dans le groupe Adultes, voire un effet des RF pour une mémoire ancienne. De plus, la réduction de la thigmotaxie lors de l'apprentissage (jours 1 et 3), pourrait signifier un niveau d'anxiété initial plus faible chez les RF par rapport aux 2 autres groupes. Enfin, une

diminution de la vitesse de nage est également visible au 5ème jour d'apprentissage (jour du rappel à 1J) chez tous les groupes, elle serait liée au rappel réalisé juste avant ce même jour.

L'étude de l'apprentissage en mémoire spatiale ainsi que le rappel d'un souvenir spatial en mémoire récente et ancienne ne montre aucun effet des RF pour chez les rats "Ados" et "Adultes". Cependant, chez les rats "Agés", les performances de rappel sont meilleures chez les rats RF au délai de 8 jours, par rapport aux 2 autres groupes (Sham, Témoin). Enfin, en ce qui concerne le groupe "Adultes", lors du rappel en mémoire ancienne (25J), un "effet chambre" est mis en évidence, du fait que les rats Témoins ne présentent pas de souvenir de la localisation de la plateforme alors que les 2 groupes exposés à la chambre (Sham et RF) montrent un souvenir de celle-ci.

Partie 3 : Effet du signal 4G sur les analyses biomoléculaires

Pour rappel, les études en biologie moléculaire sont réalisées dans deux conditions :

- Condition 1 : étude des effets des RF en "Basal" ou "HC" et en "Apprentissage" ou "Appr". Les rats "Home Cage" ou "HC" sont stabulés dans leur cage sans manipulation (Basal), alors que les rats "Appr" réalisent un apprentissage spatial (Piscine de Morris) pendant 3 jours avec mise à mort 1h après le dernier essai du 3ème jour. Le séquençage des ARN messagers est réalisé dans l'Hip dorsal et le CPFm uniquement dans le groupe "Adultes", et la validation par Rt-qPCR porte sur quelques gènes dans les 3 groupes d'âges et les 2 régions cérébrales.
- Condition 2 : étude des effets des RF à long terme (LT) en "Basal" ou "LT-HC" et après un apprentissage de 8 jours en piscine de Morris (8J + test de rappel à 24h, lors du 5ème jour d'apprentissage) ("LT-Appr"). Les animaux sont sacrifiés 25 jours après le 8ème et dernier jour d'apprentissage, sans test de rappel. Ce séquençage est réalisé uniquement dans le CPFm (lieu privilégié de consolidation et de stockage à long terme d'un souvenir).

Pour chaque condition "Appr", la distance parcourue pour chaque jour d'apprentissage est analysée afin de vérifier que les rats apprennent bien (diminution de cette distance au cours du temps). Les résultats, présentés dans la Figure 52, montrent un bon apprentissage pour tous les groupes (Témoin, Sham et RF) et pour tous les groupes d'âge ("Ados", "Adultes", "Agés").

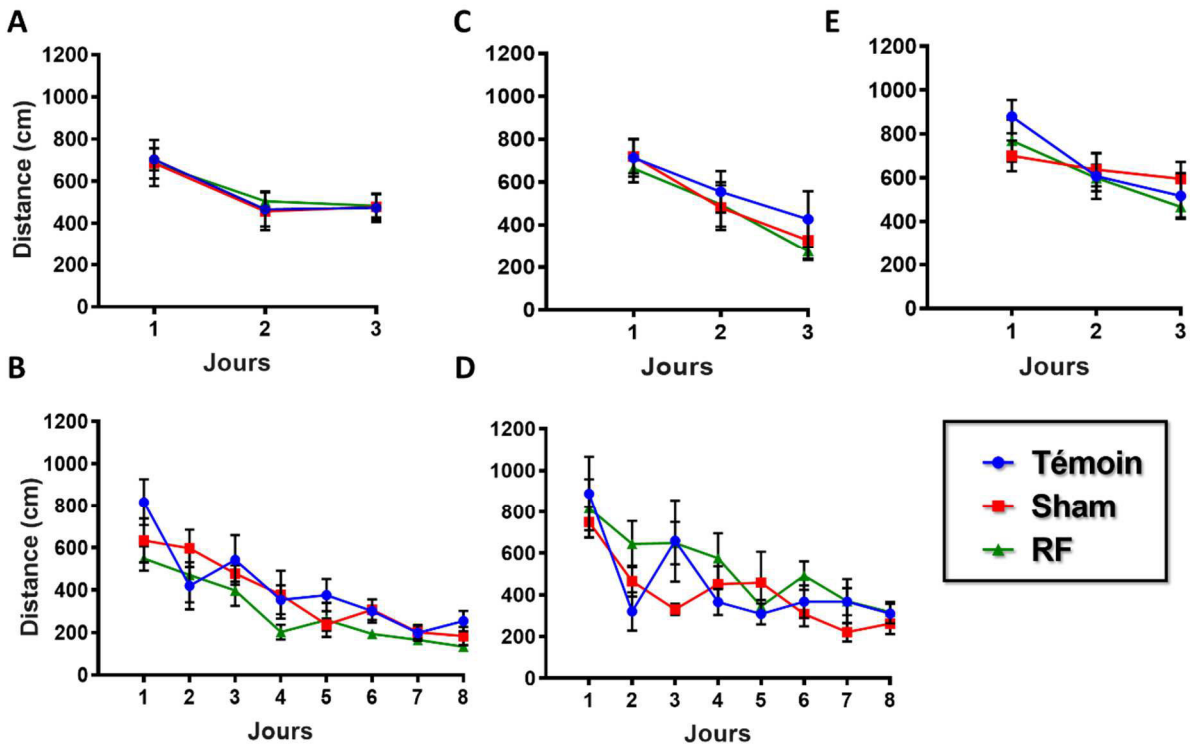


Figure 52 : Courbes d'apprentissage (distance parcourue) pour tous les groupes d'âge pour les conditions apprentissage et persistance.

A : Résultats pour le groupe des "Ados, Appr" : l'ANOVA à mesures répétées montre un effet Jour sur la distance parcourue par les animaux (F(2,30)=9,30; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,15)=0,04; ns) ni interaction entre les deux (Jour x Groupe, F(4,30)=0,05; ns). B : Résultats pour le groupe des "Ados, LT-Appr", l'ANOVA à mesures répétées montre les mêmes résultats avec un effet Jour (F(7,105)=17,78; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,15)=2,91; p=0,09) ni interaction entre les deux (Jour x Groupe, F(14,105)=0,85; ns). C : Résultats pour le groupe des "Adultes, Appr", l'ANOVA à mesures répétées montre un effet Jour sur la distance parcourue par les animaux (F(2,30)=10,87; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,15)=0,72; ns) ni interaction entre les deux (Jour x Groupe, F(4,30)=0,15; ns). D : Résultats pour le groupe des "Adultes, LT-Appr" : l'ANOVA à mesures répétées montre les mêmes résultats avec un effet Jour (F(7,91)=9,58; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,13)=2,11; ns) ni interaction entre les deux (Jour x Groupe, F(14,91)=1,13; ns). E : Résultats pour le groupe des "Agés, Appr" : l'ANOVA à mesures répétées, montre un effet Jour sur la distance parcourue par les animaux (F(2,42)=9,55; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,21)=0,26; ns) ni interaction entre les deux (Jour x Groupe, F(4,42)=0,96; ns).

I. Le groupe des "Adultes"

I.1. Effet des RF sur le génome entier : séquençage des ARN messagers

Le séquençage des ARN messagers de l'hippocampe dorsal et du cortex préfrontal médian a été réalisé sur 3 échantillons de chacune des 6 conditions expérimentales : Home-Cage Témoin (HC-Témoin), Home-Cage Sham (HC-Sham), Home-Cage RF (HC-RF), Apprentissage Témoin (Appr-Témoin), Apprentissage Sham (Appr-Sham) et Apprentissage RF (Appr-RF). Cela représente donc 36 échantillons au total dans la condition 1.

Pour la condition 2 (LT), le nombre d'échantillons séquencés est identique à celui de la condition 1, 18 échantillons répartis en 6 groupes : Home-Cage Témoin (LT-HC-Témoin), Home-Cage Sham (LT-HC-Sham), Home-Cage RF (LT-HC-RF), Apprentissage Témoin (LT-Appr-Témoin), Apprentissage Sham (LT-Appr-Sham) et Apprentissage RF (LT-Appr-RF).

Les séquençages de ces 3x18 = 54 échantillons sont réalisés par la plateforme GenomEast à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC).

La sélection de ces échantillons a été faite sur les résultats de dosage après l'extraction des ARN totaux. En effet, lors de ce dosage par densité optique (DO), les rapports de DO (260/280 nm et 260/230 nm) nous ont permis de vérifier l'état de contamination des échantillons par les protéines, les sels ou le trizol. Les échantillons présentant les ratios les plus faibles sont donc écartés. Les échantillons sélectionnés sont envoyés à la plateforme où ils sont validés par établissement de leur profil avec un "Bioanalyser" et seuls les échantillons ayant un R.I.N. (RNA Intergrity Number) > 8 sont séquencés.

I.1.1. Hippocampe dorsal

I.1.1.1. Premiers résultats

Pour l'hippocampe dorsal, nous avons 3 échantillons par groupe expérimental : HC-Témoin n°1 à 3, HC-Sham n° 4 à 6, HC-RF n° 7 à 9, Appr-Témoin n°10-12, Appr-Sham n°13 à 15 et Appr-RF n° 16 à 18.

I.1.1.2. Premiers résultats

La première analyse statistique est 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 Rat afin de connaître le gène qui leur est associé. De ce fait, pour chaque gène, on obtient le nombre de *reads* alignés, 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.

On établit ainsi l'expression de tous les gènes dans chaque échantillon et différentes analyses sont menées pour comparer les échantillons entre eux.

L'analyse de la **"distance entre les échantillons"**, représentée sur la Figure 53, 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. On peut voir sur le dendrogramme que les échantillons d'un même groupe sont éloignés entre eux car, pour la plupart, ils ne "clusterisent" pas ensemble, hormis les échantillons du groupe Appr-Sham qui semblent assez proches (Figure 53). De plus, les groupes HC et Appr (comparés indépendamment du traitement) apparaissent également non clusterisés alors qu'on aurait pu attendre une différence d'expression visible entre ces deux conditions expérimentales. Ceci laisse présager qu'il existe une grande hétérogénéité entre les échantillons dans cette expérience menée sur l'Hip dorsal.

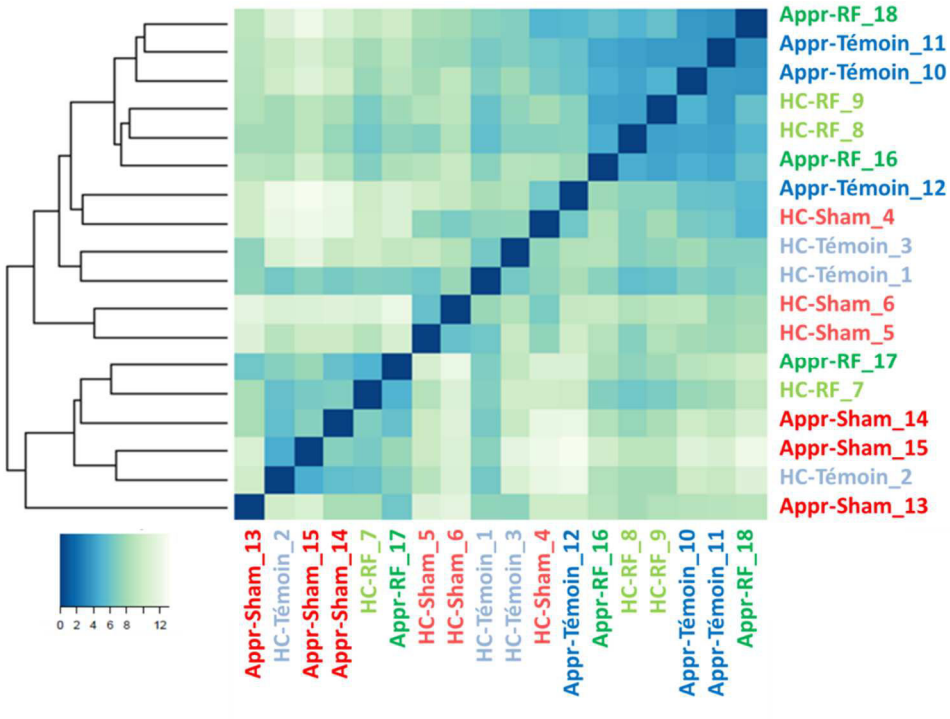


Figure 53 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons au sein de l'hippocampe dorsal en condition 1.
Ce graphique permet de regrouper les échantillons selon leur profil d'expression et leur homogénéité. Plus les échantillons sont proches plus la couleur est intense.

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 54). 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 leur distance entre eux sera grande sur les axes. La Figure 54A représente l'analyse PC pour les groupes en conditions "HC" et la Figure 54B pour les groupes en condition "Appr". Par exemple, on voit que dans la condition "HC", les échantillons NSLC116 et NSLC117, qui appartiennent pourtant au même groupe expérimental (Témoin), la composante PC1 est supérieure à 25 (Figure 54A). De même, l'échantillon NSLC126 du groupe (Témoin) en condition d'apprentissage est très éloigné de ses deux autres réplicas dans la composante PC2 (Figure 54B).

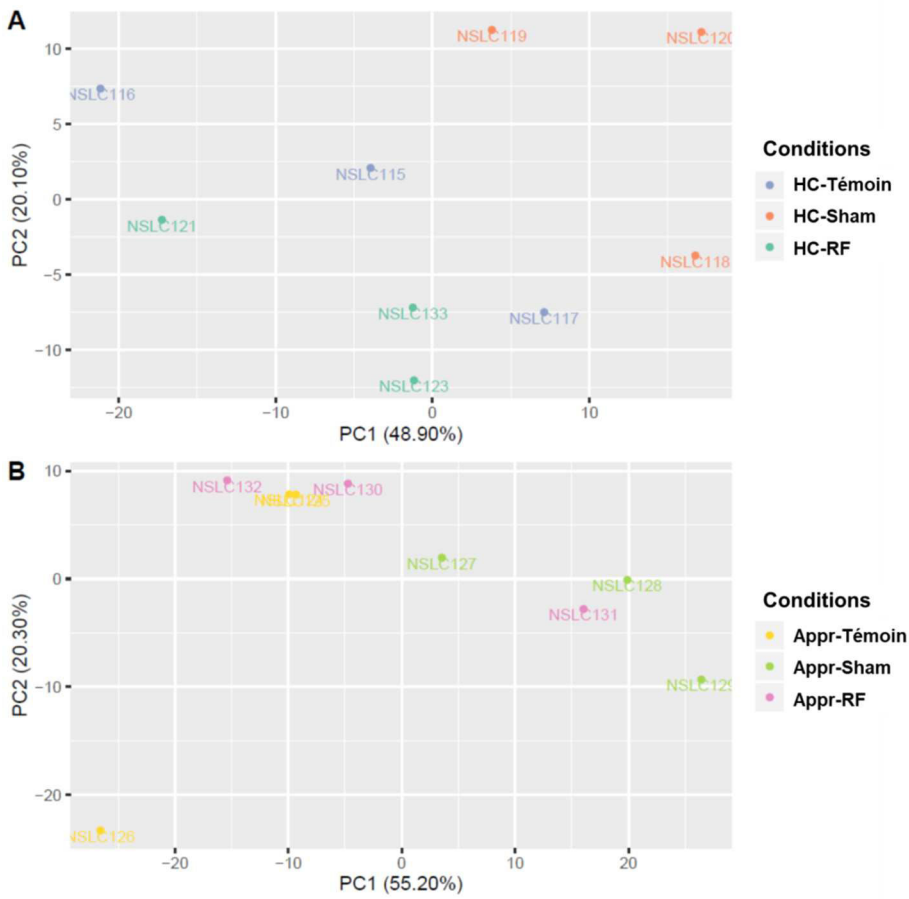


Figure 54 : Analyse des composantes principales (Principal Component ou PC) pour le groupe "HC" (A) et "Appr" (B) pour les échantillons de l'Hip dorsal en condition 1.

Pris dans leur ensemble, ces analyses primaires montrent une grande hétérogénéité entre les échantillons, qui pourrait provenir de plusieurs facteurs : qualité et conditions de la dissection (cf ci-dessous : Ajustements et seconde analyse).

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 premiers résultats de séquençage des 18 échantillons (hippocampe dorsal) montrent un nombre de gènes modulés très variable entre les différents groupes expérimentaux, mettant en évidence, ici aussi, une hétérogénéité dans les échantillons (Tableau 2)

	Comparaison	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Basal	HC-Sham vs HC-Témoin	221	631	852
	HC-RF vs HC-Témoin	0	0	0
	HC-RF vs HC-Sham	1367	477	1844
Pendant l'apprentissage	Appr-Sham vs Appr-Témoin	313	913	1226
	Appr-RF vs Appr-Témoin	1	41	42
	Appr-RF vs Appr-Sham	1	5	6
Effet de l'apprentissage	Appr-Témoin vs HC-Témoin	75	17	92
	Appr-Sham vs HC-Sham	2061	1579	3640
	Appr-RF vs HC-RF	4	0	4

Tableau 2 : Nombre de gènes significativement modulés sur 18 échantillons dans l'hippocampe dorsal.
Les critères de significativité sont un Log2(FC)>0 pour les gènes surexprimés et un Log2(FC)<0 pour les gènes sous-exprimés et p<0,05 comme seuil de significativité.

Ces données sont retrouvées dans le rapport S16278 (Annexe 9).

I.1.1.3. Ajustements et seconde analyse

Après cette première analyse, nous avons vérifié la qualité et les conditions de la dissection des échantillons tels que l'heure et le jour de mise à mort. Pour les échantillons : (HC-Témoin_2 [NSLC116], Appr-Témoin_12 [NSLC126]) et (HC-RF_7 [NSLC121]), nous avons trouvé que les deux Témoins avaient été disséqués plus tard que les autres et disséqués un jour différent pour l'échantillon HC-RF. Ceci pourrait expliquer l'hétérogénéité objectivée

par les analyses précédentes (dendrogrammes, Figure 53 et analyses PC, Figure 54). Nous avons donc décidé d'écarter ces 3 échantillons et avons demandé une seconde analyse statistique de l'étude, n'incluant pas ces données (Tableau 3). Cette nouvelle analyse met en évidence un nombre de gènes significativement modulés différent (Tableau 2 *vs* Tableau 3).

N.B. Pour les séquençages suivants dans le CPFm chez l'Adulte (HC, Appr et LT), le jour et surtout l'heure de dissection seront pris en compte dans la sélection des échantillons.

	Comparaison	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Basal	HC-Sham vs HC-Témoin	14	27	41
	HC-RF vs HC-Témoin	12	6	18
	HC-RF vs HC-Sham	862	362	1224
Pendant l'apprentissage	Appr-Sham vs Appr-Témoin	243	897	1140
	Appr-RF vs Appr-Témoin	0	0	0
	Appr-RF vs Appr-Sham	2	0	2
Effet de l'apprentissage	Appr-Témoin vs HC-Témoin	80	46	126
	Appr-Sham vs HC-Sham	1620	1585	3205
	Appr-RF vs HC-RF	6	1	7

Tableau 3: Nombre de gènes significativement modulés sur 15 échantillons dans l'hippocampe dorsal.
Les critères de significativité sont un Log2(FC)>0 pour les gènes surexprimés et un Log2(FC)<0 pour les gènes sous-exprimés et p<0,05 comme seuil de significativité.

Malgré tout, les résultats restent toujours hétérogènes entre les groupes expérimentaux. Cependant, ces données correspondent à un choix de sélection ("cut-off") très large : pas de cut-off sur le Fold Change (|Log2(FC)|>0 pour gènes différentiellement exprimés) et une *p-value* ajustée <0,05. Nous choisissons d'augmenter le cut-off afin d'éliminer les gènes peu induits/réprimés ou peu significativement. Ainsi, nous augmentons le cut-off à : Log2(FC) à 0,5 et une *p-value* ajustée <0,01 (Tableau 4).

	Comparaison	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Basal	HC-Sham vs HC-Témoin	6	1	7
	HC-RF vs HC-Témoin	6	2	8
	HC-RF vs HC-Sham	347	80	427
Pendant l'apprentissage	Appr-Sham vs Appr-Témoin	77	361	438
	Appr-RF vs Appr-Témoin	0	0	0
	Appr-RF vs Appr-Sham	2	0	2
Effet de l'apprentissage	Appr-Témoin vs HC-Témoin	29	12	41
	Appr-Sham vs HC-Sham	844	739	1583
	Appr-RF vs HC-RF	3	1	4

Tableau 4 : Nombre de gènes significativement modulés sur 15 échantillons dans l'hippocampe dorsal avec des critères de significativité plus restrictifs.
Les critères de significativité sont un Log2(FC)>0,5 pour les gènes surexprimés et un Log2(FC)<-0,5 pour les gènes sous-exprimés et p<0,01comme seuil de significativité.

Après ces ajustements, les données restent hétérogènes entre les groupes et manquent toujours de cohérence (par exemple, si plus de 400 gènes sont différentiellement exprimés entre les groupes RF et Sham, nous devrions retrouver un grand nombre de gènes modulés entre les groupes RF et Témoin ou entre Sham et Témoin, or ce n'est pas le cas). Nous décidons alors de répliquer cette expérience, seul moyen pour avoir une analyse statistique plus puissante. Il se peut que l'hétérogénéité de ce tissu (hippocampe dorsal, qui contient plusieurs régions anatomiques différenciées, comme le gyrus denté, et la corne d'Ammon avec CA1, CA2, CA3) soit trop importante pour pouvoir correctement analyser les données avec n=3. Un nouveau groupe de rats a été réexposé, les tissus prélevés et les ARN extraits. L'analyse de réplicas (n=4/condition expérimentale) est en cours de séquençage (septembre 2018).

I.1.1.4. Analyse des résultats

En attendant les résultats des réplicas (prévus vers Décembre 2018/Janvier 2019), l'analyse a été faite avec un cut-off tel que : |Log2(FC)|>0,5 pour les gènes différentiellement régulés et p<0,01 (Tableau 4).

Pour objectiver l'effet des RF dans nos expériences, nous avons choisi d'analyser systématiquement les comparaisons : "RF *vs* Sham", ce dernier groupe qui représente le contrôle a été exactement dans les mêmes conditions expérimentales que le groupe RF, mais

n'a pas été exposé aux RF, et "RF *vs* Témoin", groupe qui n'a pas été exposé aux RF, et qui n'est pas entré dans la chambre d'exposition.

Effet des RF en "Basal (HC)"

Dans cette condition, l'effet des RF est recherché 6 jours après la fin de l'exposition de 3 mois aux RF.

L'analyse statistique montre peu de gènes significativement modulés dans la comparaison "RF *vs* Témoin" (Tableau 5). De façon cohérente, notons qu'il y a également peu de gènes dérégulés dans la comparaison "Sham *vs* Témoin", indiquant qu'il ne semble pas y avoir ici un effet de la chambre.

Basal (HC)	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Sham *vs* Témoin	6	1	7
RF *vs* Témoin	**6**	**2**	**8**
RF *vs* Sham	**347**	**80**	**427**

Tableau 5 : Tableau des gènes modulés, dans l'hippocampe dorsal, en basal.

En revanche, dans la comparaison "RF *vs* Sham", nous observons 427 gènes significativement modulés. Nous réalisons alors une analyse fonctionnelle 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).

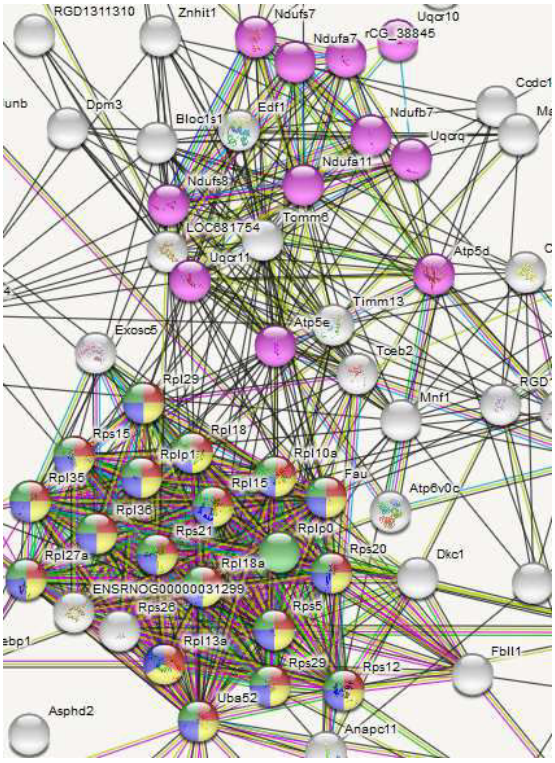


Figure 55 : Relation fonctionnelle entre les 347 gènes surexprimés pour la comparaison RF vs Sham en basal.

Les traits reliant les différents gènes représentent l'interaction (physique ou fonctionnelle) entre deux gènes. Plus les traits sont nombreux plus les interactions sont grandes. Les clusters principaux sont "constituants du ribosome (18)", "processus métaboliques (21)", "ribosome (19)" et "traduction (19)" dans un noyau et "phosphorylation oxydative (13)" dans un second noyau.

En utilisant STRING, les **347 gènes surexprimés** sont regroupés dans plusieurs clusters fonctionnels comme "constituants du ribosome" (*p-value* = 2,96e^{-10}), "processus métabolique" (*p-value* = 2,37e^{-7}), "ribosome" (*p-value* = 3,94e^{-10}) et "traduction" (*p-value* = 2,37e^{-7}) ou encore " phosphorylation oxydative " (4,65e^{-5}) (Figure 55 et Figure 56).

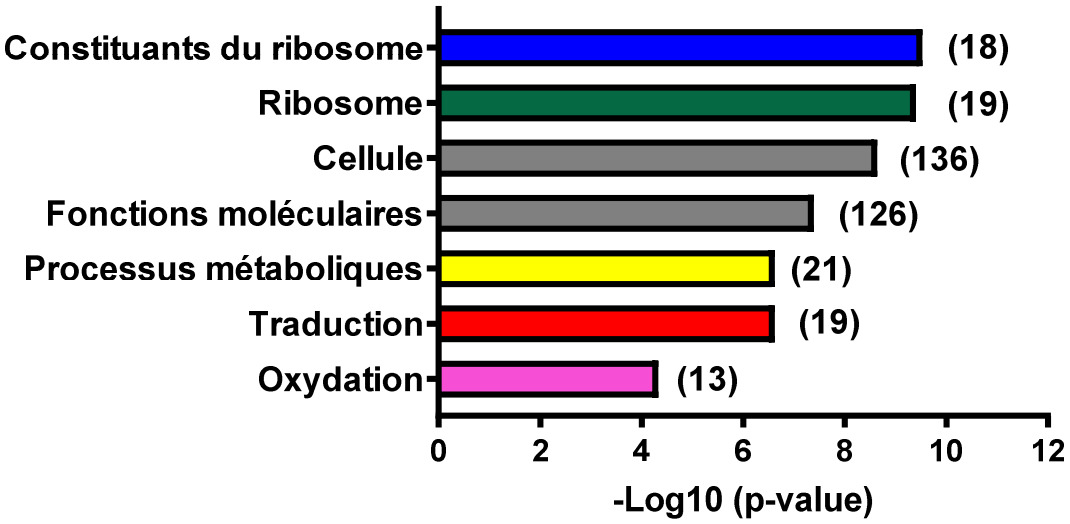


Figure 56 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 347 gènes surexprimés issus de la comparaison HC-RF vs HC-Sham (nombre de gènes).

Pour les **80 gènes sous-exprimés**, DAVID regroupe 4 gènes appartenant à la famille des dynéines dans un cluster (avec une faible *p-value* = 0,69), alors qu'aucun cluster fonctionnel n'est trouvé en utilisant STRING.

En résumé, dans l'étude de l'expression des gènes en condition basale, nous avons pu mettre en évidence un impact des RF dans l'hippocampe dorsal, avec la modulation de 427 gènes. L'exposition aux RF pourrait augmenter l'expression des gènes en lien avec traduction, les processus métaboliques et l'oxydation.

Il s'agira de voir si ces résultats se confirment avec l'analyse des réplicas et la validation par qRT-PCR.

Effet des RF pendant l'apprentissage ("Appr")

APPRENTISSAGE (Appr)	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Sham *vs* Témoin	77	361	438
RF *vs* Témoin	**0**	**0**	**0**
RF *vs* Sham	**2**	**0**	**2**

Tableau 6 : Tableau des gènes modulés, dans l'hippocampe dorsal, pendant l'apprentissage.

L'analyse de la comparaison "Appr-RF *vs* Appr-Sham" ne montre que 2 gènes surexprimés avec un faible FC (Fold Change, Tableau 7), indiquant que l'impact de l'exposition aux RF en condition "Basal" sur l'expression des gènes n'est plus visible lorsque les rats sont en cours d'apprentissage.

Gènes surexprimés		Description	Log2(FC)	p-value ajustée
Appr-RF *vs* Appr-Sham	Cyp26b1	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	1,084	1,5139E-08
	Nxph3	neurexophilin 3	1,443	5,0288E-05

Tableau 7 : Tableau des gènes surexprimés pendant l'apprentissage pour la comparaison RF vs Sham.

L'analyse statistique ne montre aucun gène significativement modulé pour la comparaison "RF *vs* Témoin". Cependant, il est important de souligner que la comparaison "Sham *vs* Témoin" montre **438 gènes modulés** (Tableau 6). L'analyse des clusters par STRING, pour les **77 gènes surexprimés** (Figure 57), montre des gènes très différents avec un seul cluster en lien avec la voie de signalisation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (*p-value* = 0,009).

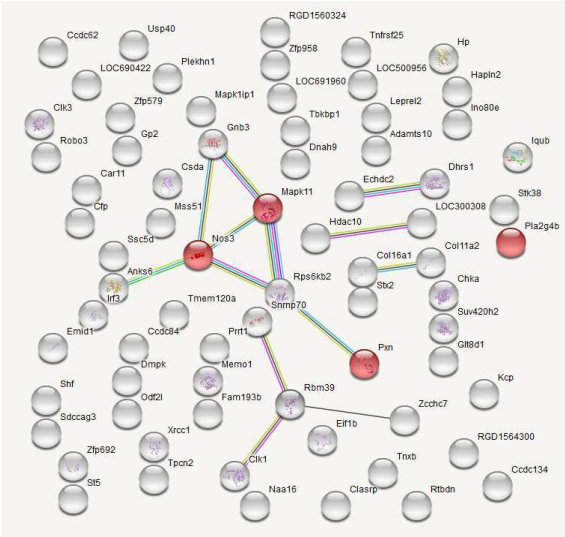


Figure 57 : Relation fonctionnelle entre les 77 gènes surexprimés pour la comparaison Sham vs Témoin après apprentissage.
Le cluster mis en évidence est "voie de signalisation du VEGF (4)" (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire).

L'analyse réalisée avec DAVID, quant à elle, met en évidence d'autres clusters en plus de "voie de signalisation du VEGF" : "protéines kinases sérine/thréonine" (*p-value* = 0,27, 6 gènes) et "régulation de l'épissage de l'ARN" (*p-value* = 0,72, 3 gènes). Ces deux groupements fonctionnels ont une importance faible en regard des *p-value* très faibles.

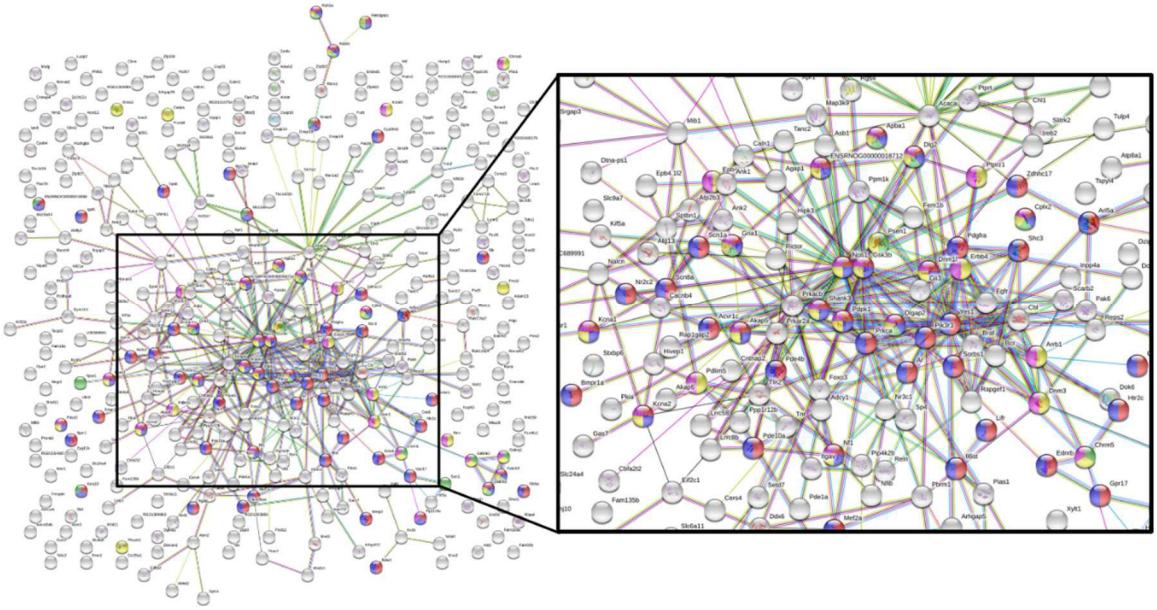


Figure 58 : Relation fonctionnelle entre des 361 gènes sous-exprimés pour la comparaison "Sham vs Témoin" après apprentissage.
Les clusters principaux sont "communication cellulaire (60)", "transmission synaptique (20)", "signalisation cellulaire (60)", "synapse (38)" et "composants synaptiques (33)".

Pour les **361 gènes sous-exprimés,** les analyses fonctionnelles effectuées avec STRING et DAVID montrent les mêmes résultats avec le regroupement significatif de gènes en lien avec la communication cellulaire, la transmission synaptique, la signalisation cellulaire et la synapse (Figure 58 et Figure 59).

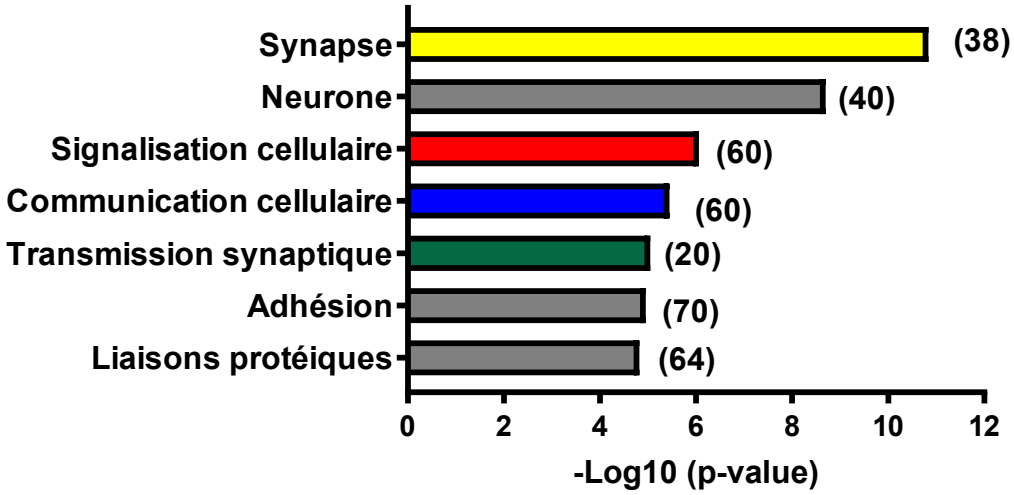


Figure 59 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 361 gènes sous-exprimés issus de la comparaison "Appr-Sham vs Appr-Témoin".

Lorsque l'on compare l'expression des gènes entre les 3 groupes de rats pendant l'apprentissage (Appr) dans l'Hip dorsal, on s'aperçoit que seuls deux gènes sont modulés par les RF en comparaison avec les Sham. Ceci suggère que les effets obtenus en basal n'impacteraient finalement pas l'apprentissage. On notera tout de même un effet significatif dans la comparaison "Sham vs Témoins", avec des gènes sous-exprimés chez les Sham en lien avec la communication cellulaire (synapse et neurone) et l'adhésion. Ceci n'est pas retrouvé dans la comparaison "RF vs Témoin", donc ce n'est pas un effet de la chambre d'exposition. A nouveau, ceci suggère qu'il existe une certaine hétérogénéité entre les échantillons.

L'étude de l'impact des RF sur le génome dans l'hippocampe dorsal montre un effet significatif des RF en condition "Basal", avec 427 gènes modulés. L'analyse fonctionnelle montre une surexpression des gènes en lien avec la traduction et les processus métaboliques. Cependant, l'exposition aux RF de rats soumis à un apprentissage spatial ne produit plus que 2 gènes dérégulés. Ceci suggère que l'exposition aux RF affecterait peut-être des processus mis également en jeu au cours d'un apprentissage dans l'hippocampe dorsal.

Un autre séquençage sur un lot de rats exposés pendant l'été 2018 viendra compléter ces données sur l'hippocampe dorsal (résultats attendus vers décembre 2018/ Janvier 2019).

I.1.2. CPFm

Pour rappel, dans le CPFm, le séquençage des ARNm est réalisé dans les mêmes conditions que pour l'hippocampe dorsal (mêmes animaux, conditions "Basal" et "Apprentissage"), mais également dans une autre condition afin d'évaluer les effets à long terme de l'exposition aux RF. En effet, en lien avec les tests de mémoire ancienne, nous avons testé si l'exposition aux RF pouvait impacter les processus moléculaires mis en jeu lors de la consolidation par les systèmes. Ainsi, nous avons entrainé des rats pendant 8 jours en piscine de Morris, et avons attendu 25 jours avant d'entreprendre un RNA-seq dans le CPFm, région fortement impliquée dans la consolidation systémique d'une mémoire ancienne (voir Introduction chapitre 2).

I.1.1.5. Condition 1 : effet des RF en "Basal (HC)" et "Apprentissage (Appr)"

Le séquençage est réalisé sur 3 échantillons par groupe expérimental : HC-Témoin n°1 à 3, HC-Sham n°4 à 6, HC-RF n°7 à 9, Appr-Témoin n°10-12, Appr-Sham n°13 à 15 et Appr-RF n°16 à 18.

L'analyse de la **"distance entre les échantillons"**, représentée sur la Figure 60, basée sur l'expression de l'ensemble des gènes montre une clusterisation en deux groupes bien distincts, avec d'un côté les animaux en condition "Basal" et de l'autre les animaux en condition "Apprentissage".

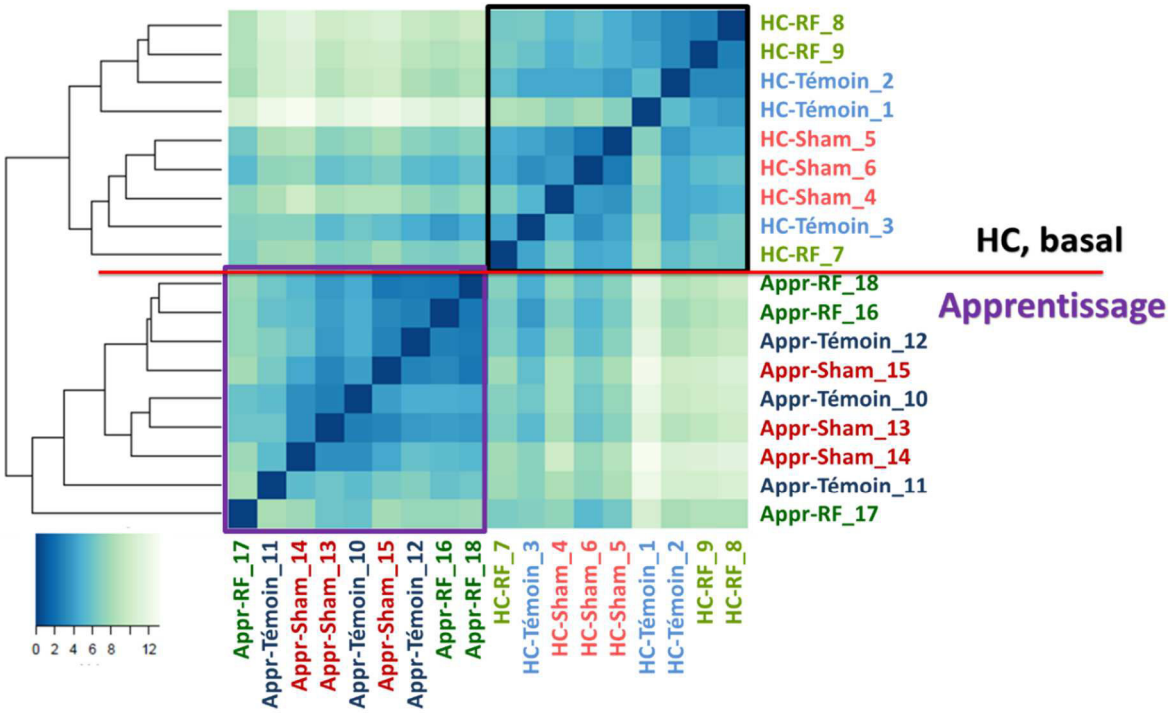


Figure 60 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons au sein du CPFm en condition 1.
Ce graphique permet de regrouper les échantillons selon leur profil d'expression et leur homogénéité. Plus les échantillons sont proches, plus la couleur est intense.

Les analyses en composante principale (PC) (Figure 61) montrent peu de variations entre les échantillons appartenant à un même groupe, lorsque les conditions ("Basal" ou "Apprentissage") sont analysées indépendamment. Ces données attestent d'une meilleure homogénéité entre les échantillons que dans l'hippocampe dorsal.

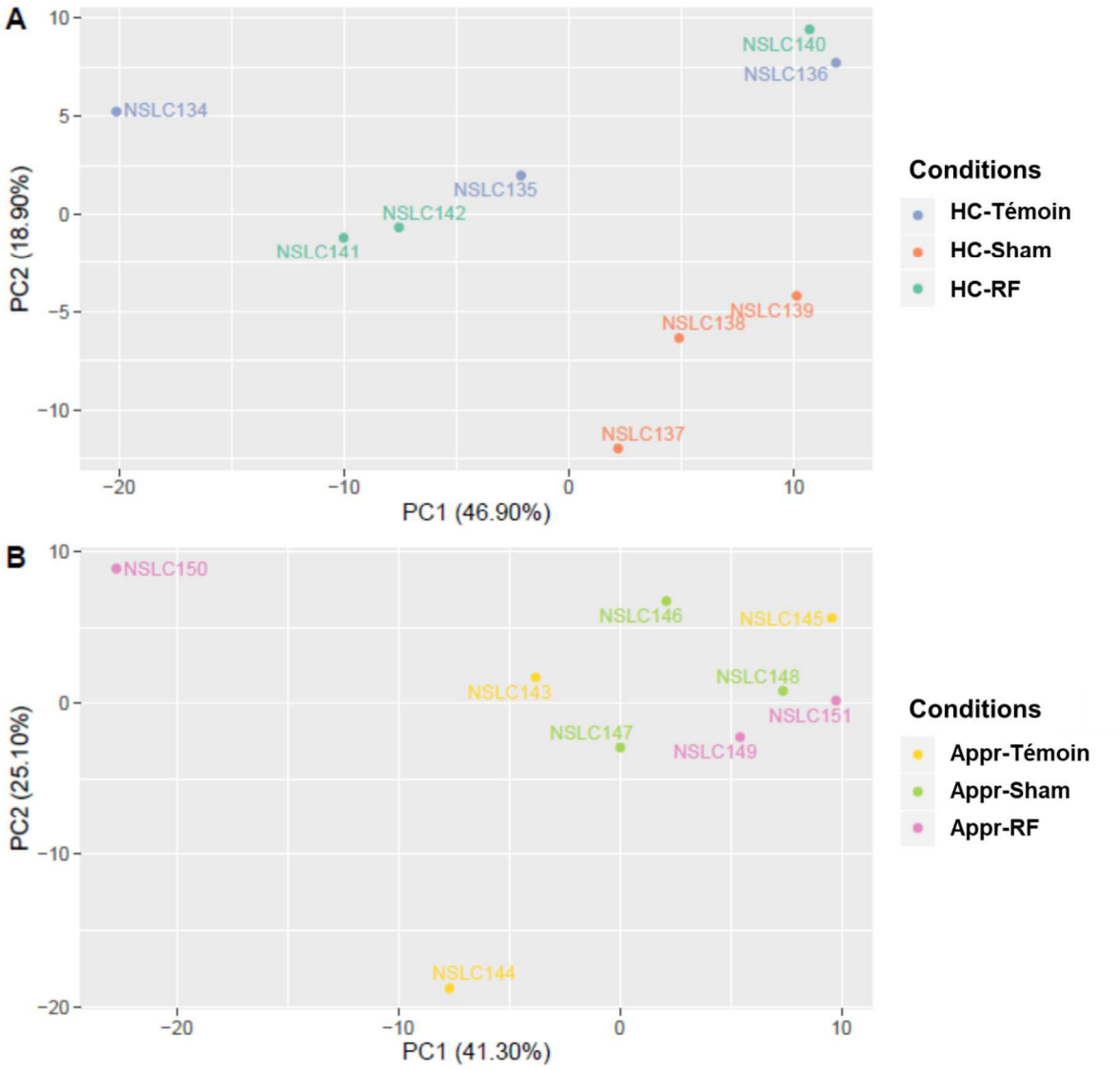


Figure 61 : Analyse des composantes principales (Principal Component ou PC) pour le groupe "HC" (A) et "Appr" (B), pour les échantillons du CPFm en condition 1.

L'analyse différentielle, réalisée sur tous les échantillons, montre un nombre de gènes modulés assez homogène au sein de chaque groupe (Tableau 8). Notons que le dendrogramme (Figure 60) montre déjà une signature dans les données de distance entre les groupes "Apprentissage" par rapport à "Basal" et ceci est en cohérence avec le grand nombre de gènes modulés par l'apprentissage dans chacun des 3 groupes (Effet de l'apprentissage).

	Comparaison	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Basal	HC-Sham vs HC-Témoin	121	165	286
	HC-RF vs HC-Témoin	24	1	25
	HC-RF vs HC-Sham	123	84	207
Pendant l'apprentissage	Appr-Sham vs Appr-Témoin	27	1	28
	Appr-RF vs Appr-Témoin	1	0	1
	Appr-RF vs Appr-Sham	4	164	168
Effet de l'apprentissage	Appr-Témoin vs HC-Témoin	2013	774	2787
	Appr-Sham vs HC-Sham	3417	2029	5446
	Appr-RF vs HC-RF	1265	488	1753

Tableau 8 : Nombre de gènes significativement modulés dans le CPFm sur 18 échantillons.
Les critères de significativité sont un Log2(FC)>0 pour les gènes surexprimés et un Log2(FC)<0 pour les gènes sous-exprimés et p<0,05 comme seuil de significativité.

Ces données sont retrouvées dans le rapport S17038 (Annexe 10).

Nous établissons ici le même cut-off que pour l'analyse dans l'hippocampe dorsal : |log2 FC| > 0,5 et *p-value* ajustée > 0,01. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

	Comparaison	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Basal	HC-Sham vs HC-Témoin	52	34	86
	HC-RF vs HC-Témoin	1	0	1
	HC-RF vs HC-Sham	47	33	80
Pendant l'apprentissage	Appr-Sham vs Appr-Témoin	6	1	7
	Appr-RF vs Appr-Témoin	0	0	0
	Appr-RF vs Appr-Sham	2	55	57
Effet de l'apprentissage	Appr-Témoin vs HC-Témoin	1134	157	1291
	Appr-Sham vs HC-Sham	2068	656	2724
	Appr-RF vs HC-RF	522	173	697

Tableau 9 : Nombre de gènes significativement modulés dans le CPFm sur 18 échantillons.
Les critères de significativité sont un Log2(FC)>0,5 pour gènes surexprimés et un Log2(FC)<-0,5 pour les gènes sous-exprimés et p<0,01.

Effet des RF en "Basal"

Basal (HC)	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Sham *vs* Témoin	52	34	86
RF *vs* Témoin	**1**	**0**	**1**
RF *vs* Sham	**47**	**33**	**80**

Tableau 10 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm, en condition "Basal".

Dans cette condition, l'effet des RF est recherché 6 jours après la fin de l'exposition aux RF. L'analyse statistique montre que **80 gènes sont significativement modulés** dans la comparaison "RF *vs* Sham". L'analyse des clusters par STRING, pour les **47 gènes surexprimés** (Figure 62), montre des gènes très différents avec un seul regroupement fonctionnel, myélinisation (4 gènes, *p-value* = 0,0098). Ce regroupement n'est pas retrouvé lorsque les données sont analysées avec DAVID.

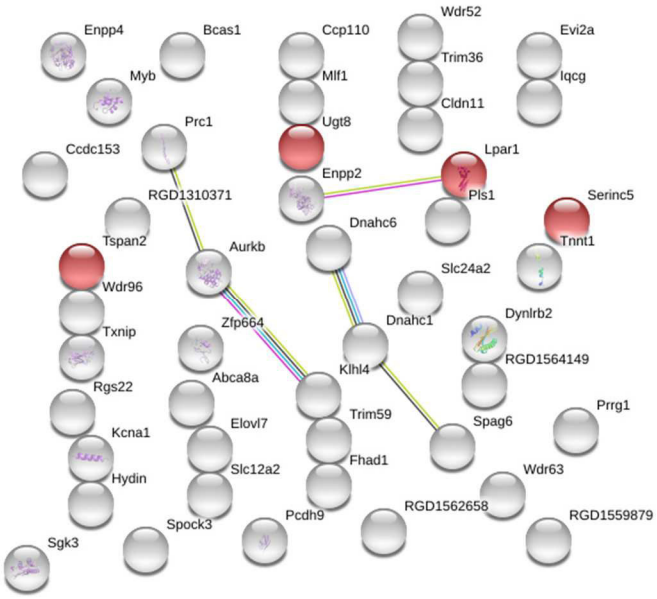


Figure 62 : Relation fonctionnelle entre les 47 gènes surexprimés pour la comparaison "RF vs Sham" en "Basal".
Le seul regroupement de gènes est "myélinisation (4)".

L'analyse des clusters par STRING, pour les **33 gènes sous-exprimés** (Figure 63) montre un cluster en lien avec le collagène et les molécules d'adhésion (*p-value* = 0,0078). Ces regroupements fonctionnels ne sont pas retrouvés en utilisant DAVID.

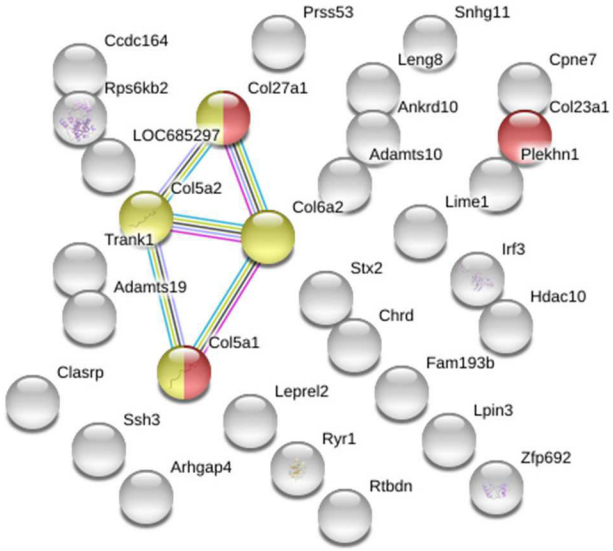


Figure 63 : Relation fonctionnelle entre des 33 gènes sous-exprimés pour la comparaison "RF vs Sham" en condition "Basal".
Le cluster regroupe les molécules de collagène : "trimère de collagène (3)" et "adhésion (4)".

Dans la comparaison "RF *vs* Témoin", on ne trouve qu'un gène surexprimé, le gène *Tnnt1* (*troponin T1, slow skeletal type*) avec un FC de 0,65 et une *p-value* de 0,009.

Cependant, dans la comparaison "Sham *vs* Témoin", 86 gènes sont dérégulés, dont **52 gènes surexprimés** (Tableau 10). Leur analyse avec STRING montre que ce sont des gènes très différents avec peu de regroupements fonctionnels (6, avec une faible *p-value* > 0,01). Ces regroupements sont en lien avec le collagène et l'adhésion. L'analyse réalisée avec DAVID, quant à elle, ne donne pas de regroupement fonctionnel pour ces gènes.

L'analyse des **33 gènes sous-exprimés** avec STRING dans la comparaison "Sham *vs* Témoin", montre plusieurs regroupements de gènes en lien avec la synapse, la communication cellulaire et la membrane plasmique, dont l'importance est variable (soit une *p-value* comprise entre 0,01 et $1E^{-7}$).

Il faut noter que les gènes surexprimés dans la comparaison "HC-Sham *vs* HC-Témoin" et les gènes sous-exprimés de la comparaison "HC-RF *vs* HC-Sham" forment les mêmes clusters ("collagène" et "adhésion"). Ces listes de gènes ont été comparées entre elles (Figure 64) à l'aide de Venny-BioinfoGP (v2.1.0, http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/).

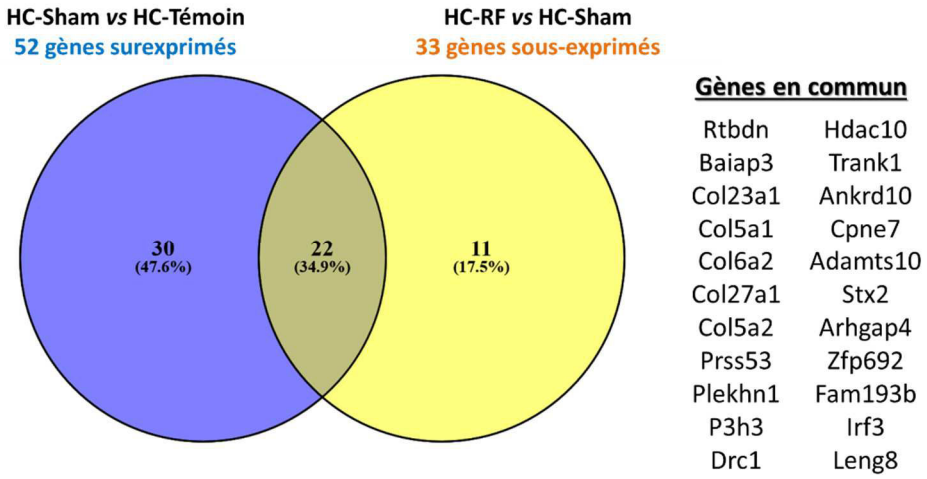


Figure 64 : Comparaison entre les 52 gènes surexprimés ("HC-Sham vs HC-Témoin") et les 33 gènes sous-exprimés ("HC-RF vs HC-Sham").

En condition "Basal" (sans apprentissage), la comparaison entre ces deux listes de gènes met en évidence que 22 gènes en lien avec le collagène sont communs aux deux groupes (donc le FC en compris entre 0,7 et 1 et p-value entre 0,001 et $4{,}2e^{-8}$). Il semblerait que l'expression de ce groupe de gènes (en lien avec le collagène) soit up-régulé chez les rats Sham par rapport aux 2 autres groupes. De plus, un seul gène est modulé dans la comparaison "RF vs Témoin", et le groupe HC-Témoin semble plus proche du groupe HC-RF que du groupe HC- Sham.

Effet des RF pendant l'apprentissage (Appr)

Apprentissage (Appr)	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Sham vs Témoin	6	1	7
RF vs. Témoin	**0**	**0**	**0**
RF vs. Sham	**2**	**55**	**57**

Tableau 11 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm, pendant l'apprentissage.

Il n'y a pas de gènes modulés dans la comparaison "RF *vs* Témoin". Dans la comparaison "RF *vs* Sham", l'analyse statistique montre **57 gènes modulés** (Tableau 11) dont **2 gènes significativement surexprimés** (Tableau 12). Ces deux gènes différents ont un log2 (FC) faible, montrant une faible induction de ces gènes.

Gènes surexprimés		Description	Log2(FC)	p-value ajustée
Appr-RF *vs* Appr-Sham	Ap1s3	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit	0,77547805	0,00140212
	Tor1aip2	torsin 1A interacting protein 2	0,555427	0,00073976

Tableau 12 : Tableau des gènes surexprimés pendant l'apprentissage pour la comparaison "Appr-RF vs Appr-Sham".

En ce qui concerne les gènes moins exprimés chez les RF par rapport aux Sham, nous avons obtenu **55 gènes significativement sous-exprimés**. L'analyse fonctionnelle réalisée avec STRING (Figure 65) montre des gènes très différents les uns des autres, qui ne se regroupent pas fonctionnellement. Aucun regroupement n'est retrouvé avec DAVID non plus.

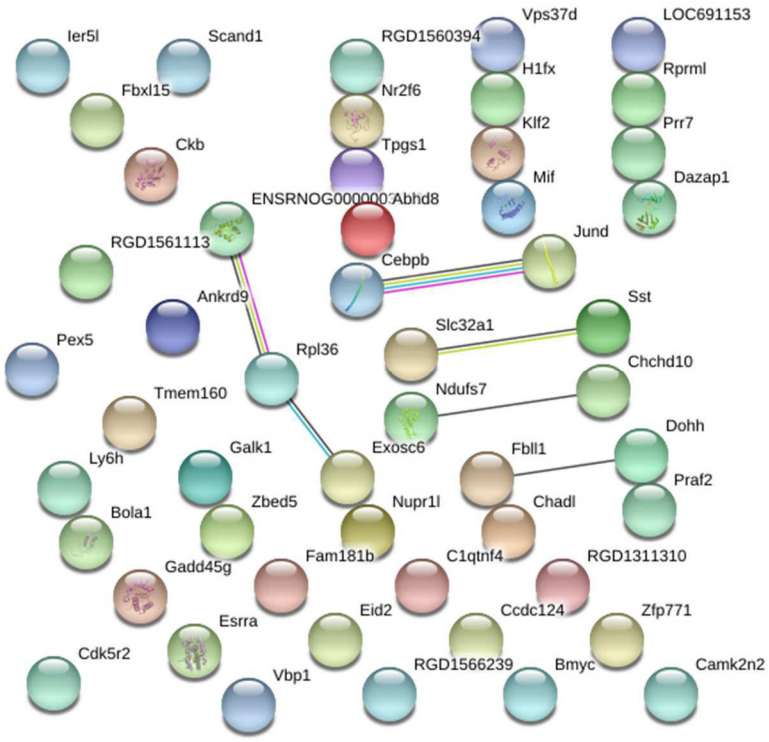


Figure 65 : Relation fonctionnelle entre les 55 gènes sous-exprimés pour la comparaison "RF vs Sham" pendant l'apprentissage.

La recherche de gènes communs entre les comparaisons "RF *vs* Sham" pour les deux conditions ("Basal" et "Apprentissage") sur les gènes sous-exprimés ne met en évidence aucun gène commun (Figure 66). L'analyse des effets des RF pendant l'apprentissage montre une baisse de l'expression de certains gènes, très différents les uns des autres et non regroupés fonctionnellement. Il pourrait s'agir de gènes non spécifiques et nous avons vérifié la modulation de ces gènes sur un plus grand nombre d'échantillons par RT-qPCR lors des validations.

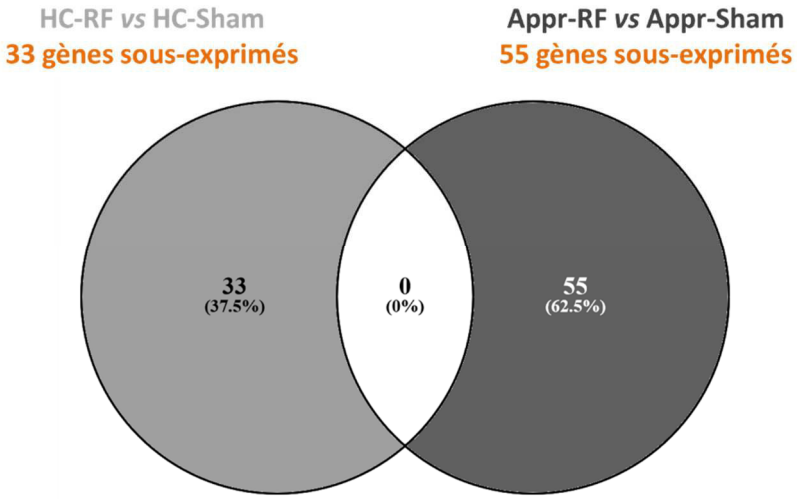


Figure 66 : Comparaison entre les 33 gènes sous-exprimés (HC-RF vs HC-Sham) et les 55 gènes sous-exprimés (Appr-RF vs Appr-Sham).

La comparaison "RF vs Sham" met en évidence 2 gènes surexprimés et 55 gènes sous-exprimés chez les RF, après 3 jours d'apprentissage. Ces 55 gènes ne forment pas de regroupements fonctionnels et sont différents les uns des autres.

L'étude de l'expression des gènes dans le CPFm en condition basale montre que 80 gènes sont modulés par les RF (par comparaison avec les Sham). Cependant, nous avons noté que la majorité des gènes sous-exprimés sont communs avec les gènes surexprimés de la comparaison Sham vs Témoin et donc que ces gènes seraient en fait surexprimés chez les Sham par rapport aux deux autres groupes. Il est difficile de conclure sur ces gènes, dont le |log2 (FC)| est important (0,7 à 1). Il est possible qu'ils soient induits par le fait de mettre les rats dans la chambre d'exposition et que l'exposition en elle-même induise leur répression. Cependant, on note que ceci ne se retrouve pas en condition d'apprentissage. Pour les gènes surexprimés, le seul groupement "myélination" est peu significatif.

L'étude de l'expression des gènes pendant un apprentissage montre une diminution de 55 gènes chez les RF par rapport aux Sham. Cependant, ces gènes sont très différents les uns des autres et ne constituent pas de groupement fonctionnel. De plus, ces gènes sont différents de ceux modulés dans la condition basale (Figure 66).

I.1.1.6. Effet des RF à long terme (condition 2 : LT)

Nous avons 3 échantillons par groupe expérimental : LT-HC-Témoin n° 1 à 3, LT-HC-Sham n° 4 à 6, LT-HC-RF n° 7 à 9, LT-Appr-Témoin n° 10-12, LT-Appr-Sham n° 13 à 15 et LT-Appr-RF n° 16 à 18.

L'analyse de "**la distance entre les échantillons"**, représentée sur la Figure 67, basée sur l'expression de l'ensemble des gènes montre que les groupes des différentes conditions sont plutôt mélangés. On ne retrouve pas deux groupes distincts en fonction de l'apprentissage non plus. Notons que celui-ci a eu lieu 25 jours avant l'euthanasie des rats.

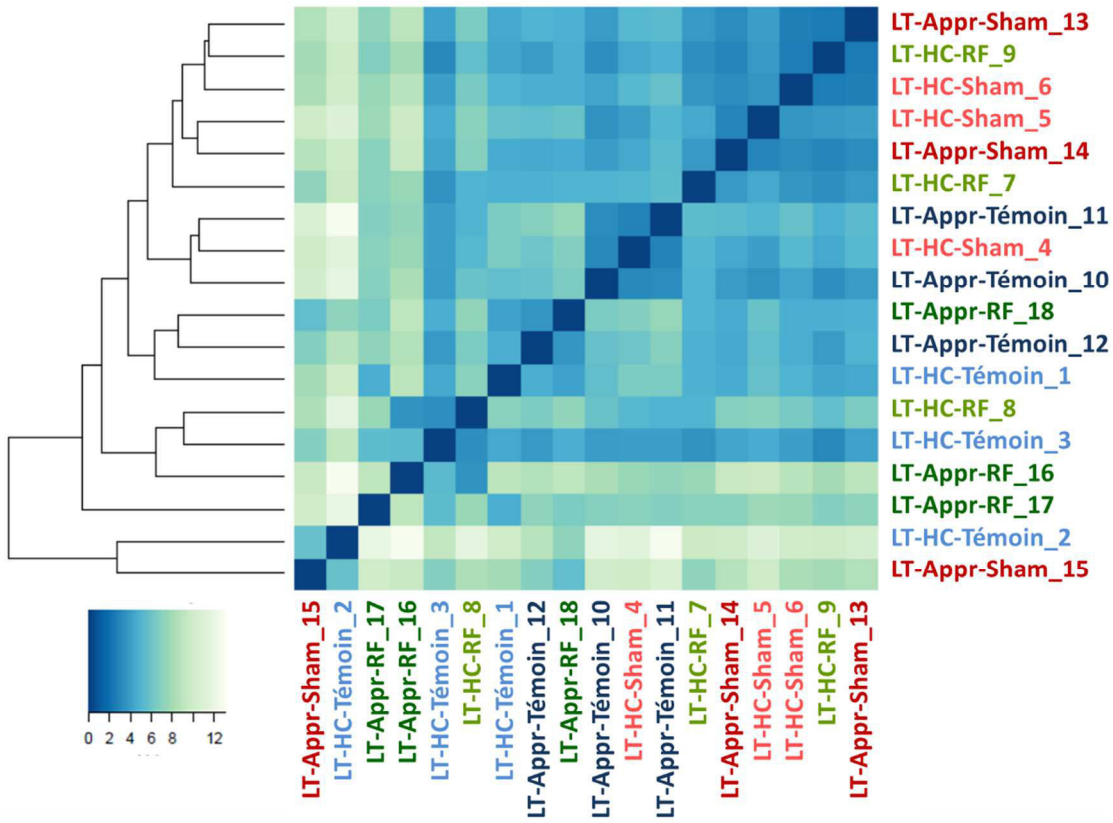


Figure 67 : Dendrogramme représentant la distance entre les échantillons au sein du CPFm en condition 2 (long terme).

L'analyse des PC confirme le regroupement des échantillons indépendamment des groupes et montre une homogénéité globale (Figure 68).

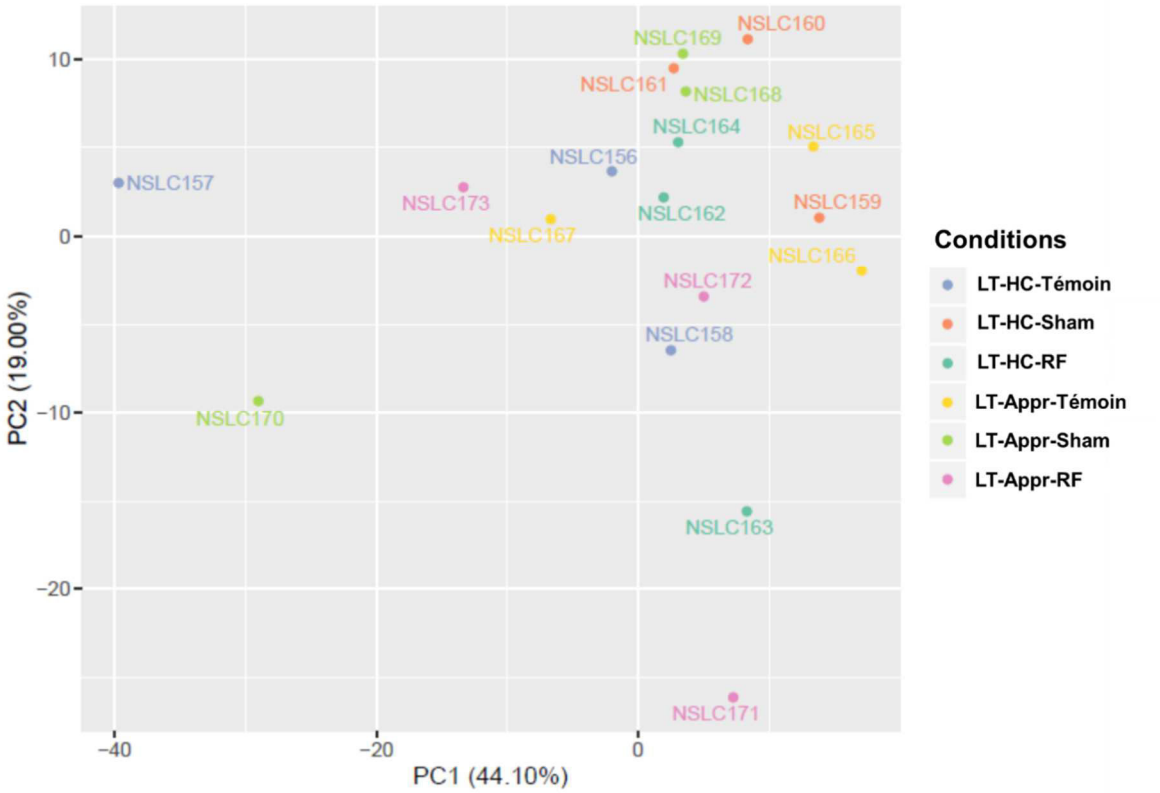


Figure 68 : Analyse des composantes principales (Principal Component ou PC) pour les échantillons du CPFm en condition 2 (long terme).

Les résultats de l'analyse différentielle de ces 18 échantillons pour le CPFm, issus du rapport du bio-informaticien, montrent très peu de gènes modulés. (Tableau 13).

Ces données sont retrouvées dans le rapport S17356 (Annexe 11).

	Comparaison	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Basal	LT-HC-Sham *vs* LT-HC-Témoin	322	12	334
	LT-HC-RF *vs* LT-HC-Témoin	0	0	0
	LT-HC-RF *vs* LT-HC-Sham	8	15	23
Après l'apprentissage	LT-Appr-Sham *vs* LT-Appr-Témoin	26	0	26
	LT-Appr-RF *vs* LT-Appr-Témoin	0	15	15
	LT-Appr-RF *vs* LT-Appr-Sham	1	443	444
Persistance du souvenir	LT-Appr-Témoin *vs* LT-HC-Témoin	0	0	0
	LT-Appr-Sham *vs* LT-HC-Sham	1	0	1
	LT-Appr-RF *vs* LT-HC-RF	1	36	37

Tableau 13 : Nombre de gènes significativement modulés sur 18 échantillons du CPFm en condition 2 (long terme).
Les critères de significativité sont un Log2(FC) > 0 pour les gènes surexprimés et un Log2(FC) < 0 pour les gènes sous-exprimés et p<0,05 comme seuil de significativité.

Après analyse des PC et concertation avec le bio-informaticien, nous avons décidé d'enlever 3 échantillons (LT-HC-Témoin_2 [NSCL157], LT-Appr-Sham_15 [NSCL170] et LT-Appr-RF_18 [NSCL173]) qui étaient très différents des autres et impactaient les analyses statistiques mais pas le nombre de gènes modulés.

Nous avons donc gardé 15 échantillons avec le même *cut-off* : |log2 FC| > 0,5 et *p-value* ajustée >0,01. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

	Comparaison	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Basal	LT-HC-Sham *vs* LT-HC-Témoin	106	2	108
	LT-HC-RF *vs* LT-HC-Témoin	0	0	0
	LT-HC-RF *vs* LT-HC-Sham	0	1	1
Après l'apprentissage	LT-Appr-Sham *vs* LT-Appr-Témoin	12	0	12
	LT-Appr-RF *vs* LT-Appr-Témoin	0	6	6
	LT-Appr-RF *vs* LT-Appr-Sham	0	261	261
Persistance du souvenir	LT-Appr-Témoin *vs* LT-HC-Témoin	0	0	0
	LT-Appr-Sham *vs* LT-HC-Sham	1	0	1
	LT-Appr-RF *vs* LT-HC-RF	0	5	5

Tableau 14 : Nombre de gènes significativement modulés sur 15 échantillons du CPFm en condition 2 (long terme).
Les critères de significativité sont un Log2(FC) > 0,5 pour les gènes surexprimés et un Log2(FC) < -0,5 pour les gènes sous-exprimés et p < 0,01 comme seuil de significativité.

Effet des RF à long terme en basal (LT-HC)

Dans cette condition, l'effet des RF est recherché 33 jours (équivalent aux 8 jours de piscine + 25 jours post-apprentissage de la condition Appr) après la fin de l'exposition aux RF.

Basal (LT-HC)	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Sham *vs* Témoin	106	2	108
RF *vs* Témoin	**0**	**0**	**0**
RF *vs* Sham	**0**	**1**	**1**

Tableau 15 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm, en basal (persistance des effets des RF).

La comparaison "RF *vs* Témoin" ne met en évidence aucun gène modulé et la comparaison "RF *vs* Sham" ne montre qu'un **seul gène sous-exprimé** : le gène *Rn60_1_2212.3* (log2(FC) = 0,8344 et *p-value* = 7,55e^{-6}).

On notera, pour la comparaison Sham *vs* Témoin, **108 gènes significativement modulés** : **106 gènes surexprimés**, **2 gènes sous-exprimés** et aucun pour la comparaison RF *vs* Témoin (Tableau 14).

L'analyse par STRING des **106 gènes surexprimés** donne plusieurs clusters regroupant des gènes en lien avec la synapse, les jonctions cellulaires et la membrane plasmatique. Ces clusters sont importants avec une *p-value* comprise entre 10^{-2} et 10^{-6}.

La comparaison entre les RF et Sham ne montre qu'un **seul gène sous-exprimé**. Le gène *Rn60_1_2212.3* donc le log2(FC) est égal à 0,8344 et la p-value à 7,55e^{-6}.

L'étude de l'effet des RF en "Basal" (vs Sham), plus d'un mois après l'arrêt de l'exposition, ne montre qu'un seul gène modulé. Nous noterons que l'analyse statistique montre en revanche une centaine de gènes modulés chez les Sham par rapport au groupe Témoin.

Effet des RF après un apprentissage (LT-Appr)

Apprentissage (LT-Appr)	Gènes significativement surexprimés	Gènes significativement sous-exprimés	Gènes significativement modulés
Sham *vs* Témoin	12	0	12
RF *vs* Témoin	**0**	**6**	**6**
RF *vs* Sham	**0**	**261**	**261**

Tableau 16 : Tableau des gènes modulés, dans le CPFm (effet des RF à long terme après un apprentissage).

La comparaison "RF *vs* Sham" met en évidence **261 gènes sous-exprimés** et aucun gène surexprimé chez les RF. Ces gènes sous-exprimés sont regroupés en plusieurs clusters tels que "synapse" (*p-value* = 1,26E^{-5}), "partie de la synapse" (*p-value* = 6,22E^{-6}), "neurone" (*p-value* = 8E^{-5}), ou encore "la voie de la phosphorylation oxydative" (*p-value* = 4,49E^{-10}).

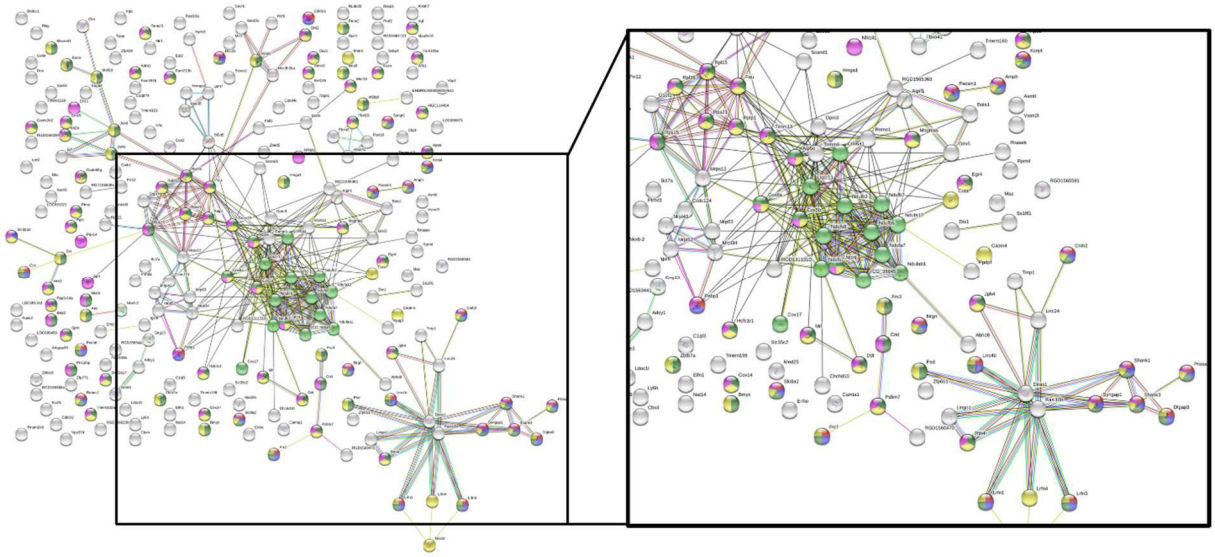


Figure 69 : Relation fonctionnelle entre les 261 gènes sous-exprimés pour la comparaison "RF vs Sham" (effets à long terme après l'apprentissage).
Les clusters principaux sont "synapse (23)", "composants cellulaires (85)", "partie de la synapse (22)", "cytoplasme (68)", et "partie de la cellule (84)", ainsi que "la voie de la phosphorylation oxydative (16)" répartis en 3 noyaux.

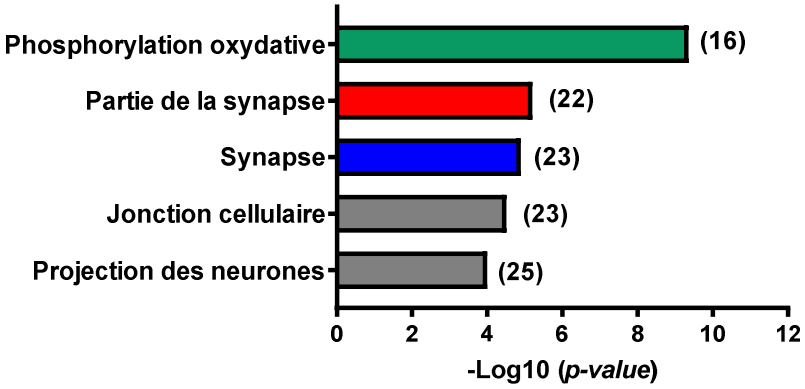


Figure 70 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 261 gènes sous-exprimés issus de la comparaison "RF vs Sham".

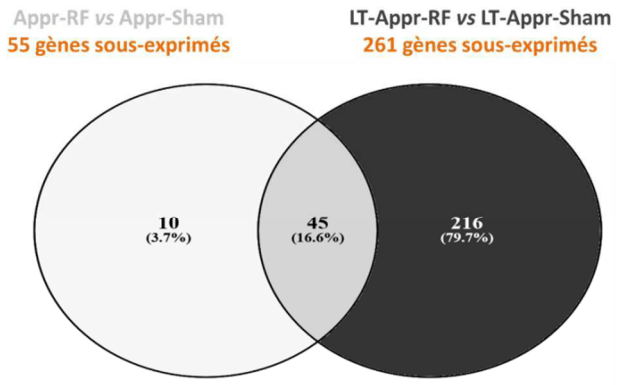
L'analyse fonctionnelle réalisée par DAVID est en accord avec les clusters trouvés par STRING (Figure 70) avec un cluster regroupant des gènes en lien avec l'oxydation et le cytoplasme, et également un cluster regroupant des gènes mitochondriaux.

L'analyse statistique montre **6 gènes sous-exprimés** très différents (n'appartiennent pas à une seule et même famille) pour la comparaison "RF *vs* Témoin" (Tableau 17).

Gènes sous-exprimés		Description	Log2(FC)	p-value ajustée
LT-Appr-RF *vs* LT-Appr-Témoin	Cdk5r2	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39)	-0,90255704	0,00130105
	RGD1563441	similar to RIKEN cDNA A030009H04	-0,98177877	0,00174947
	Mif	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	-0,97008933	0,00174947
	Junb	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	-1,01005194	0,00254138
	Camk2n2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2	-1,00932163	0,00307904
	Tomm6	translocase of outer mitochondrial membrane 6	-0,88100646	0,00307904

Tableau 17 : Tableau des gènes sous-exprimés après un apprentissage (effets à long terme) pour la comparaison "RF vs Témoin".

Afin de vérifier si les gènes sous-exprimés lors de l'apprentissage (3 jours en piscine de Morris) le sont toujours lors de la persistance d'un souvenir, nous avons comparé les **55 gènes sous-exprimés** dans la condition apprentissage et les **261 gènes sous-exprimés** dans la condition à long terme (persistance) (Figure 71).



Gènes en commun

rgd1560394	rprml	rpl36
loc103690091	fbxl15	tmem160
bmyc	eid2	vps37d
loc691153	ier5l	praf2
scand1	rgd1564664	ly6h
c1qtnf4	vbp1	fbll1
ac109096.1	cdk5r2	esrra
ankrd9	rgd1561113	dohh
bola1	zbed5	abhd8
fam181b	gadd45g	sst
h1fx	jund	smdt1
mif	rgd1566239	ckb
prr7	loc103694872	slc32a1
zfp771	ndufs7	ccdc124
tpgs1	ac120246.2	galk1

Figure 71 : Comparaison entre les 55 gènes sous-exprimés (Appr-RF vs Appr-Sham) et 261 gènes sous-exprimés (LT-Appr-RF vs LT-Appr-Sham).

La comparaison entre les deux conditions pour les gènes sous-exprimés met en évidence 45 gènes en commun, c'est-à-dire que ces gènes sont dérégulés par les RF à 3 jours d'apprentissage et le restent même après 25 jours de consolidation du souvenir. Ces gènes sont différents les uns des autres et ne sont pas regroupés par l'analyse fonctionnelle.

L'étude de l'effet des RF sur le long terme montre principalement des gènes sous-exprimés dans les conditions où les rats ont eu un apprentissage auparavant. Leur analyse fonctionnelle révèle qu'ils appartiennent à différents clusters en lien avec "la synapse" et la "phosphorylation oxydative". Quarante-cinq d'entre eux étaient déjà sous-exprimés 6 jours après l'exposition aux RF, lorsque les rats étaient en cours d'apprentissage (mais pas dans la condition "Basal").

L'étude de l'effet des RF sur le long terme en basal (soit 33 jours après l'arrêt de l'exposition, vs Sham), ne montre aucun impact de ces dernières sur l'expression des gènes. Les effets visualisés dans le CPFm en basal (3 jours après la fin des expositions) ne sont pas retrouvés un mois plus tard, laissant supposer un effet des RF (s'il est validé) court et non persistant dans le temps.

L'étude de l'effet des RF (vs Sham) sur le long terme après un apprentissage laisse apparaître un grand nombre de gènes sous-exprimés (261 gènes) en lien avec la synapse, la cellule et la phosphorylation oxydative. Parmi ces gènes sous-exprimés, 45 gènes l'étaient déjà au moment de l'apprentissage.

La validation de certains gènes par RT-qPCR sur un plus grand nombre d'échantillons (n = 6) est réalisée dans l'hippocampe dorsal et le CPFm.

I.1.3. Bilan et sélection de gènes

Afin de valider l'impact de l'exposition aux RF sur l'expression des gènes, nous avons réalisé des RT-qPCR sur un nombre d'échantillons plus important : n = 6 rats par groupe (contre n = 3 pour le séquençage d'ARN). Pour cela nous avons pré-sélectionné des gènes selon différents critères :

- Gènes dont le log2(FC) est très élevé (surexprimé) ou très faible (sous-exprimé),
- Gènes appartenant à un groupe fonctionnel avec un *p-value* très significatif (< $10E^{-4}$)
- Gènes décrits dans la littérature des RF
- Gènes décrits dans l'apprentissage et la mémoire

I.1.1.7. Sélection des gènes à valider dans l'Hip dorsal

Les gènes pré-sélectionnés pour la validation par RT-qPCR dans l'Hip dorsal sont résumés dans le Tableau 18A. Puis, pour rappel, nous avons dessiné les amorces grâce à primer 3 et IDT (site en ligne) afin d'obtenir le meilleur couple d'amorces possible. Ces amorces sont testées *in silico* sur le site *UCSC-in Silico PCR*. Avec ces résultats et malgré des essais avec d'autres couples d'amorces proposés, nous avons dû éliminer quelques amorces qui ne donnaient aucun amplicon "virtuel", ou au contraire qui n'étaient pas spécifiques et donnaient plusieurs amplicons sur des chromosomes différents. Les amorces restantes ont été commandées et testées en RT-qPCR sur des gammes de dilution, afin de vérifier leur spécificité et l'absence de dimères d'amorces lors de l'amplification.

A la suite de ces tests et en considérant les amorces déjà éliminées à l'étape précédente, nous avons sélectionné **21 gènes à tester sur l'hippocampe dorsal**, afin de valider les résultats de séquençage (Tableau 18B) sur l'intégralité des échantillons (n = 6-8/groupe) et pour tous les groupes d'âge.

A

Gènes	Description	Sélection	Log2(-FC)	P-value	Groupement fonctionnel
Pol II	RNA polymerase II	Référence	/	/	/
36B4	ribosomal protein lateral stalk subunit P0	Référence	/	/	/
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	Gène précoce	1,099	0,0010	/
Arc	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Gène précoce	0,997	0,0003	/
Egr1	early growth response 1	Gène précoce	0,582	0,0016	/
Prkca	protein kinase C, alpha	Apprentissage	-1,0112	0,0023	/
Ppp1r9a	protein phosphatase 1, regulatory subunit 9A	Apprentissage	-1,3509	0,0001	/
Med1	mediator complex subunit 1	Apprentissage	-1,0663	$1,64E^{-5}$	/
Grm7	glutamate metabotropic receptor 7	Apprentissage	-0,7320	0,0007	/
Nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	Apprentissage	-1,4148	0,0001	/
Gria1	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1	Apprentissage	-0,7553	0,0082	/
Atp1a2	ATPase Na+/K+ transporting subunit alpha 2	Stress	/	/	/
Aif1/Iba1	allograft inflammatory factor 1	Inflammation	/	/	/
Junb	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	Induit (Basal)	0,5459	0,0163	Processus biologiques
Rpl36	ribosomal protein L36	Induit (Basal)	1,2699	$2,312E^{-6}$	Traduction / Ribosome
Hspb1	heat shock protein family B (small) member 1	Induit (Basal)	0,8899	0,0031	Processus biologiques
Bmyc	brain expressed myelocytomatosis oncogene	Induit (Basal)	0,7883	0,0076	Processus biologiques
Nxph3	neurexophilin 3	Induit (Appr)	1,7768	$1,43E^{-14}$	/
Mif	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Induit (Basal)	0,9562	0,0002	Processus biologiques
Gpx1	glutathione peroxidase 1	Induit (Basal)	0,5710	0,0031	Processus métaboliques
Nrgn	neurogranin	Induit (Basal)	0,6117	0,0014	/
Atp2a3	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ transporting 3	Induit (Basal)	1,0823	$9,89E^{-5}$	/
Dnah6	dynein, axonemal, heavy chain 6	Réprimé (Basal)	-0,7342	0,0094	Dynéine
Dnah12	dynein, axonemal, heavy chain 12	Réprimé (Basal)	-1,0597	$5,98E^{-5}$	Dynéine
Abca5	ATP binding cassette subfamily A member 5	Réprimé (Basal)	-0,6859	0,0080	/

B

Gènes définitivement sélectionnés	
Nxph3	Dnah6
Gpx1	Dnah12
JunB	Drc1
Atp2a3	CKB
Kif3a	Bmyc
Abca5	Egr1
Gria1	C-fos
Ppp1r9a	Iba1
Med1	Pol II
Gfap	36B4
Atp1a2	

Tableau 18 : Gènes pré-sélectionnés (A) et définitivement sélectionnés (B) pour les validations par RT-qPCR dans l'hippocampe dorsal.

I.1.1.8. Sélection des gènes à valider dans le CPFm

Effet des RF en conditions "Basal" et "Apprentissage"

Les gènes pré-sélectionnés pour la validation par RT-qPCR dans le CPFm à l'issue des résultats du RNA Seq sont résumés dans le Tableau 19A. La sélection définitive est réalisée de la même manière que pour l'Hip dorsal.

A la suite de ces tests et en considérant les amorces déjà éliminées à l'étape précédente, nous avons sélectionné **21 gènes à tester sur le CPFm**, afin de valider les résultats de séquençage (Tableau 19B) sur l'intégralité des échantillons (n = 6-8/groupe) et pour tous les groupes d'âge.

A

Gènes	Description	Sélection (condition)	Log2 (-FC)	P-value	Groupement fonctionnel
Pol II	RNA polymerase II	Référence	/	/	/
36B4	ribosomal protein lateral stalk subunit P0	Référence	/	/	/
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	Gène précoce	1,8914	$8,29E^{-11}$	/
Arc	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Gène précoce	1,5434	$1,87E^{-7}$	/
Egr1	early growth response 1	Gène précoce	1,1281	$2,88E^{-7}$	/
Atp1a2	ATPase Na+/K+ transporting subunit alpha 2	Stress	/	/	/
Aif1/Iba1	allograft inflammatory factor 1	Inflammation	/	/	/
Kif5b	kinesin family member 5B	Apprentissage	-0,6434	0,0125	/
Dnah6	dyncin, axonemal, heavy chain 6	Induit (Basal)	0,7786	0,0005	/
Dnah12	dynein, axonemal, heavy chain 12	Induit (Basal)	0,7569	0,0005	/
Sgk3	serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3	Induit (Basal)	0,6836	0,0010	/
Tor1aip2	torsin 1A interacting protein 2	Induit (Appr)	0,5554	0,0007	/
Tspan2	tetraspanin 2	Induit (Basal)	0,6768	0,0009	/
Ugt8	UDP glycosyltransferase 8	Induit (Basal)	0,7920	$7,89E^{-5}$	Myélination
Mif	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Réprimé (Appr)	-0,7837	0,0002	/
Bmyc	brain expressed myelocytomatosis oncogene	Réprimé (Appr)	-0,8828	0,0003	/
Drc1	dynein regulatory complex subunit 1	Réprimé (Basal)	-0,5730	0,0006	/
Ckb	creatine kinase B	Réprimé (Appr)	-0,5601	0,0016	/
Hdac10	histone deacetylase 10	Réprimé (Basal)	-0,6344	0,0006	/
Adamts10	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 10	Réprimé (Basal)	-0,5570	0,0077	/
Col5a2	collagen, type V, alpha 2	Réprimé (Basal)	-0,5609	0,0015	Collagène /Adhésion
Col23a1	collagen, type XXII, alpha 1	Réprimé (Basal)	-0,7567	$7,78E^{-5}$	Collagène
Col27a1	collagen, type XXVII, alpha 1	Réprimé (Basal)	-0,9155	$4,16E^{-8}$	Collagène /Adhésion
Jund	JunD proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	Réprimé (Appr)	-0,6799	0,0006	/
Camk2n2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2	Réprimé (Appr)	-0,9343	0,0002	/

B

Gènes définitivement sélectionnés	
Ugt8	Dnah6
Sgk3	Dnah12
Tspan2	Drc1
Tor1aip2	CKB
Hdac10	Bmyc
AdamTS10	Egr1
Col5a2	C-fos
Col27a1	Iba1
Camk2n2	Pol II
JunD	36B4
Atp1a2	

Tableau 19 : Gènes pré-sélectionnés (A) et définitivement sélectionnés (B) pour les validations par RT-qPCR dans le CPFm en conditions "Basal" et "Apprentissage".

Effet des RF à long terme :

Pour les effets des RF sur le long terme, nous avons concentré nos validations sur les gènes modulés 3 jours après la fin de l'exposition (condition 1 : HC et Appr) et qui le restaient plus de 30 jours après (condition 2 : LT-HC et LT-Appr). Avec ces critères, nous obtenons 8 gènes réprimés dans les deux conditions (Tableau 20) sur l'intégralité des échantillons (n = 6/groupe) chez les "Adultes" et les "Ados".

Gènes	Description	Sélection	Log2(-FC)	P-value	Groupement fonctionnel
Pol II	RNA polymerase II	Référence	/	/	/
36B4	ribosomal protein lateral stalk subunit P0	Référence	/	/	/
Junb	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	Réprimé (Persist)	-1,7437	$2{,}30E^{-8}$	Cellule
Camk2n2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2	Réprimé (Persist)	-2,0296	$5{,}94E^{-11}$	Cellule
Ckb	creatine kinase B	Réprimé (Persist)	-1,0714	$6{,}67E^{-5}$	Membrane
Tomm6	translocase of outer mitochondrial membrane 6	Réprimé (Persist)	-1,5838	$3{,}82E^{-11}$	/
Bmyc	brain expressed myelocytomatosis oncogene	Réprimé (Persist)	-1,7876	$3{,}02E^{-9}$	Cellule
Mif	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Réprimé (Persist)	-1,9879	$4{,}33E^{-17}$	Cellule
C1qtnf4	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	Réprimé (Persist)	-1,8448	$3{,}35E^{-11}$	/
Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	Réprimé (Persist)	-1,3250	0,0001	Cellule

Tableau 20 : Gènes définitivement sélectionnés pour les validations par RT-qPCR dans le CPFm en condition 2 (effets à long terme).

I.2. Validation par RT-qPCR dans le groupe des "Adultes"

Les validations par RT-qPCR sont réalisées sur l'intégralité des 6 groupes expérimentaux (HC-[Témoin, Sham, RF] et Appr-[Témoin, Sham, RF]) pour tous les gènes choisis d'une part dans l'Hip dorsal et d'autre part dans le CPFm. Ainsi, nous obtenons toutes les comparaisons du RNA-seq, ce qui inclut également des comparaisons pour lesquelles la modulation n'avait lieu qu'en "Basal" et non en "Appr", par exemple.

Dans cette partie, les résultats sont présentés sous forme de tableaux et/ou de graphiques incluant les résultats de l'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs : Groupe et Délai sur les résultats de RT-qPCR) et plus précisément les résultats de l'analyse post-hoc à comparaisons multiples (Newman-Keuls) symbolisés par des étoiles (*) et dièses (#). Les résultats complets de toutes les ANOVAs sont résumés dans l'Annexe 10.

I.2.1. Hippocampe dorsal

Les premiers résultats des RT-qPCR (

Figure 72) ne valident pas les effets des RF (basal et apprentissage) observés lors du séquençage d'ARN pour les gènes *Atp2a3*, *Gria1* et *Kif3a*. Cependant, tous les gènes sélectionnés Tableau 18 n'ont pu être testés par manque de tissus.

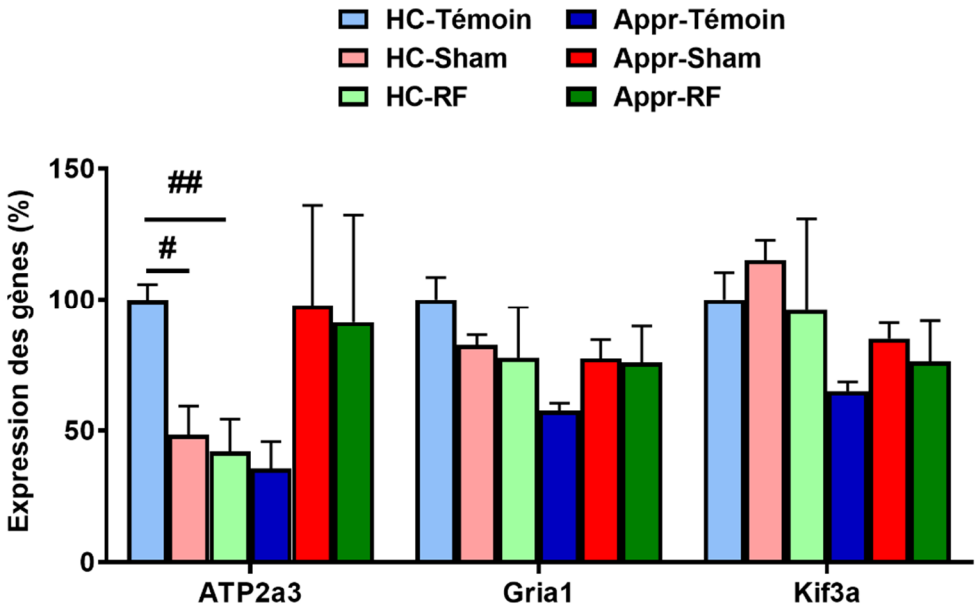


Figure 72 : Validation par RT-qPCR de gènes modulés, issus du séquençage d'ARN dans l'hippocampe dorsal (n = 6/groupe).
#p<0,05, ## p < 0,01 différence statistiquement significative entre deux groupes de la même condition expérimentale (HC).

Comme mentionné auparavant, compte-tenu de la forte hétérogénéité des résultats de séquençage rencontrée avec l'analyse du tissu hippocampique, une analyse d'un autre lot de rats (exposés pendant l'été 2018) est en cours pour augmenter le nombre d'échantillons séquencés (n=6) et fournir de nouveaux échantillons indépendants pour ces validations.

I.2.2. CPFm

I.1.1.9. Condition 1 : effet des RF en "Basal" et "Apprentissage"

Dans le CPFm, chez le groupe "Adultes", les résultats du séquençage des ARN messagers montraient des modulations de certains gènes en condition **"Basal "** (Tableau 21). Nous pouvions voir notamment une diminution de l'expression des gènes *Drc1*, *HDAC10*, *AdamTS10*, *Col5a2* et *Col27a1* et une augmentation de l'expression des gènes *Dnah6*, *Dnah12*, *Sgk3*, *Tspan2* et *UGT8* chez les RF par rapport aux Sham. Ces gènes ont été choisis pour la validation par RT-qPCR.

Pour la condition **"Apprentissage"** (Tableau 21), nous avons observé notamment une diminution de l'expression des gènes *Bmyc*, *CKB*, *JunD* et *Camk2n2* et une augmentation de l'expression de gène *Tor1aip2* chez les rats RF par rapport aux rats Sham.

Validations RT-qPCR	BASAL				APPRENTISSAGE			
	HC-RF vs HC-Témoin		HC-RF vs HC-Sham		Appr-RF vs Appr-Témoin		Appr-RF vs Appr-Sham	
Gènes	RNA-seq	"Adultes"	RNA-seq	"Adultes"	RNA-seq	"Adultes"	RNA-seq	"Adultes"
Atp1a2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Dnah6	ns	ns	***	0,96	ns	ns	ns	ns
Dnah12	*	0,98	***	0,87	ns	ns	ns	ns
Drc1	ns	ns	***	0,54	ns	ns	ns	ns
Sgk3	ns	ns	***	>0,99	ns	ns	ns	ns
Tor1aip2	ns	ns	ns	**	ns	ns	***	0,97
Tspan2	ns	ns	***	>0,99	ns	ns	ns	ns
UGT8	ns	ns	***	>0,99	ns	ns	ns	ns
Bmyc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	0,98
CKB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	>0,99
HDAC10	ns	*	***	>0,99	ns	ns	ns	ns
AdamTS10	ns	ns	**	0,97	ns	ns	ns	ns
Col5a2	ns	ns	**	0,82	ns	ns	ns	ns
Col27a1	ns	*	***	>0,99	ns	ns	ns	ns
JunD	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	>0,99
Camk2n2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	0,98
Iba1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tableau 21 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage dans le CPFm en condition "Basal (HC)" et "Apprentissage (Appr)" chez le groupe "Adultes".
*Les valeurs indiquent les valeurs des p-value pour les gènes modulés en RNA-seq. Les étoiles (*) représentent la significativité du post-hoc (Newman-Keuls) issu de l'analyse ANOVA à deux facteurs (Groupe et Délai) : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différence statistiquement significative, (ns), non-significatif. Les couleurs orange et bleu indiquent respectivement une surexpression ou une sous-expression du gène (n=3/groupe pour le RNA-seq, n=5-6/groupe pour RT-qPCR).*

Dans la comparaison "RF *vs* Sham", l'étude de l'expression de ces gènes en RT-qPCR n'a pas permis de valider les modulations obtenues en séquençage pour les gènes sélectionnés en conditions "**Basal**" comme en "**Apprentissage**" (Tableau 21).

Cependant, nous avons observé un changement d'expression non mis en évidence par le séquençage, celui du gène *Tor1aip2*, qui est surexprimé chez les RF en condition "**Basal**".

Dans la comparaison "RF *vs* Témoin" (Tableau 21), nous mettons en évidence une sous-expression des gènes *HDAC10* et *Col27a1* chez les RF, qui n'apparaissait pas en RNA-Seq, en condition "**Basal**".

I.1.1.10. Effet des RF à long terme (LT-HC et LT-Appr)

Dans le CPFm, chez le groupe "Adultes", les résultats du séquençage montraient des modulations de certains gènes en condition "**Apprentissage**" uniquement, 33 jours après l'arrêt de l'exposition aux RF. Ainsi et pour rappel, notre sélection des gènes s'est donc faite sur les gènes sous-exprimés après un apprentissage, avec comme critères des gènes déjà sous-

exprimés après 3 jours d'apprentissage. Parmi ces 45 gènes sous-exprimés après 3 jours d'apprentissage et qui le restent 30 jours plus tard, nous avons testé 8 gènes (Tableau 22).

Validations RT-qPCR	BASAL (LT)				APPRENTISSAGE (LT)			
	LT-HC-RF *vs* LT-HC-Témoin		LT-HC-RF *vs* LT-HC-Sham		LT-Appr-RF *vs* LT-Appr-Témoin		LT-Appr-RF *vs* LT-Appr-Sham	
Gènes	RNA-seq	"Adultes"	RNA-seq	"Adultes"	RNA-seq	"Adultes"	RNA-seq	"Adultes"
CKB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	0,89
Bmyc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	0,98
Camk2n2	ns	ns	ns	ns	**	0,8	***	0,62
Tomm6	ns	ns	ns	ns	**	0,93	***	>0,99
C1qtnf4	ns	ns	ns	ns	*	>0,99	***	>0,99
Gadd45g	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	0,83
JunB	ns	ns	ns	ns	**	0,98	***	0,97
Mif	ns	ns	ns	ns	**	>0,99	***	>0,99

Tableau 22 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage dans le CPFm en condition "Basal (LT-HC)" et "Apprentissage (LT-Appr) chez le groupe "Adultes".
*Les valeurs indiquent les valeurs des p-value pour les gènes modulés en RNA-seq. Les étoiles (*) représentent la significativité du post-hoc (Newman-Keuls) issu de l'analyse ANOVA à deux facteurs (Groupe et Délai) : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différence statistiquement significative, (ns), non-significatif. La couleur orange indique une sous-expression du gène (n=3/groupe pour le RNA-seq, n=5-6/groupe pour RT-qPCR).*

L'étude de l'expression de ces gènes en RT-qPCR ne valide pas les modulations obtenues en séquençage pour les gènes sélectionnés, en condition "**Apprentissage**", pour les 2 comparaisons ("RF *vs* Témoin" et "RF *vs* Sham", Tableau 22).

En conditions "**Basal**" et "**Apprentissage**", aucune nouvelle variation de l'expression des gènes (non observée en RNA-seq) n'a été observée chez les "Adultes" avec les RT-qPCR.

Pour le groupe des "Adultes", les résultats des analyses par RT-qPCR ne permettent pas (ou très peu) de valider les résultats obtenus en RNA-seq, à la fois dans l'hippocampe dorsal et le cortex préfrontal médian, et ce, pour toutes les conditions (basal, apprentissage et LT).

Dans la suite, nous avons analysé ces gènes chez les deux autres groupes d'âge ("Ados" et "Agés") dans l'hippocampe dorsal et le CPFm, afin de vérifier leur modulation à des âges différents.

I.3. Etude de l'expression des gènes par RT-qPCR dans deux autres groupes d'âge "Ados" et "Agés"

Validations RT-qPCR	BASAL						APPRENTISSAGE					
	HC-RF vs HC-Témoin			HC-RF vs HC-Sham			Appr-RF vs Appr-Témoin			Appr-RF vs Appr-Sham		
Gènes	RNA-seq	"Ados"	"Agés"	RNA-seq	"Ados"	"Agés"	RNA-seq	"Ados"	"Agés"	RNA-seq	"Ados"	"Agés"
Atp1a2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Dnah6	ns	ns	ns	**	0,93	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Dnah12	ns	ns	ns	***	0,88	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Drc1	ns	ns	ns	**	>0,99	0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CKB	ns	ns	ns	***	>0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bmyc	ns	ns	ns	**	0,93	>0,99	ns	ns	ns	ns	>0,99	*
Nxph3	ns	ns	ns	***	0,98	>0,99	ns	ns	ns	***	0,94	>0,99
Gpx1	ns	ns	ns	**	>0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
JunB	ns	ns	ns	***	0,88	0,93	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Atp2a3	ns	ns	ns	**	>0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kif3a	ns	ns	ns	**	0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Abca5	ns	*	>0,99	**	0,92	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gria1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	0,92
Ppp1r9a	ns	ns	ns	*	>0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Med1	ns	*	0,87	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GFAP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Iba1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tableau 23 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage dans l'Hip dorsal en condition "Basal (HC)" et "Apprentissage (Appr)" chez les rats des groupes "Ados" et les "Agés".

*Les valeurs indiquent les valeurs des p-value pour les gènes modulés en RNA-seq. Les étoiles (*) représentent la significativité du post-hoc (Newman-Keuls) issu de l'analyse ANOVA à deux facteurs (Groupe et Délai) : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différence statistiquement significative, (ns), non-significatif. Les couleurs orange et bleu indiquent respectivement une surexpression ou une sous-expression du gène (n=3/groupe pour le RNA-seq, n=5-6/groupe pour RT-qPCR).*

Dans *l'hippocampe dorsal*, pour la comparaison "HC-RF *vs* HC-Sham" nous n'avons pas validé les résultats de RNA-seq des "Adultes" ni en condition "**Basal**", ni "**Apprentissage**", et ce, dans les deux groupes d'âge. En revanche, pour la même comparaison, "HC-RF *vs* HC-Sham", dans le groupe "Ados", nous observons que deux gènes (Abca5 et Med1) sont modulés (respectivement surexprimé et sous-exprimé) dans la comparaison "RF *vs* Témoins" et ne l'étaient pas chez les rats "Adultes" (Tableau 23).

En condition "**Apprentissage**", nous avons observé, par RT-qPCR, une augmentation de l'expression de *Gria1* chez les "Ados"-RF *vs* Sham. Nous avons également mis en évidence, par RT-qPCR, une augmentation de *Bmyc* chez les "Agés" exposés aux RF *vs* Sham (Tableau 23), ces deux gènes n'étaient pas modulés en RNA Seq chez l'Adulte.

Validations RT-qPCR	BASAL								APPRENTISSAGE							
	HC-RF vs HC-Témoin				HC-RF vs HC-Sham				Appr-RF vs Appr-Témoin				Appr-RF vs Appr-Sham			
Gènes	RNA-seq	"Adultes"	"Ados"	"Agés"	RNA-seq	"Adultes"	"Ados"	"Agés"	RNA-seq	"Adultes"	"Ados"	"Agés"	RNA-seq	"Adultes"	"Ados"	"Agés"
Atp1a2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Dnah6	ns	ns	ns	ns	***	0,96	>0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Dnah12	*	0,98	>0,99	>0,99	***	0,87	>0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Drc1	ns	ns	ns	ns	***	0,54	0,93	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sgk3	ns	ns	ns	ns	***	>0,99	0,73	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tor1aip2	ns	ns	ns	ns	ns	**	0,84	>0,99	ns	ns	ns	ns	***	0,97	0,93	0,78
Tspan2	ns	ns	*	>0,99	***	>0,99	0,58	0,89	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
UGT8	ns	ns	ns	ns	***	>0,99	0,36	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bmyc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	0,98	0,13	0,91
CKB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	>0,99	0,21	0,9
HDAC10	ns	*	0,16	>0,99	***	>0,99	0,94	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AdamTS10	ns	ns	ns	ns	**	0,97	0,91	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Col5a2	ns	ns	ns	ns	**	0,82	>0,99	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Col27a1	ns	*	0,14	>0,99	***	>0,99	0,39	>0,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
JunD	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	>0,99	ns	ns	ns	ns	***	>0,99	>0,99	>0,99
Camk2n2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,88	ns	ns	ns	ns	***	0,98	0,65	0,97
Iba1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,98	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tableau 24 : Validation des gènes sélectionnés à partir des données du séquençage des rats "Adultes" dans le CPFm en condition "Basal (HC)" et "Apprentissage (Appr)" chez les rats "Ados" et les "Agés".

*Les valeurs indiquent les valeurs des p-value pour les gènes modulés en RNA-seq. Les étoiles (*) représentent la significativité du post-hoc (Newman-Keuls) issu de l'analyse ANOVA à deux facteurs (Groupe et Délai) : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différence statistiquement significative, (ns), non-significatif. Les couleurs orange et bleu indiquent respectivement une surexpression ou une sous-expression du gène (n=3/groupe pour le RNA-seq, n=5-6/groupe pour RT-qPCR).*

Dans *le cortex préfrontal médian*, la technique de RT-qPCR n'a pas permis de mettre en évidence des différences d'expression dans les deux groupes d'âge, sur les gènes significativement modulés dans le groupe "Adultes" par RNA-Seq (condition "**Basal**" et "**Apprentissage**") pour les 2 comparaisons "HC-RF *vs* HC-Témoin" et "HC-RF *vs* HC-Sham". Cependant, en condition "Basal" nous avons observé, par RT-qPCR, une diminution de l'expression *Tspan2* chez les rats "Ados" exposés "HC-RF *vs* HC-Témoin".

Enfin, lors de l'étude de l'effet des RF à long terme chez les "Ados" (CPFm), les résultats des analyses par RT-qPCR ne mettent pas en évidence des changements d'expression de gènes comme obtenus par RNA-seq chez le groupe "Adultes", pour toutes les conditions ("**Basal**" et "**Apprentissage**" à long terme) (données non montrées).

L'étude de l'expression des gènes par RT-qPCR n'a pas donné beaucoup de résultats comparée à l'étude par RNA-seq, et ce, pour tous les groupes d'âges (Ados, Adultes, Agés). Cependant, nous avons mis en évidence quelques modulations, par les RF, pour les gènes Abca5, Med1 et Gria1 chez les "Ados" et Bmyc chez les "Agés" dans l'Hip dorsal, et les

gènes Tor1aip2, Hdac10, et Col27a1 chez les "Adultes" dans le CPFm, et Tspan2 chez les "Ados". Ces gènes, bien que très différents, seront analysés et discutés dans la partie suivante (Discussion, Chapitre 2).

II. RF et apprentissage

II.1. Effet des RF sur l'activité neuronale (c-fos, Egr1)

L'analyse de l'expression des gènes en lien avec l'activité neuronale est réalisée par RT-qPCR (pour vérifier les données issues du séquençage) pour les deux structures (Hip dorsal et CPFm) pour les conditions "Basal" et "Apprentissage" et les 3 groupes d'âge. Les résultats du RNA-seq pour la condition persistance n'ont révélé aucune modulation de ces deux gènes.

II.1.1. Dans l'Hip dorsal

Dans l'Hip dorsal, les résultats du RNA-seq montrent une induction ($p<0,001$) des gènes *c-fos* et *Egr1* pour tous les groupes d'âge dans la comparaison "Basal (HC)" *vs* "Appr" au sein de chaque groupe expérimental (Témoin, Sham et RF). En revanche, aucune modulation significative n'est mise en évidence lorsque les groupes sont comparés entre eux en condition "Basal (HC)" et pendant l'apprentissage ("Appr"), à part pour les groupes "HC" chez les rats "Adultes" (gène *c-fos*) (Figure 73B).

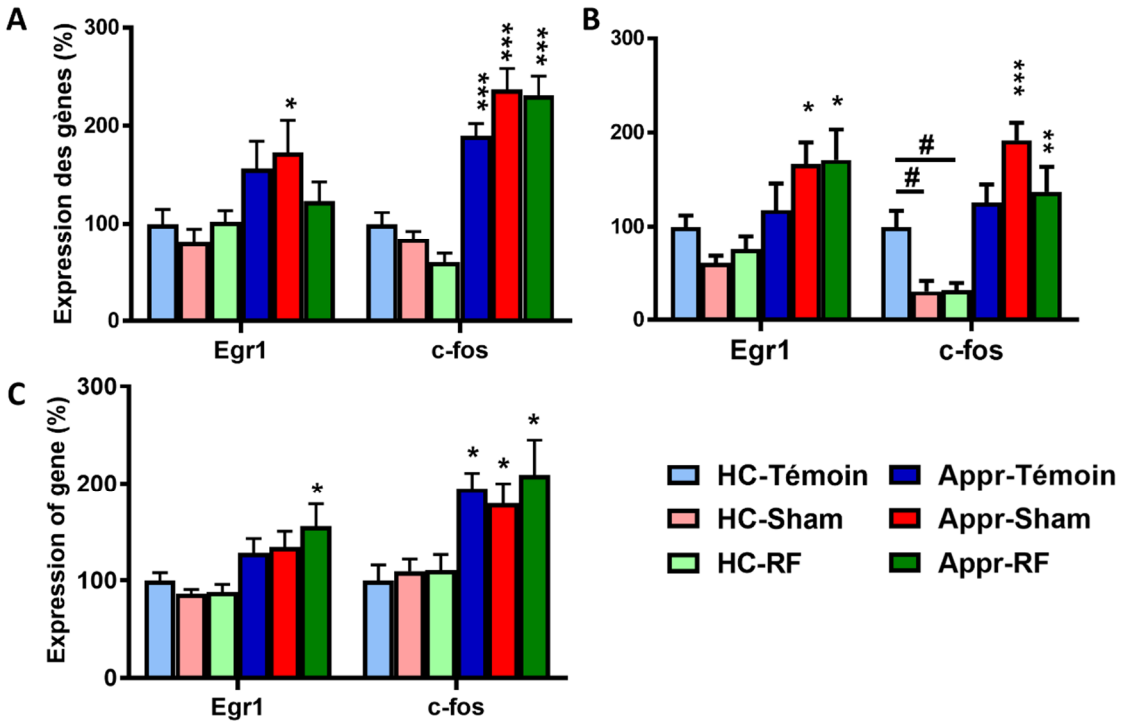


Figure 73 : Expression des gènes (RT-qPCR) liés à l'activité neuronale (c-fos et Egr1/Zif268) dans l'Hip dorsal chez les 3 groupes d'âge : "Ados" (A), "Adultes" (B) et "Agés" (C) étudiée par RT-qPCR.

**p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, différence statistiquement significative Appr vs HC, #p<0,05 différence statistiquement significative entre deux groupes (Témoin, Sham, RF, n = 5-6/groupe pour les rats "Ados" et "Adultes" et n=7-8/groupe pour les rats "Agés") pour une même condition "Basal" ou "Appr".*

Expression du gène *c-fos*

Chez les rats "Ados" (Figure 73A), les résultats de l'ANOVA à deux facteurs montrent un effet de l'apprentissage (Appr, $F(1, 30) = 134$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2, 30) = 0,74$; ns) mais avec une interaction entre les deux (Groupe x Appr, $F(2, 30) = 4,21$; $p<0,05$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls ne montre aucune différence entre les groupes. Chez les "Adultes" (Figure 73B), les résultats sont semblables à ceux obtenus chez les "Ados" (Appr, $F(1, 27) = 42,9$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 27) = 1,62$; ns ; Groupe x Appr, $F(2, 27) = 6,56$; $p<0,01$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), montre une expression de *c-fos* significativement plus faible chez les RF et les Sham ($p<0,05$) par rapport au groupe Témoin dans la condition "Basal (HC)". Enfin chez les "Agés" (Figure 73C), l'effet de l'apprentissage est également observé sans effet Groupe ni interaction entre les deux (Appr, $F(1, 40) = 28,34$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 40) = 0,32$; ns ; Groupe x Appr, $F(2, 40) = 0,30$; ns).

Ces résultats obtenus par RT-qPCR (Figure 73) mettent en évidence les mêmes inductions que celles observées avec le séquençage des ARN messagers (données non montrées), soit une augmentation de l'expression du gène c-fos après 3 jours d'apprentissage spatial (piscine de Morris). Pour le groupe des "Adultes", les résultats montrent une diminution significative du niveau d'expression de c-fos, en condition "Basal" entre les rats exposés dans la chambre (Sham et RF) vs Témoins (à l'extérieur de la chambre) (Figure 73A).

Expression du gène *Egr1*

Chez les "Ados" (Figure 73A), les résultats de l'ANOVA à deux facteurs montrent un effet de l'apprentissage (Appr, $F(1, 30) = 10,28$; $p<0,01$) sans effet Groupe ($F(2, 30) = 0,31$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Appr, $F(2, 30) = 1,33$; ns). Chez les "Adultes" (Figure 73B), les résultats sont semblables à ceux obtenus chez les "Ados" (Appr, $F(1, 26) = 17,43$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 26) = 0,23$; ns ; Groupe x Appr, $F(2, 26) = 2,31$; ns). Enfin chez les "Agés" (Figure 73C), l'effet de l'apprentissage est aussi observé sans effet Groupe ni interaction entre les deux (Appr, $F(1, 40) = 18,86$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 40) = 0,38$; ns ; Groupe x Appr, $F(2, 40) = 1,05$; ns).

Pour le gène *Egr1*, l'analyse post-hoc montre que l'effet apprentissage (comparaison Appr *vs* HC) est significative chez les Sham dans le groupe "Ados" ($p < 0,05$), chez les Sham et RF dans le groupe "Adulte" ($p < 0,05$, Figure 73B) et uniquement chez les RF dans le groupe "Agés" ($p < 0,05$,Figure 73C).

Les résultats montrent une induction d'Egr1 très variable selon l'âge des animaux, contrairement aux résultats de RNA-seq, qui mettait en évidence une induction pour tous les groupes ($p<0,001$).

II.1.2. Dans le CPFm

Dans le CPFm, les résultats du RNA-seq montrent une induction des gènes *c-fos* ($p<0,001$) et *Egr1* ($p<0,01$) pour tous les groupes d'âge pour la comparaison entre groupes HC et Appr au sein de chaque groupe expérimental (Témoin, Sham et RF). En revanche, aucune modulation significative n'est mise en évidence lorsque les groupes sont comparés entre eux en condition basal (HC) et pendant l'apprentissage (Appr) (Figure 74).

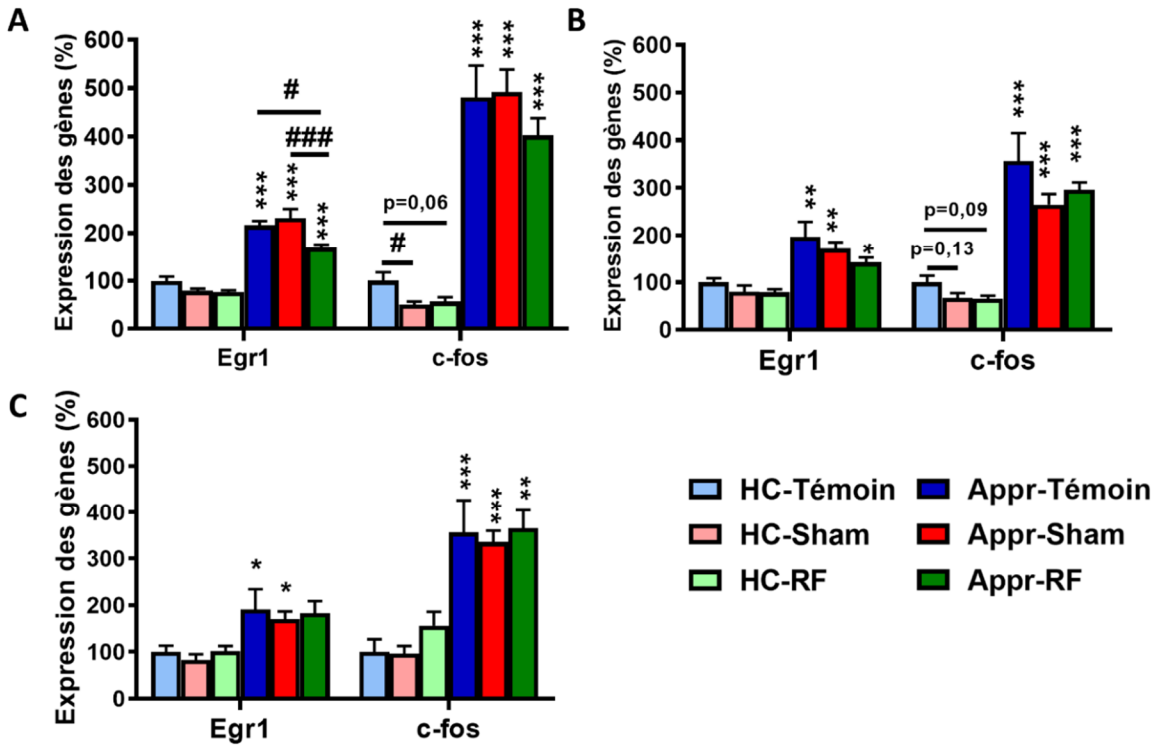


Figure 74 : Expression des gènes de l'activité neuronale (c-fos et Egr1/Zif268) dans le CPFm chez les 3 groupes d'âge : "Ados" (A), "Adultes" (B) et "Agés" (C).
**p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, différence statistiquement significative Appr vs HC ;, #p<0,05, ###p<0,001 différence statistiquement significative entre deux conditions expérimentales (Témoin, Sham, RF, n = 5-6/groupe pour les rats "Ados" et "Adultes" et n=6-8/groupe pour les rats "Agés").*

Expression du gène *c-fos*

Chez les rats "Ados" (Figure 74A), les résultats de l'ANOVA à deux facteurs montrent un effet Apprentissage ($F(1, 29) = 155,8$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2, 29) = 0,74$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Appr, $F(2, 29) = 0,78$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls montre une diminution de l'expression de *c-fos* chez les Sham *vs* Témoin et une tendance ($p = 0,05$) chez les RF *vs* Témoin, en "Basal". Chez les "Adultes" (Figure 74B), les résultats sont semblables à ceux obtenus chez les "Ados" (Appr, $F(1, 29) = 98,22$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 29) = 2,65$; ns ; Appr x Groupe, $F(2, 27) = 0,53$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls montre une induction pour tous les groupes. Enfin, chez les "Agés" (Figure 74B), l'effet de l'apprentissage est aussi observé sans effet Groupe ni interaction entre les deux (Appr, $F(1, 37) = 58,62$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 37) = 0,75$; ns ; Appr x Groupe, $F(2, 37) = 0,19$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls montre une induction pour tous les groupes.

Les résultats obtenus par RT-qPCR (Figure 74) valident les résultats observés avec le RNA-seq, soit une augmentation de l'expression du gène c-fos après 3 jours d'apprentissage spatial (piscine de Morris).

Expression du gène *Egr1*

Chez les "Ados" (Figure 74A), les résultats de l'ANOVA à deux facteurs montrent un effet Apprentissage ($F(1, 29) = 232,4$; $p<0,001$) avec effet Groupe ($F(2, 29) = 8,20$; $p<0,01$) et une interaction entre les deux (Groupe x Appr, $F(2, 29) = 4,94$; $p<0,05$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre une expression d'*Egr1* significativement plus faible chez les RF par rapport aux Sham ($p<0,001$) et par rapport aux Témoin ($p<0,05$) en condition "Basal". Chez les "Adultes" (Figure 74B), les résultats montrent uniquement un effet Apprentissage (Appr, $F(1, 30) = 39,73$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 30) = 2,74$; ns ; Appr x Groupe, $F(2, 30) = 0,59$; ns). Enfin, chez les "Agés" (Figure 74C), l'effet Apprentissage est aussi observé sans effet Groupe ni interaction entre les deux (Appr, $F(1, 37) = 21,7$; $p<0,001$; Groupe, $F(2, 37) = 0,42$; ns ; Appr x Groupe, $F(2, 37) = 0,02$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre une induction significative chez les rats Témoins et Sham ($p < 0,05$), mais pas chez les rats RF du groupe "Agés" (Figure 74C).

Les résultats obtenus par RT-qPCR (Figure 74) valident les résultats observés avec le RNA-seq, soit une augmentation de l'expression du gène Egr1 après 3 jours d'apprentissage spatial (piscine de Morris). Cependant, nous observons également une expression plus faible de ce gène chez les RF en condition "Appr" chez les rats "Ados".

Pour les gènes d'activité neuronale (c-fos et Egr1) appelés également gènes précoces, l'induction par l'apprentissage observée en RNA-seq chez les rats "Adultes" est validée avec la RT-qPCR dans les 3 groupes d'âge. De plus, aucun effet des RF n'est observé en condition 'basal' ou pendant l'apprentissage pour les trois groupes d'âge. Cependant, nous remarquons que pour le gène Egr1, l'induction après 3 jours d'apprentissage chez les rats du groupe "Agés" n'est pas significative au sein du groupe RF, et elle est significativement moins élevée chez les rats Appr RF du groupe "Ados" vs Sham et vs Témoin.

II.2. Effet des RF sur les autres gènes induits par l'apprentissage

Le nombre de gènes dérégulés au cours de l'apprentissage (Appr *vs* HC) dans chacun des groupes est rappelé dans le tableau ci-dessous.

Hippocampe dorsal		Gènes surexprimés	Gènes sous-exprimés	Gènes modulés
Effet apprentissage (Appr vs HC)	Témoin	29	12	41
	Sham	844	739	1583
	RF	3	1	4
Cortex Préfrontal médian		**Gènes surexprimés**	**Gènes sous-exprimés**	**Gènes modulés**
Effet apprentissage (Appr vs HC)	Témoin	1134	157	1291
	Sham	2068	656	2724
	RF	522	173	697
Persistance du souvenir (LT-Appr vs LT-HC)	Témoin	0	0	0
	Sham	1	0	1
	RF	0	5	5

Tableau 25 : Bilan des gènes modulés par l'apprentissage observés en RNA-seq pour l'Hip dorsal et le CPFm chez l'Adulte.
Les critères de significativité sont un Log2(FC)>0,5 pour les gènes surexprimés et un Log2(FC)<-0,5 pour les gènes sous-exprimés et p<0,01 comme seuil de significativité.

II.2.1. Dans l'Hip dorsal

L'analyse des données de RNA-seq montre que de nombreux gènes sont modulés par 3 jours d''apprentissage chez les Sham, beaucoup moins chez les Témoins et seulement 4 gènes chez les RF (Tableau 25). Afin de trouver les gènes communs entre les trois groupes, nous avons utilisé Venny (Figure 75). Pour cela, nous avons sélectionné les **gènes surexprimés** (Figure 75A) et **sous-exprimés** (Figure 75B) pour les comparaisons Appr *vs* HC pour chaque groupe (Témoin, Sham, RF).

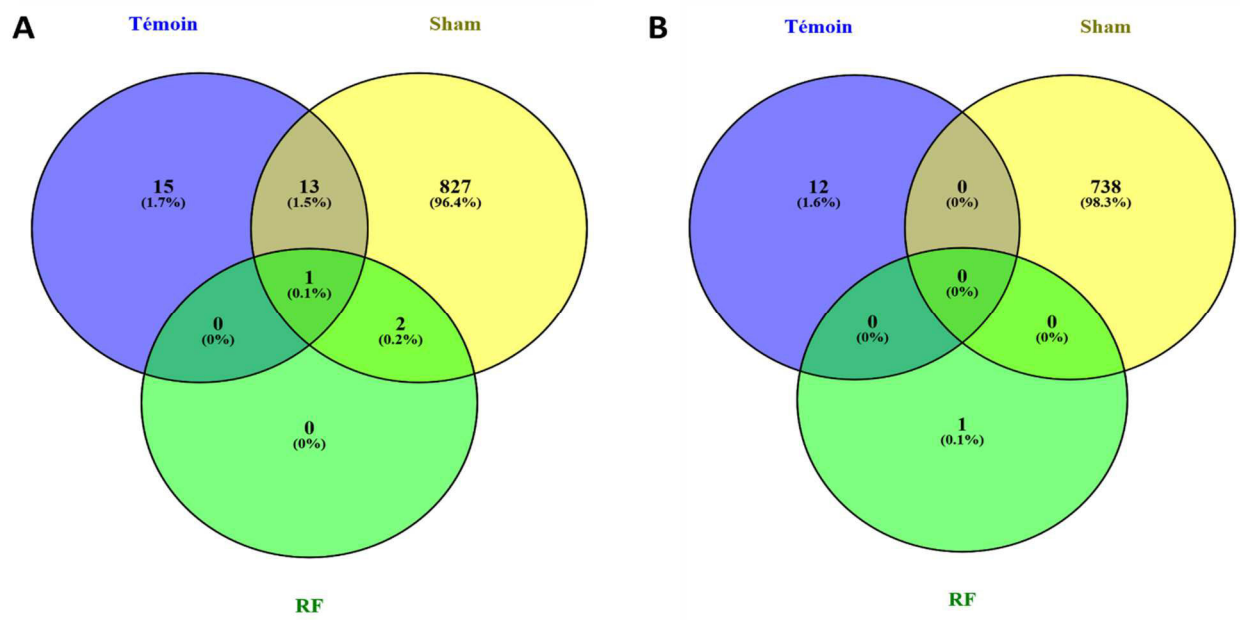


Figure 75 : Gènes communs surexprimés (A) ou sous-exprimés (B) après un apprentissage chez les trois groupes (Témoins, Sham et RF) dans l'Hip dorsal chez les rats "Adultes".

Les résultats des comparaisons par Venny montrent un seul gène commun (entre les 3 groupes) **surexprimé** (Figure 75A) *Per1* (*Period Circadian Regulator 1*) associé au rythme circadien. Les données montrent également deux gènes communs entre groupes Sham et RF, *Egr1* et *Arc* (gènes précoces impliqués dans l'activité neuronale). Enfin, la majorité des gènes (827) sont uniquement modulés par l'apprentissage chez les rats Sham. Pour les **gènes sous-exprimés** (Figure 75B), le nombre de gènes modulés par l'apprentissage est plus faible que pour les gènes surexprimés et aucun gène n'est commun entre les trois groupes. Ici aussi, le nombre de gènes sous-exprimés par l'apprentissage est bien plus important pour les Sham.

Ces données témoignent à nouveau de la grande hétérogénéité des résultats de séquençage des ARN dans l'hippocampe, montrant, de manière surprenante, un effet de l'apprentissage très important seulement chez les rats Sham.

Si la grande hétérogénéité rencontrée ici entre le nombre de gènes induits par l'apprentissage au sein de chaque groupe ne peut pas vraiment être expliquée, pour étudier l'effet de l'apprentissage, nous pouvons utiliser les résultats obtenus au sein du groupe Sham (1593 gènes modulés au total : **844 gènes surexprimés** et **739 gènes sous-exprimés**) par l'apprentissage (3 jours en piscine de Morris). Le nombre de gènes étant assez important, l'analyse par STRING a été réalisée après un nouveau cut-off : les 500 gènes les plus modulés

(Log2(FC) compris entre 2,10 et 0,67 pour les gènes surexprimés et compris entre -0,74 et -1,50 pour les gènes sous-exprimés).

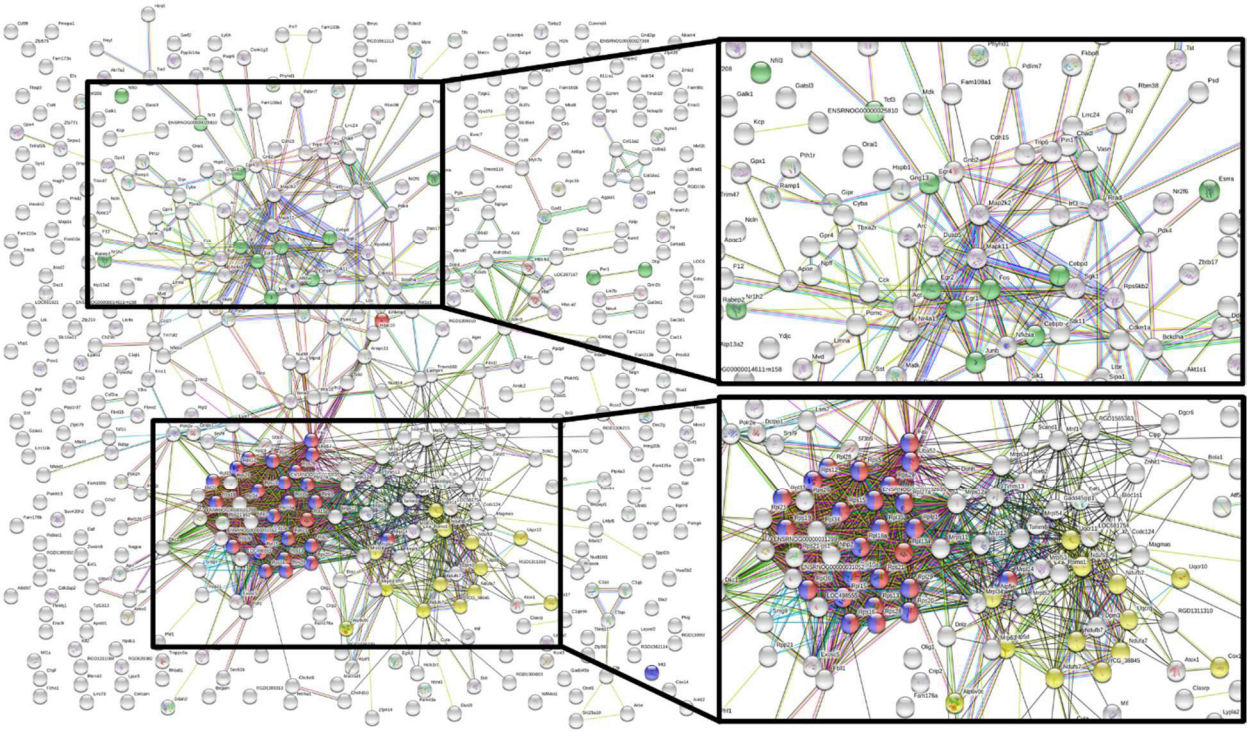


Figure 76 : Relation fonctionnelle entre les 500 gènes les plus surexprimés par l'apprentissage, dans l'Hip dorsal (groupe Sham) chez l'Adulte.
Les clusters principaux sont "ribosome (25)", "régulation de l'ARN polymérase II (13)", "traduction (26)" et "phosphorylation oxydative (13)".

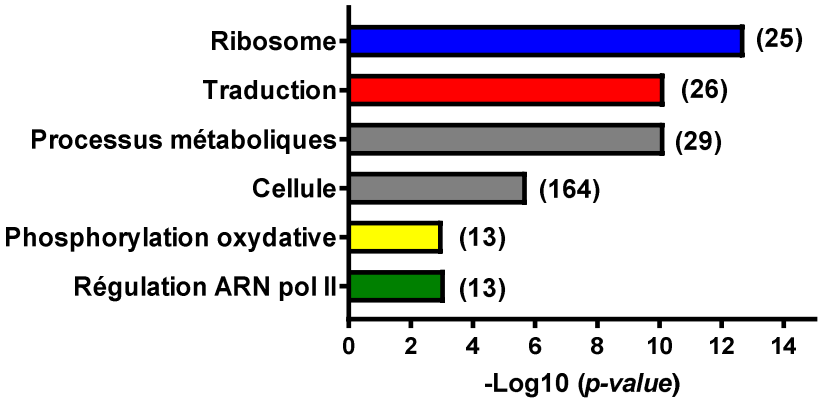


Figure 77 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 500 gènes surexprimés issus de la comparaison "Appr-Sham vs HC-Sham" chez l'Adulte.

L'analyse fonctionnelle des **500 gènes surexprimés** (dans l'Hip dorsal chez le groupe "Sham") met en évidence différents groupements fonctionnels (Figure 76), regroupant des gènes en lien avec le ribosome, la traduction, la régulation de l'ARN polymérase II, la

phosphorylation oxydative et des gènes impliqués dans la mémoire (*c-fos*, *Arc*, famille *Egr*, …), regroupés en 3 noyaux principaux.

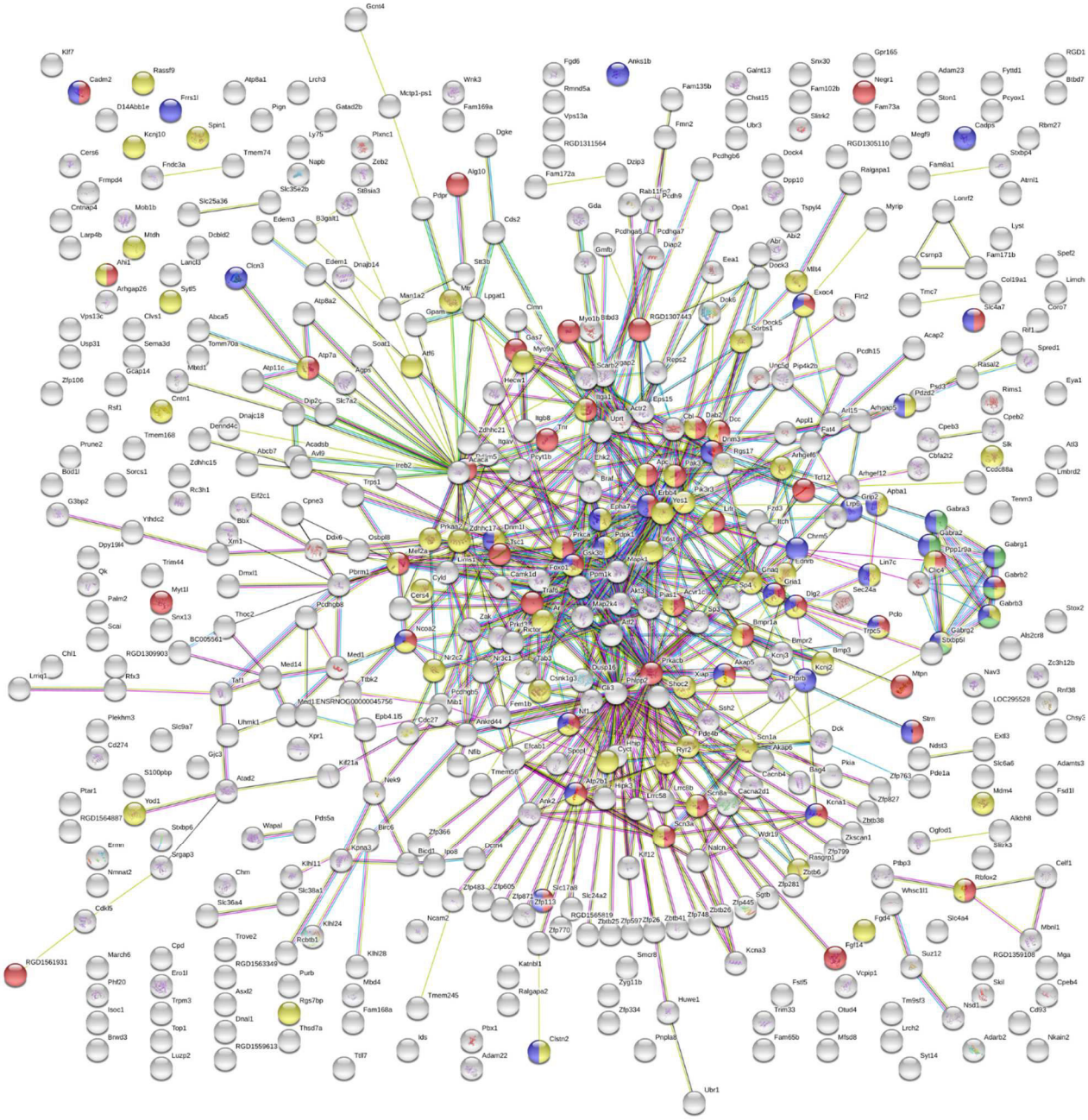


Figure 78 : Relation fonctionnelle entre les 500 gènes les plus sous-exprimés par l'apprentissage, dans l'Hip dorsal (groupe Sham) du rat "Adulte".
Les clusters principaux sont "synapse (37)", "activité des récepteurs GABA-A (6)", "développement du système nerveux (48)" et "communication cellulaire (71)".

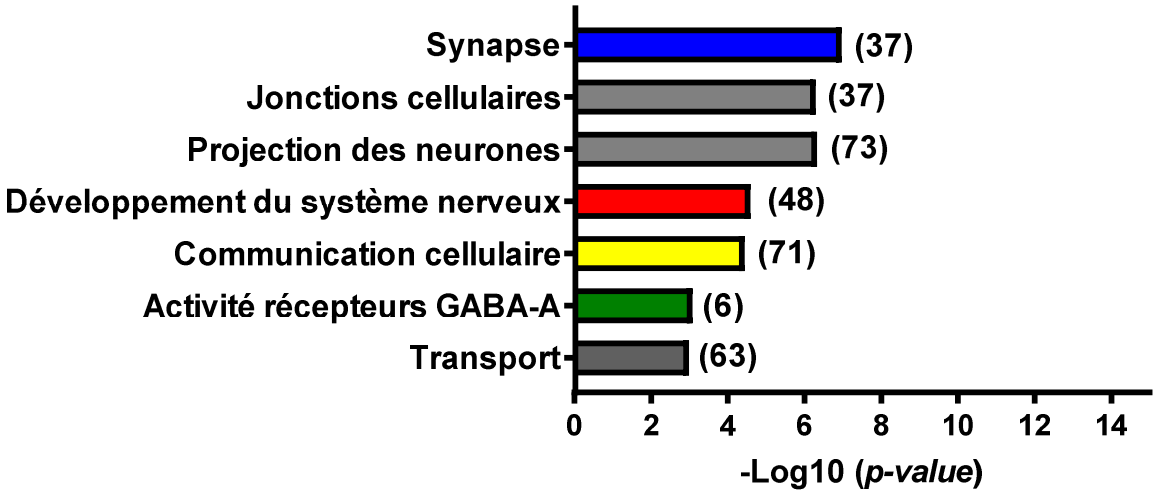


Figure 79 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 500 gènes sous-exprimés issus de la comparaison "Appr-Sham vs HC-Sham" chez le rat "Adulte".

L'analyse fonctionnelle des **500 gènes sous-exprimés** (dans l'Hip dorsal chez le groupe "Sham") met en évidence différents groupements fonctionnels (Figure 78 ; Figure 79) regroupant des gènes en lien notamment avec la synapse, le système nerveux, et la communication cellulaire.

II.2.2. Dans le CPFm

Dans le CPFm, l'analyse des données de RNA-seq montre que de nombreux gènes sont modulés par l'apprentissage, et ce, dans tous les groupes étudiés (Témoin, Sham, RF) et comme pour l'Hip dorsal, le nombre de gènes modulés est le plus élevé chez les rats Sham (Tableau 25).

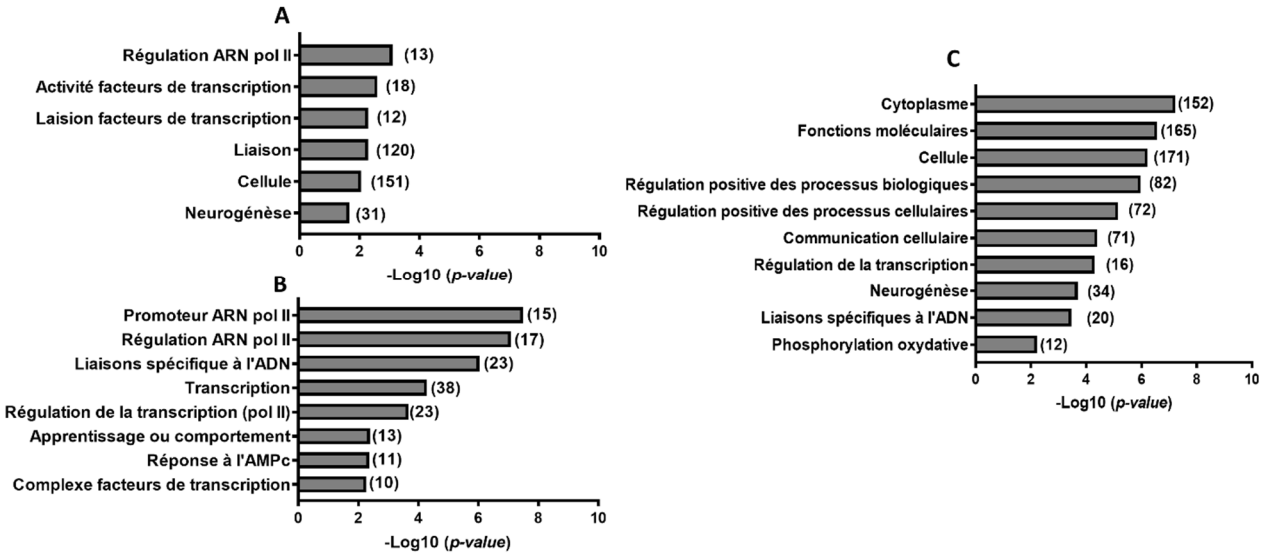


Figure 80 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 500 gènes surexprimés pour le groupe Témoin (A), Sham (B), et RF (C) dans le CPFm chez le rat "Adulte".

L'analyse différentielle par STRING et DAVID donne des groupes fonctionnels similaires pour chaque groupe expérimental (Témoin, Sham, RF). Les clusters (Figure 80) sont semblables entre les groupes regroupant des gènes en lien avec la transcription et sa régulation. Nous avons observé des clusters communs entre les rats RF et les Témoins tels que "cellule" et "neurogénèse" (Figure 80 A et C).

L'analyse fonctionnelle, par STRING, des gènes sous-exprimés ne donne pas de cluster. DAVID, quant à lui, met en évidence des clusters dont la p-value est faible (comprise en 0,08 et 0,90), montrant que ces groupements sont peu importants (données non montrées).

Afin de trouver les gènes communs entre les trois groupes, nous avons étudié ces gènes par Venny (Figure 81). Pour cela, nous avons sélectionné les **gènes surexprimés** (Figure 81A) et **sous-exprimés** (Figure 81B) pour les comparaisons Appr *vs* HC pour chaque groupe (Témoin, Sham, RF).

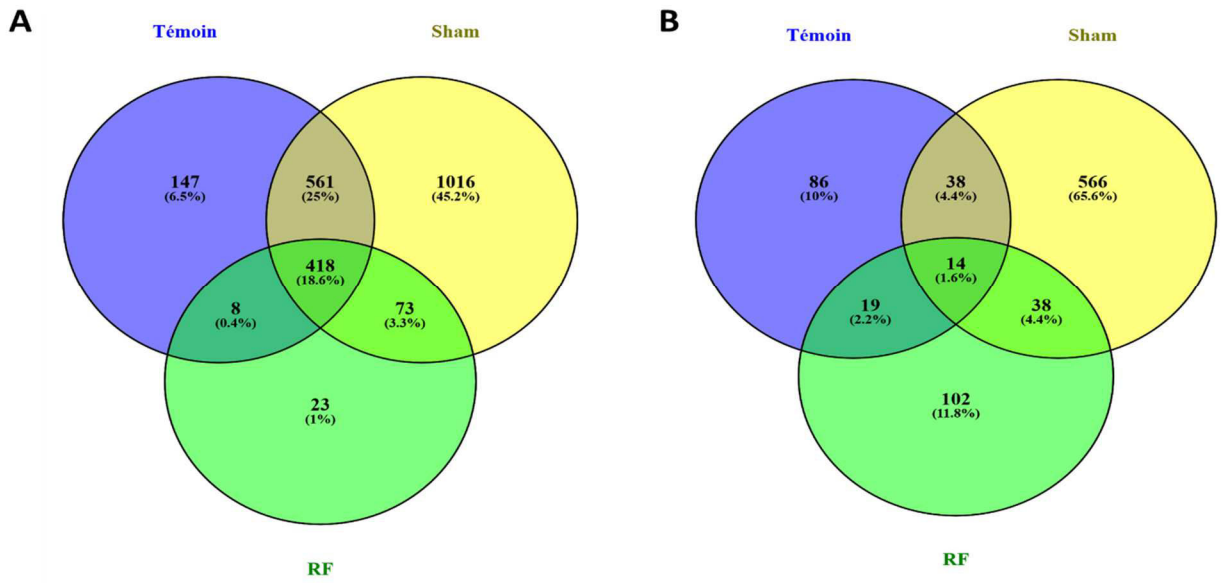


Figure 81 : Gènes communs surexprimés (A) ou sous-exprimés (B) après un apprentissage chez les trois groupes (Témoins, Sham et RF) dans le CPFm chez les rats "Adultes".

Les résultats des comparaisons par Venny montrent 418 gènes communs (entre les 3 groupes) **surexprimés** (Figure 81A). Parmi ces gènes, différents groupements fonctionnels sont observés (Figure 82 et Figure 83), regroupant des gènes en lien avec la transcription, les régulations de processus biologiques et cellulaires, la phosphorylation oxydative et des gènes impliqués dans la mémoire (*c-fos*, famille *Egr*, *Arc*, …), regroupés en 4 noyaux principaux. Un grand nombre de gènes (561 gènes) sont également communs entre les Sham et les Témoins (non retrouvés chez les RF) et regroupés dans des clusters tels que jonctions cellulaires, liaison protéique ou encore neurogénèse.

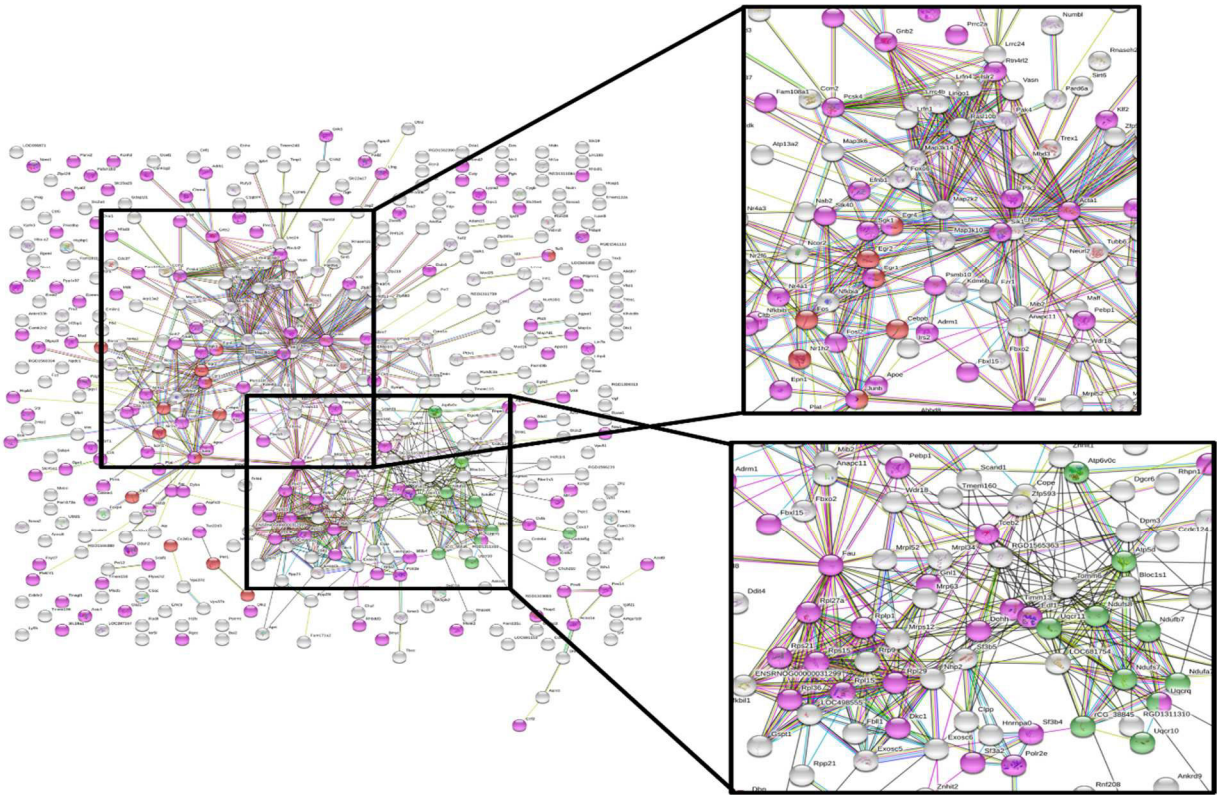


Figure 82 : Relation fonctionnelle entre des 418 gènes surexprimés communs entre les trois groupes après l'apprentissage, dans le CPFm chez le rat Adulte.
Les clusters principaux sont "phosphorylation oxydative (11)", "régulation de l'ARN polymérase II (13)" et "fonctions moléculaires (131)".

Les données montrent également que beaucoup de gènes (1016, Figure 81A) sont uniquement modulés par l'apprentissage chez les Sham. C'est ce que nous avions observé dans l'Hip dorsal, sans pouvoir expliquer pourquoi cette condition regroupe le plus grand nombre de gènes.

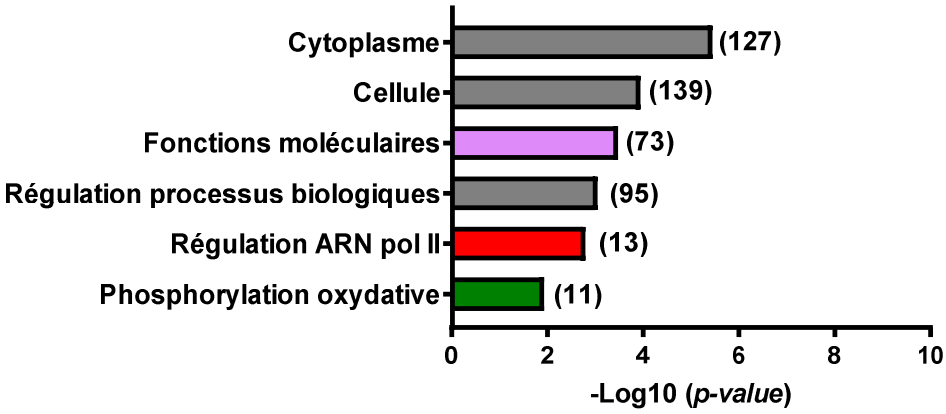


Figure 83 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 418 gènes surexprimés communs entre les trois groupes après l'apprentissage.

Pour les **gènes sous-exprimés** (Figure 81B), le nombre de gènes modulés par l'apprentissage est plus faible que pour les gènes surexprimés. Seuls 14 gènes sont modulés par l'apprentissage dans les 3 groupes. Ces gènes sont très différents et ne forment pas de groupes fonctionnels. Enfin, 102 gènes sont sous-exprimés uniquement chez les rats RF après l'apprentissage. Ces derniers sont très différents et ne constituent pas de groupements fonctionnels.

L'analyse des gènes modulés par l'apprentissage montre des résultats hétérogènes dans l'hippocampe dorsal avec une forte modulation pour les Sham uniquement. Nous retrouvons les gènes précoces (impliqués dans l'activité neuronale) pour les trois groupes. Dans le cortex préfrontal médian, les gènes induits par l'apprentissage sont plus nombreux et sont en lien avec la transcription, les régulations des processus biologiques et cellulaires et la phosphorylation oxydative. Pour les gènes sous-exprimés, les gènes communs modulés par l'apprentissage sont très différents et ne montrent aucun cluster.

Les RF n'impactent donc pas l'induction des gènes précoces (Egr1 et c-fos) lors d'un apprentissage spatial, ce qui est en accord avec les résultats de comportement qui ne montrent aucune différence lors de l'apprentissage et du rappel à 24h en piscine de Morris.

Discussion

Depuis ces 30 dernières années, l'utilisation des nouvelles technologies de l'information et de la communication nécessitant les radiofréquences, comme la téléphonie mobile, ne cessent d'augmenter. Ces développements rapides inquiètent les utilisateurs de tous âges, de plus en plus nombreux (plus de 75 millions de cartes SIM en France en 2018).

Le principal sujet d'inquiétude de la population générale, utilisatrice ou non de ces technologies, est l'impact de ces nouveaux signaux (2G, puis 3G, 4G et bientôt 5G) sur la santé, quel que soit leur âge, leur possible degré de sensibilité (depuis l'exposition prénatale à la personne âgée, en passant par les différents âges de la vie) et leur consommation quotidienne quand il s'agit notamment du téléphone mobile (adolescents et adultes).

Cet enjeu de santé publique est très surveillé par de nombreuses organisations internationales et nationales (ex, ICNIRP, ANFR, OMS, CE, ANSES, …) qui veillent sur les normes et les précautions mises en place par les services publics et tentent de répondre aux questions des consommateurs.

En se basant sur les résultats des derniers rapports de l'ANSES (2013 et 2016) et des différentes études de la littérature, ma thèse avait pour but d'étudier l'impact d'un signal de type LTE 4G sur la mémoire à long terme, tout en vérifiant d'autres paramètres comme l'anxiété et l'activité locomotrice. L'influence de l'âge était également proposée par l'utilisation de rats jeunes (adolescents), adultes et âgés.

Ce travail se situait dans le cadre d'un financement de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, appel à projet PNR EST 2014-2018, Projet EpiradioMem) avec comme partenaire la fondation IT'IS à Zurich.

Dans cette partie discussion, après avoir redéfini nos conditions expérimentales, nous discuterons mes résultats obtenus sur la physiologie et la mémoire au niveau comportemental dans un premier chapitre. Différentes sous-parties permettront de comparer nos données quant aux effets des RF sur la croissance et la température corporelle, l'activité locomotrice, l'anxiété et la mémoire spatiale (de l'apprentissage à la mémoire à long terme). Puis, dans une seconde partie, nous discuterons de l'impact des RF sur l'expression des gènes dans 2 régions cérébrales particulièrement impliquées dans la mémoire, à la fois en condition basale (sans apprentissage), pendant un apprentissage spatial et en condition de persistance d'un souvenir.

L'exposition aux RF (choix du protocole)

Les protocoles utilisés dans la littérature expérimentale sont très variés : durée d'exposition (chronique ou aigüe), 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. Comme nous le verrons dans cette discussion, cette importante hétérogénéité dans les études animales est très probablement à l'origine d'une grande discordance entre les résultats publiés depuis plus de 30 ans …

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi une exposition chronique de trois mois, avec une exposition quotidienne de 4h modélisant le quotidien de tous les utilisateurs de téléphonie mobile, qui sont exposés plusieurs heures par jour. De plus, considérant la durée de vie du rat qui est de 2 ans environ, la période d'exposition de 3 mois correspond à environ 10 ans chez l'Homme. Enfin, l'étude à 3 âges de la vie (adolescents-jeunes adultes, adultes et âgés) a permis de vérifier s'il existe une sensibilité aux effets des RF en fonction de l'âge, souvent évoquée mais pas encore démontrée (Klose *et al.* 2014). Afin de limiter le stress subi par l'animal pendant l'exposition, nous avons choisi une exposition corps entier en cage d'élevage. Cette exposition était réalisée dans une chambre réverbérante offrant un contrôle précis des paramètres de l'exposition, ainsi qu'une répartition homogène du signal LTE 4G (900 MHz, fréquence utilisée en Suisse) et la possibilité d'exposer jusqu'à 24 rats en même temps.

Les effets du type de signal choisi sur la biologie ou le comportement ne sont, à l'heure actuelle, pas encore publiés dans la littérature. Le signal LTE 4G est le réseau de données le plus récent utilisé (à l'exception de la 4G+ pour certains opérateurs), c'est pour ces raisons qu'il a été choisi dans le cadre de ma thèse.

L'exposition choisie pour cette thèse, quant à elle, est de type environnemental, soit équivalente à celle des antennes relais : elle correspond à la limite supérieure autorisée en France, soit 61 V/m pour le signal 4G. Cette valeur limite est basée sur une recommandation de l'Union Européenne et sur les lignes directrices de la Commission internationale de protection contre les radiations non ionisantes (ICNIRP) publiées en 1998. Cependant, il faut rappeler que le rapport de juillet 2013 du COPIC (un comité installé à la suite de la table-ronde sur les RF organisée par le ministère de la santé en 2009) a montré, suite aux mesures

effectuées sur 16 communes pilotes françaises, que 90% des niveaux d'exposition sont < 0,7 V/m et 99% sont < à 2,7 V/m.,

Enfin, nous avons choisi la valeur du débit d'absorption spécifique ou DAS (corps entier) de 0,33 W/kg, ce qui est 4 fois supérieur à la limite fixée par la recommandation européenne de 1999 ($DAS_{corps\ entier}$ = 0,08 W/kg).

Ainsi, lors de ma thèse, nous avons exposé nos rats de différents âges à un signal LTE 4G (900 MHz), avec un $DAS_{corps\ entier}$ = 0,33 W/kg et un champ électrique d'environ 61 V/m. Cette exposition chronique de 3 mois (4h/jour) a été réalisée dans une chambre réverbérante (IT'IS Foundation) en cage d'élevage.

Chapitre 1 : Effets des RF sur la physiologie, le comportement et la mémoire

I. RF et Croissance corporelle

Nos résultats montrent, pour les trois groupes d'âges, que l'évolution du poids n'est pas impactée par une exposition de 3 mois aux RF, ni dans le mois qui suit. Cependant, chez le groupe "Ados", nous observons un effet lié à la chambre (groupes RF et Sham) par rapport au groupe Témoin, avec une prise de poids moins rapide pour les rats exposés dans la chambre d'exposition (RF, Sham) que pour les témoins, qui persiste au moins 3 semaines post-exposition. Les jeunes rats seraient donc plus sensibles à l'environnement, mais sans effet propre des RF. Les conditions d'exposition pour les témoins sont différentes par rapport aux rats exposés dans la chambre, qui est relativement bien insonorisée. En effet, les rats témoins sont stabulés pendant les 4h dans la pièce contenant la chambre, et sont donc soumis aux bruits ambiants engendrés par le passage des expérimentateurs, des changements de cages (laverie attenante à la salle d'exposition) ou encore par le passage d'autres collaborateurs dans le couloir du laboratoire, occasionnant du bruit, qui est fortement atténué pour les rats Sham et RF. De plus, les conditions de luminosité sont également différentes entre l'intérieur et l'extérieur de la chambre réverbérante.

Ces différences sur les conditions environnementales (son et lumière) pourraient expliquer la prise de poids plus faible chez les rats exposés en chambre lorsqu'ils sont en période active de croissance ; ils seraient dans des conditions probablement moins stressantes durant 4h/jour pendant les 3 mois du protocole. De plus, les expositions ont lieu la journée, soit pendant la période de repos/inactivité des rats, et la chambre réverbérante pourrait leur avoir permis d'être plus au calme que les rats témoins. Cependant, pour vérifier cette hypothèse, il aurait été intéressant de mesurer par exemple les taux circulant de corticostérone ainsi que la prise alimentaire, mais le lien entre la prise alimentaire et le poids n'apparaît pas toujours clair (Shirai et al 2014).

Nos résultats confirment globalement les données de la littérature qui **ne montrent pas d'effet des RF** sur la croissance corporelle. C'est le cas de Tsurita et collaborateurs qui n'ont montré aucun effet d'une exposition chronique (1439 MHz, $DAS_{corps\ entier}$ = 0,25 W/kg et

$DAS_{tête}$ = 2W/kg, 1h/j pendant 2 ou 4 semaines) sur le poids corporel chez des rats mâles adultes (Tsurita *et al.* 2000). Kumlin et collaborateurs (Kumlin *et al.* 2007) obtiennent ce même résultat chez de jeunes rats (21 jours) exposés chroniquement (2h/jour, 5j/semaines, 5 semaines, 900 MHz) pour les deux DAS utilisés (0,3 et 3 W/kg).

Cette absence d'effet des RF est également retrouvé après une exposition chronique couvrant toute la vie ou presque. Ainsi, Falcioni et collaborateurs (Falcioni *et al.* 2018) n'ont montré aucun effet des RF sur 2448 rats mâles et femelles exposés à un signal de 1860 MHz (19h/j, avec 3 DAS différents : 0,001 ou 0,03 ou 0,1 W/kg). Klose et collaborateurs (Klose *et al.* 2014), quant à eux, ont exposé le cerveau de rates pendant 19 mois (900 MHz, 1h/jour dans un tube, 5j/semaine, $DAS_{tête}$ = 0,7 ou 2,5 ou 10 W/kg). Ils n'ont observé aucun effet des RF sur le poids, mais ils ont tout de même mis en évidence un poids plus faible chez les rates exposées (Sham et RF) par rapport aux Contrôles (restées dans leur cage) à partir du 13ème mois. Ceci montre un impact de leur système d'exposition sur le poids des rates adultes, comme nous l'avons observé chez nos rats "Ados". Pour ces auteurs, cette différence de poids serait la cause d'un stress chronique lié aux conditions d'exposition (contention de l'animal) (Moreira *et al.* 2016).

Cependant, deux études ont montré **des effets légers des R**F sur le poids corporel. Naranayan et collaborateurs ont montré une augmentation du poids après une exposition chronique aux RF (900 MHz, 1h/jour, DAS = 1,15 W/kg, 28 jours) chez le jeune rat (4 semaines) (Narayanan *et al.* 2015).

Nisbet et collaborateurs (Nisbet *et al.* 2016) ont montré, chez des rats exposés (2h/jour, DAS = 1,2 ou 3 mW/kg pour 900 MHz et DAS = 0,053 à 0,011 mW/kg pour 1800 MHz) à partir du 2^{e} jour postnatal pendant 90 jours, une augmentation du poids et de la taille. Cette différence était visible en début d'exposition et après la 6ème semaine pour les deux fréquences utilisées. Pour cette étude, le DAS utilisé est très faible comparé à celui utilisé dans notre exposition et dans une grande partie de la littérature.

Ces résultats sont retrouvés par Shirai et collaborateurs (Shirai *et al.* 2014) chez le rat mâle et femelle entre l'âge de 0 et 11 semaines, après une exposition avec un signal WCDMA 2140 MHz (DAS = 0,24 ou 0,08 W/kg) 20h/jour pendant 10 semaines (dont une exposition prénatale). Les auteurs ont noté une augmentation du poids des rats F1 exposés, mais non significative, ainsi que des modulations dans les générations F2 et F3.

Dans l'ensemble, les auteurs concluent que les effets des RF sur le poids corporel pourraient être obtenus par chance. Ceci rappelle nos propres données sur les 2 groupes d'adultes (Figure 94Figure 95, Annexe 2), dont un seulement a montré une baisse du poids chez les rats RF vs Sham et Témoins.

Le poids d'autres organes comme le cerveau a également été étudié après une exposition aux RF. C'est le cas de Zhang et collaborateurs en 2017 (J.-P. Zhang *et al.* 2017) qui n'ont montré aucun effet d'une exposition chronique (1800 MHz, 6h/jour pendant 4 semaines avec un $DAS_{tête}$ = 2,7 W/kg) sur le poids du cerveau, ni sur le poids corporel chez la souris mâle (4 semaines). De même, Jin et collaborateurs (Jin *et al.* 2011) n'ont montré aucune différence de poids corporel et des organes internes (dont le cerveau) après une exposition chronique d'un an (CDMA 849 MHz et WCDMA 1950 MHz en simultané soit un DAS = 4 W/kg, 45min/ jour, 5j/semaine).

A l'inverse, Shirai et collaborateurs (2014) ont montré une baisse significative du poids cérébral chez les générations F1 et F3 mâles au DAS élevé (0,24 W/kg).

La plupart des études ne mettent en évidence aucun impact des RF sur l'évolution du poids corporel des animaux du jeune à l'animal âgé. Cependant, une hétérogénéité des résultats a été montrée, y compris au sein de la même étude (nous et Shirai et al.). Le poids de différents organes internes y compris le cerveau n'est, a priori, pas impacté par une exposition chronique aux RF. On notera tout de même un effet du système d'exposition comme nous l'avons montré (rats "Ados"), également observé par Klose et collaborateurs.

II. RF et température

Nos résultats ne montrent aucune différence liée à l'exposition aux RF au niveau de la température corporelle, chez les trois groupes d'âge. Nous avons observé des variations de température, notamment une baisse essentiellement le matin après les 4h d'exposition, en lien avec les variations diurnes, et dans tous les groupes (Témoin, Sham et RF). Pour les expositions l'après-midi, la température corporelle reste relativement stable au cours des 4h d'exposition dans la chambre (RF, Sham) ou à l'extérieur (Témoins) pour les 3 groupes.

Nous avons également observé des fluctuations qui restent modestes à long terme avec une hausse ou une baisse de la température corporelle au cours des semaines d'exposition.

Un certain nombre d'études ont mesuré la température corporelle dans le but de vérifier que les conditions expérimentales permettent bien d'étudier les effets non thermiques d'une exposition aux RF et d'éliminer les effets thermiques possibles des RF. Dans notre cas, comme attendu, nous n'avons pas observé d'impact des RF sur la température corporelle avec un DAS de 0,33 W/kg, tout comme deux études avec un DAS de 0,4 W/kg (Ushiyama *et al.* 2014; Ohtani *et al.* 2016). En effet, Ushiyama et collaborateurs (Ushiyama *et al.* 2014) n'ont montré aucun effet des RF sur la température corporelle après une exposition chronique (WCDMA 2140 MHz, 3 jours, 2h/jour ou 10 jours, 1h/jour). Ces résultats sont retrouvés deux ans plus tard par la même équipe après une exposition avec le même signal (6h à 4 W/kg, ou 3h/jour pendant 3 jours à 4 W/kg, ou 6h/j pendant 3 jours à 0,4 et 4 W/kg) avec le DAS de 0,4 W/kg (Ohtani *et al.* 2016). En revanche, ces auteurs ont montré des effets thermiques de leurs expositions chroniques avec un DAS plus élevé (4 W/kg), avec une élévation de 1 à 1,5°C de la température corporelle. Cette équipe a également observé une augmentation de l'expression des gènes codant pour les HSP (*heat shock protein)* et HSF (*heat shock transcription factors*) dans le cerveau.

En revanche, d'autres études utilisant également un DAS plus élevé (2 et 4 W/kg) n'ont montré **aucun effet d'une exposition chronique sur la température corporelle**. En effet, Lee et collaborateurs (Lee *et al.* 2010) n'ont observé aucune variation de la température corporelle après une exposition chronique à un signal CDMA de 849 MHz (DAS = 2 W/kg, 2 x 45 min espacées de 15 min, 5j/semaine pendant 12 semaines) chez le jeune rat (4 semaines). Ces résultats ont été retrouvés et publiés deux ans plus tard par la même équipe (Lee *et al.* 2012), avec une exposition combinée (CDMA 849 MHz et WCDMA 1950 MHz avec un DAS = 4 W/kg, 45 min/jour, 5j/semaine, 12 semaines). Comme lors de l'étude précédente, ils ont mesuré la température avant et après les 45 min d'exposition, sans préciser si cette absence de variation était observée tout au long du protocole. Enfin, Kim et collaborateurs (J. H. Kim *et al.* 2018) ont exposé des souris de 6 semaines à un signal de 835 MHz (DAS = 4 W/kg, 5h/jour, pendant 12 semaines en cage d'élevage). Ils n'ont observé aucune variation de la température après les 5h d'exposition, ni 2h plus tard, et ceci tout au long de l'exposition chronique.

Enfin, dans la littérature, Yamaguchi et collaborateurs (Yamaguchi *et al.* 2003) ont exposé des rats adultes à un signal TDMA (1439 MHz, $DAS_{cerveau}$ = 7,5 W/kg : 1h/j pendant 4 jours ou 4 semaines, où $DAS_{cerveau}$ = 25 W/kg , 45 min/jour pendant 4 jours ou 1h/jour

pendant 4 semaines. Ils ont observé une augmentation constante de la température corporelle (mesure en IP par fibre optique) pendant l'exposition chez le groupe 25 W/kg uniquement. Ils en ont déduit que les déficits d'apprentissage et de mémoire observés en comportement (labyrinthe en T) chez ce groupe, seraient liés à l'augmentation de la température pendant l'exposition. Cependant, il est important de noter que le DAS de 25 est 12 fois plus élevé que la dose maximale autorisée chez l'Homme pour une exposition de la tête (2 W/kg).

L'absence d'effet des RF que nous avons constatée sur la température corporelle est globalement en accord avec la littérature pour des DAS inférieurs à 2W/kg, mais aussi parfois pour des DAS plus élevés (4 ou 7,5 W/kg). Cependant, lorsque le DAS dépasse 4 W/kg, des effets thermiques induits par une exposition aux RF sont possibles.

III. RF, anxiété et activité locomotrice

Dans notre étude, nous avons observé dans le labyrinthe en croix surélevé, des résultats semblables chez tous les groupes d'âge : les rats exposés au signal RF de type 4G ne montrent aucune différence de comportement par rapport aux rats Sham et Témoins. Ces résultats ont également été retrouvés en piscine de Morris avec l'étude de la thigmotaxie (un indicateur de l'anxiété), ne montrant aucun effet des RF sur ce paramètre pendant l'apprentissage. Seuls les rats "Agés" exposés aux RF montraient une diminution de la thigmotaxie lors du rappel à 1 jour vs les rats Sham. Lors des autres tests de rappel, aucun effet des RF sur la thigmotaxie n'a été constaté. Ces résultats ont été confirmés avec l'étude de l'activité locomotrice pendant 24h (actographie) et le nombre total d'entrées dans le labyrinthe en croix surélevé (*Elevated Plus Maze* ou EPM), qui ne montraient aucun effet de l'exposition chronique à un signal de type 4G, et ce quel que soit l'âge de l'animal. Cependant, nous avons observé une différence d'activité chez nos groupes "Ados" et "Adultes" exposés dans la chambre (Sham et RF). En effet, ces animaux présentaient une activité locomotrice légèrement plus élevée la nuit que chez le groupe Témoin, placé à l'extérieur de la chambre. Chez les "Ados", nous observons également une diminution de l'hyperactivité locomotrice observée à l'habituation chez les rats exposés à la chambre (Sham, RF) *vs* Témoins.

La plupart des études sur l'anxiété et l'activité locomotrice **ne montrent pas d'effet des RF**, tout comme dans nos résultats. En 2005, Cosquer et collaborateurs (Cosquer, *et al.*

2005) ont montré qu'une exposition aigüe (2450 MHz, DAS = 0,9 W/kg, 45 min, en condition de contention) n'impactait pas l'anxiété des rats mâles de 3 mois. C'est également le cas de Barthélémy et collaborateurs (Barthélémy *et al.* 2016) qui ont montré l'absence d'effet d'une exposition aigüe aux RF (15 min à 1,5 ou 6 W/kg ou 45 min à 6 W/kg) sur l'anxiété chez le jeune rat (6 semaines), et sur l'activité locomotrice en champ ouvert (*Open Field* ou OF). Une autre étude, avec une exposition aigüe (1800 MHz, DAS = 2,42, 2,86 ou 3,3 W/kg, 30 min) chez la souris (K. Wang *et al.* 2017) n'a également montré aucun effet sur l'activité locomotrice (OF).

D'autres études ont également montré **l'absence d'effet d'une exposition chronique** aux RF chez l'animal jeune et adulte.

Ainsi, Ammari et collaborateurs (Ammari *et al.* 2008) n'ont mis en évidence aucun effet des différentes expositions chroniques aux RF (900 MHz, 15 ou 45 min/j, DAS 6 et 1,5 W/kg, respectivement pendant 8 ou 24 semaines), chez le rat (6 semaines). Petitdant et collaborateurs (Petitdant *et al.* 2016, 2018) n'ont montré aucun impact d'une exposition chronique (900 MHz, DAS = 1,5 ou 6 W/kg, 45 min/j pendant 30 jours, en condition de contention) sur l'anxiété chez le jeune rat de 32 jours. Kumlin et collaborateurs (Kumlin *et al.* 2007) ont obtenu les mêmes résultats que Petitdant et collaborateurs (2016) chez le jeune rat mâle (21 jours) après une exposition chronique de cinq semaines (900 MHz, DAS = 0,3 ou 3 W/kg, 2h/jour). Enfin, une étude chez la souris (Kumar *et al.* 2016) n'a montré aucun effet d'un signal modulé de 2450 MHz (DAS = 0,019 W/kg, 2h/jour pendant 1 mois) sur l'anxiété (OF et EPM).

Cependant, en opposition à nos résultats, d'autres études montrent **un effet des RF sur l'anxiété et/ou l'activité locomotrice**.

En effet, Narayanan et collaborateurs (Narayanan *et al.* 2013) ont montré une augmentation de l'anxiété (EPM) chez les rats de 6-8 semaines exposés (téléphone portable (50 appels manqués en 1h/jour), 900 MHz, DAS = 1,15 W/kg, pendant 28 jours) sans impacter l'activité locomotrice. En 2018, la même équipe (Narayanan *et al.* 2018a) a surtout mis en évidence une hyperactivité et un comportement impulsif chez les rats exposés aux RF (conditions identiques à celles de 2013, avec un téléphone en mode silencieux). Les auteurs expliquent cette hyperactivité par des différences morphologiques de l'amygdale (arborisation dendritique et apoptose) chez les animaux exposés. Cette hyperactivité a également été

retrouvée par Kim et collaborateurs (J. H. Kim *et al.* 2018) chez leurs souris exposées (5h/j, DAS 4 W/kg, pendant 12 semaines).

Certains groupes de recherche se sont intéressés aux effets des RF chez le rongeur après une **exposition chronique fœtale**. Les résultats obtenus sont très hétérogènes, pouvant montrer une absence d'effet, une hyperactivité ou une hypoactivité. Ainsi, une étude récente (Petitdant *et al.* 2018) n'a mis en évidence aucun effet d'une exposition prénatale (900 MHz, DAS = 0,7 ou 2,6 W/kg, 45 min/jour, GD2 à GD20) sur l'activité locomotrice et l'anxiété chez le rat adolescent (43 jours) et jeune adulte (63 jours).

A l'inverse, Aldad et collaborateurs (Aldad *et al.* 2012), ont mis en évidence une hyperactivité des souris âgées de 8, 12 ou 16 semaines (test de la boite clair-obscur) après une exposition fœtale de 16 jours (jours de gestation GD1 à GD17, 800-1900 MHz avec un téléphone en silencieux, DAS =1,6 W/kg). Une autre étude a également mis en évidence une hyperactivité sur des souris mâles uniquement (pas chez les femelles) après une exposition fœtale (GD3 à 18, 9417 MHz, 12h/jour, DAS = 2 W/kg) (Yanchun Zhang *et al.* 2015).

Enfin, Haghani et collaborateurs (Haghani *et al.* 2013) ont montré qu'une exposition fœtale (900 MHz, DAS = 0,5-0,9 W/kg, 6h/jour, durant toute la gestation) induisait une diminution de l'activité locomotrice chez les rats exposés (mâles et femelles) par rapport aux Contrôles. Les auteurs ont également observé une absence d'effet des RF sur l'anxiété, mais un effet du sexe, avec une diminution de l'activité locomotrice chez les femelles (exposées et Contrôles) par rapport aux mâles.

Quelques rares études se sont intéressées à **l'effet des RF sur la locomotion à différents âges**. Klose et collaborateurs (2014) n'ont observé aucun impact des différentes expositions (900 MHz, DAS 0,7, 2, et 10 W/kg, de J14 à 19 mois, 2h/j, 5j/semaine, durant toute la vie des rates) sur l'anxiété (OF et *rotaroad*) aux différents âges testés (juvéniles, adultes et préséniles). Ils ont montré une augmentation modérée de l'activité chez les rates des groupes Sham et RF du groupe présénile (effet "chambre") et une augmentation des toilettages chez les rates adultes, exposées aux RF pour les 3 intensités. Cet effet "chambre" est attribué par les auteurs à l'absence de stimulation (handling) chez les rates Contrôles, ce qui n'est pas le cas de notre étude où les rats Témoins sont manipulés et isolés comme les RF et Sham pendant les 4h d'exposition quotidienne. De plus, comme dans notre étude et attendu, les auteurs montrent une baisse de l'activité et du comportement exploratoire général chez les

rats âgés *vs* rats plus jeunes. Cet effet de l'âge, notamment sur la réponse locomotrice à la nouveauté, est bien connu et décrit, notamment chez le rat Fisher 344 (Casadesus *et al.* 2001; Rosenthal *et al.* 1989). Enfin, Bouji et collaborateurs (Bouji *et al.* 2016) n'ont montré aucun effet sur l'activité locomotrice (OF) chez des rats adultes (4-6 mois) et âgés (22-24 mois) après une exposition aux RF (900MHz, 45 min/jour, pendant 1 mois, DAS 6 W/kg). En revanche, comme Klose et collaborateurs (2014), les rats âgés des 3 groupes (Contrôles, Sham et RF) présentaient une baisse significative de l'activité locomotrice par rapport aux rats plus jeunes.

D'après la littérature, une exposition aux RF affecte ou non l'anxiété et l'activité locomotrice. Cette hétérogénéité des résultats pourrait dépendre du type d'exposition chronique ou aigüe, de l'intensité, voire de l'espèce, rat vs souris. Cependant, nos résultats (absence d'effet sur l'activité locomotrice et sur l'anxiété) concordent avec la majorité des études utilisant une exposition chronique, même si quelques études montrent des résultats différents (Narayanan* et al. *2013, 2018; J. H. Kim* et al. *2018).

IV. Les RF impactent-elle la mémoire à long terme ?

L'impact des RF sur la mémoire a été bien étudié chez le rongeur, qu'il s'agisse d'une mémoire spatiale (labyrinthe à 8 ou 12 branches, piscine de Morris, labyrinthe en Y), d'une mémoire émotionnelle (conditionnement de peur) ou encore de la reconnaissance d'objets. La mémoire a été abordée aussi selon son décours temporel, soit la mémoire à court terme (mémoire de travail) *vs* la mémoire à long terme (c'est-à-dire, consolidée au niveau synaptique, mesurée quelques heures ou quelques jours après la fin de l'apprentissage) ; par contre, elle n'a pas été étudiée à des délais plus longs (quelques semaines chez le rongeur), soit une mémoire consolidée au niveau des systèmes (voir § introduction, chapitre 4).

Les 1ères études expérimentales qui ont pointé un effet possible des RF sur la mémoire avaient étudié la mémoire de travail. Ainsi, Lai et collaborateurs (Lai *et al.* 1994) ont montré des déficits de mémoire spatiale de travail (labyrinthe à 12 branches) chez des rats adultes exposés 45 min à un signal 2,45 GHz, DAS 0,6 W/kg dans un tube, juste avant chaque session comportementale (10 jours). Cependant, ces données n'ont pu être reproduites lors

d'expériences ultérieures, avec les mêmes conditions expérimentales, dans deux autres laboratoires (B. L. Cobb *et al.* 2000) dont le nôtre (Cassel *et al.* 2004; Cosquer, *et al.* 2005).

D'autres études ont suivi et n'ont montré pour l'essentiel aucun effet des RF sur la mémoire spatiale de travail, que l'exposition soit aigüe (Dubreuil *et al.* 2002, 2003) ou chronique (Sienkiewicz *et al.* 2000; Ammari *et al.* 2008; Maaroufi *et al.* 2014).

De même, Klose et collaborateurs (Klose *et al.* 2014) n'ont montré aucun effet d'une exposition aux RF (900 MHz, 2h/jour, 5j/semaine, DAS = 0,7 ou 2,5 ou 10 W/kg) pendant toute la vie (J14-19 mois) chez des rates jeunes, adultes et âgées, quant au nombre d'erreurs dans un labyrinthe à 8 branches (entrée dans une branche déjà visitée), et ceci quel que soit l'âge des rates.

Lors de l'étude de l'apprentissage en mémoire spatiale ainsi que le rappel d'un souvenir spatial en mémoire récente et ancienne, nous n'avons montré aucun effet des RF chez les rats "Ados" et "Adultes". Cependant, chez les rats "Agés", nous avons mis en évidence de meilleures performances de rappel chez les RF au délai de 8 jours, par rapport aux 2 autres groupes (Sham, Témoin). Enfin, en ce qui concerne le groupe "Adultes", lors du rappel en mémoire ancienne (25J), nous avons observé un "effet chambre", du fait que les rats témoins ne présentaient pas de souvenir de la localisation de la plateforme, alors que les 2 groupes exposés à la chambre (Sham et RF) montrent un souvenir de celle-ci.

Dans la littérature, il existe des études **ne montrant pas d'effet ou parfois un effet bénéfique** des RF sur la mémoire à long terme.

Ainsi, Dubreuil et collaborateurs (Dubreuil *et al.* 2002, 2003) n'ont montré aucun effet chez le jeune rat (120-150g) avec une exposition aux RF (900 MHz, pulsé 217Hz, DAS = 1 ou 3,5W/kg, 45 min, 14 jours) juste avant chaque session d'entrainement en mémoire spatiale (piscine de Morris en version sèche contenant 13 trous dont un seul est appâté). Une étude chez le jeune rat (Kumlin *et al.* 2007) a montré des effets bénéfiques sur les performances en mémoire spatiale à long terme, après une exposition de 5 semaines entre l'âge de 21 jours et 56 jours (RF 900 MHz, 2h/jour, 5 jours/semaines, DAS 0,3 ou 3 W/kg). Zhang et collaborateurs (J.-P. Zhang *et al.* 2017) n'ont également montré aucun effet d'une exposition chronique (1,8 GHz, 6h/jour, pendant 4 semaines, DAS_{corps} = 2,2 W/kg et $DAS_{tête}$ = 2,7 W/kg) sur l'apprentissage (5 jours) et le rappel à 24h mesurés chez la souris mâle de 4 semaines. De même, ils n'ont observé aucun effet sur le nombre de cellules dans les sous-régions de

l'hippocampe. En revanche, ils ont mis en évidence une baisse dans le cortex et l'hippocampe des taux de GABA et aspartate, mais pas d'altération du glutamate, ni de l'acétylcholine estérase ou AChE.

Cette absence d'effet des RF sur la mémoire à long terme a également été montrée avec d'autres tests non-spatiaux comme le conditionnement de peur ou la reconnaissance d'objets (ROR). En effet, dans une étude publiée en 2016 (Bouji *et al.* 2016), Bouji et collaborateurs ont montré qu'une exposition chronique (900 MHz, DAS 6 W/kg, 45min/jour, pendant 20 jours) n'impactait pas la mémoire émotionnelle à court (3h) et long terme (24h), chez des rats mâles adultes (4-6mois) et âgés (22-24 mois). Ces données ne montrent donc pas d'effet de l'âge chez l'adulte sur la sensibilité/vulnérabilité aux RF. Ceci est en accord avec nos données en mémoire spatiale pour un signal RF de type 4G, tout comme les données obtenues après une exposition lors du développement de l'animal. En effet, cette absence d'impact des RF a été retrouvée par le même groupe lors d'une exposition postnatale (900 MHz, 45 min/jour, P32-P62, DAS = 1,5 ou 6 W/kg, Petitdant *et al.* 2016) ou prénatale (900 MHz, 45 min/jour, GD2-GD20, DAS = 0,7 ou 2,6 W/kg, Petitdant *et al.* 2018). Dubreuil et collaborateurs (Dubreuil *et al.* 2003), quant à eux, n'ont également pas montré d'effet d'une exposition aigüe (900 MHz, exposition tête, 45min/jour de test, DAS = 1 ou 3,5 W/kg) sur la ROR chez le jeune rat mâle (120g), en accord avec leurs données en mémoire spatiale (labyrinthe radial à 8 branches).

A l'opposé de ces études et de nos résultats, certaines études montrent qu'une **exposition aux RF induit des déficits** chez l'animal en mémoire à long terme.

C'est le cas de Wang et Lai (B. Wang et Lai 2000), qui ont confirmé que les altérations par les RF après une exposition aigue (tube, 2,45 GHz, 1h/jour de test, DAS corps entier 1,2 W/kg) en mémoire spatiale de travail, s'appliquaient également pour une mémoire spatiale à long terme testée en piscine de Morris (déficits lors de l'apprentissage et du rappel à 24h). Fragopoulou et collaborateurs (A.F. Fragopoulou *et al.* 2010) ont également montré une baisse des performances à l'apprentissage sur 4 jours (4 essais/jour) et lors du rappel 2h post-apprentissage, chez les souris mâles exposées aux RF (900 MHz, 2h/jour, pendant 50 jours, DAS 0,41-0,98 W/kg). Ces auteurs démontrent un effet massif des RF, rarement rencontré, en particulier considérant le délai pour le rappel très court (2h post-apprentissage). Cette baisse des performances en mémoire spatiale est également retrouvée dans d'autres études (Lu *et al.*

2012; Narayanan *et al.* 2015). Deux études plus récentes ont également mis en évidence les mêmes résultats (Shahin *et al.* 2015, 2018). En effet, les auteurs ont montré chez la souris adulte qu'une exposition à un signal RF continu de faible intensité (2,45 GHz, 0,0146 W/kg, 2h/jour pendant 15, 30 ou 60 jours) altérait très significativement l'apprentissage et le rappel d'une mémoire de référence spatiale, dans la piscine de Morris et dans un labyrinthe à 8 branches. Ces changements s'accompagnaient, dans l'hippocampe, d'une diminution de l'arborisation dendritique et de la densité des épines dendritiques des neurones, ainsi qu'une mort cellulaire par apoptose avec l'implication d'un stress oxydant et nitrosatif (espèces réactives de nitrogène ou RNS). Les données de 2018 proposaient des mécanismes de stress locaux induisant la suppression de la voie de signalisation iGluR/ERK/CREB dans les sous-régions de l'hippocampe, voie impliquée dans la plasticité cérébrale et la mémoire (Kelleher *et al.* 2004).

Ces effets induits par une exposition aux RF sont également retrouvés dans d'autres tests non-spatiaux. Ainsi, Bouji et collaborateurs (Bouji *et al.* 2012) ont mis en évidence chez le jeune rat (6 semaines) , une augmentation des taux de corticostérone, sans impact sur la mémoire émotionnelle, et inversement chez les rats de 12 mois, après une exposition aigue (15 min, 900 MHz, DAS 6 W/kg). Ceci pourrait refléter une augmentation, dépendante de l'âge, de la mémoire émotionnelle induite par les RF, sans lien avec les taux circulants de corticostérone ou des modifications de la neuro-inflammation dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet ou le striatum. La même équipe (Barthélémy *et al.* 2016) a montré une baisse des performances de mémoire émotionnelle au contexte à long terme (25h post-RF), uniquement chez les rats exposés 15 min à un DAS élevé (6 W/kg, 900 MHz).

Ces déficits de mémoire à long terme sont également retrouvés avec le test de reconnaissance d'objet (Maaroufi *et al.* 2014; Hassanshahi *et al.* 2017), chez le rat jeune et adulte, après une exposition chronique.

Enfin, Wang et collaborateurs (K. Wang *et al.* 2017) est l'une des rares études à montrer une amélioration des performances en reconnaissance d'objets chez la souris, après une exposition aigüe de 30 min aux RF (1800 MHz, DAS entre 2,2 et 3,3 W/kg) et pas au DAS de 1,98 W/kg. Cet effet persistait au moins 8 jours post-exposition (DAS 3,3 W/kg). Ces changements s'accompagnaient d'une augmentation du nombre des épines dendritiques dans

l'hippocampe, mais pas dans le cortex préfrontal : dans cette dernière structure, seule la longueur des épines était augmentée par les RF (pas de changement pour leur nombre, ni leur diamètre).

D'autres travaux ont abordé l'effet de l'âge. Ainsi, Klose et collaborateurs (Klose *et al.* 2014) n'ont pas montré d'effet d'une exposition aux RF pendant toute la vie (J14-19 mois) sur la mémoire spatiale de référence (labyrinthe à 8 branches), ceci quel que soit l'âge des rates. De même, aucune différence d'apprentissage (6 jours) et de rappel à 7 jours après la fin de l'apprentissage entre les groupes (0, 0,7, 2,5 et 10 W/kg) et pour les trois âges n'a été mise en évidence dans le test de la piscine de Morris (bien que le test rappel soit un essai identique à l'apprentissage 7 jours après la fin de l'acquisition où le temps pour rejoindre la plateforme est mesuré). De même, Bouji et collaborateurs (Bouji *et al.* 2016) ont étudié, chez le rat adulte (4-6 mois) et âgé (22-24 mois), la mémoire spatiale de référence dans un labyrinthe radial, après une exposition de 1 mois (45 min/jour), 900 MHz, DAS 6 W/kg et n'ont montré aucun effet des RF, seulement un effet de l'âge, les rats âgés présentant de moins bonnes performances que les rats plus jeunes.

A la suite des premiers résultats sur la mémoire à court terme de Lai et collaborateurs en 1994, montrant des effets délétères des RF, le nombre d'études sur les RF et leur impact sur la mémoire à court- et long terme a considérablement augmenté. Les résultats variables s'expliqueraient au moins en partie par les conditions des expériences (exposition, espèce, âges des animaux, moment de l'exposition). De nombreuses données montrent cependant une absence d'effet sur la mémoire spatiale à court et long terme et sur les mémoires non-spatiales chez le rat ou la souris. Nos résultats, pour un signal RF nouveau (4G) dans cette littérature, vont dans le même sens et proposent en plus que la persistance des souvenirs ne serait pas affectée (ce qui n'avait pas encore été montré).

Chapitre 2 : Effets des RF sur l'expression des gènes en condition basale et de mémoire

Les résultats marquants, dont certains seront discutés dans cette section, sont résumés ci-après.

L'étude de l'impact des RF sur le génome dans l'hippocampe dorsal nous a permis de mettre en évidence un effet significatif des RF en condition "Basal", avec 427 gènes modulés, en lien avec la traduction et les processus métaboliques (analyse fonctionnelle). Cependant, l'exposition aux RF de rats soumis à un apprentissage spatial, ne produit plus que 2 gènes dérégulés. Ceci suggère que l'exposition aux RF affecterait peut-être des processus mis également en jeu au cours d'un apprentissage dans l'hippocampe dorsal.

Dans le CPFm en condition "Basal", nous avons montré que 80 gènes étaient modulés par les RF, dont la majorité des gènes sous-exprimés étaient communs avec ceux de la comparaison "Sham *vs* Témoin", et donc que ces gènes seraient en fait surexprimés chez les Sham par rapport aux deux autres groupes. Il serait possible qu'ils soient induits par le fait de mettre les rats dans la chambre d'exposition et que l'exposition en elle-même induise leur répression. Cependant, on note que ceci ne se retrouve pas en condition "Apprentissage" (55 gènes sous-exprimés très différents).

A long terme (soit 33 jours après l'arrêt de l'exposition) et en condition "Basal" dans le CPFm, nous n'avons observé aucun impact des RF sur l'expression des gènes. Ainsi, les effets que nous avions observés dans cette structure en "Basal" 3 jours après la fin des expositions ne sont pas retrouvés un mois plus tard, laissant supposer un effet des RF court et non durable dans le temps. Cependant, après un apprentissage, nous avons observé un grand nombre de gènes sous-exprimés (261 gènes), en lien avec la synapse, la cellule et la phosphorylation oxydative. Parmi ces gènes sous exprimés, 45 gènes l'étaient déjà au moment de l'apprentissage, montrant un effet des RF dans le temps.

Après ces analyses menées par RNA-seq, nous avons choisi une vingtaine de gènes par structure (Hip dorsal et CPFm) pour l'effet des RF à court terme, ainsi que 8 gènes pour l'effet des RF à long terme, pour une validation par RT-qPCR sur un nombre d'échantillons

plus grand. Les résultats n'ont pas permis de valider les modulations génétiques observées par RNA-seq chez le groupe "Adultes". Cependant, nous avons observé la modulation de certains gènes : *Abca5*, *Med1* et *Gria1* chez les "Ados", *Bmyc* chez les "Agés" dans l'Hip dorsal; et *Tor1aip2*, *Hdac10*, et *Col27a1* chez les "Adultes" dans le CPFm et *Tspan2* chez les "Ados".

Pour les gènes d'activité neuronale (*c-fos* et *Egr1*), appelés également gènes précoces, l'induction par l'apprentissage observée en RNA-seq a été validée avec la RT-qPCR. De plus, aucun effet des RF n'est observé en condition "Basal" ou "Apprentissage" pour les trois groupes d'âge, ce qui est en accord avec les résultats de comportement et d'autres études de la littérature (Fritze, Sommer, *et al.* 1997; John W. Finnie 2005; John W. Finnie *et al.* 2006, 2007). Cependant, nous avons remarqué que pour le gène *Egr1*, l'induction après 3 jours d'apprentissage chez les rats du groupe "Agés" n'était pas significative au sein du groupe RF, et significativement moins élevée chez les rats "Ados" pour le groupe RF *vs* Sham. Pour le gène c-fos, nous avons observé une diminution de son expression en condition "Basal" chez les RF et les Sham dans l'Hip dorsal pour les rats "Adultes" et une tendance dans le CPFm pour ce même âge. Ce résultat, pouvant provenir d'un effet "chambre", est également retrouvé chez les "Ados" dans le CPFm. Ceci pourrait expliquer le fait que seuls les rats RF et Sham rappelaient un souvenir en mémoire ancienne chez les "Adultes".

L'analyse des gènes modulés par l'apprentissage montrait des résultats hétérogènes dans l'hippocampe dorsal. Seule la condition Sham montrait la modulation d'un grand nombre de gènes. Cependant, les gènes précoces (impliqués dans l'activité neuronale) étaient induits par l'apprentissage dans les trois groupes. Dans le CPFm, les gènes induits par l'apprentissage étaient plus nombreux et en lien avec la transcription, les régulations des processus biologiques et cellulaires et la phosphorylation oxydative. Pour les gènes sous-exprimés, les gènes communs modulés par l'apprentissage sont très différents et ne montrent pas de regroupement fonctionnel significatif.

I. RF et approches génétiques : toute une histoire

I.1. Des résultats de RNA-seq dans l'Hip dorsal en "demi-teinte"

Les résultats obtenus par RNA-seq dans l'Hip dorsal nous sont apparus assez hétérogènes, vis-à-vis du nombre de gènes modulés lorsque l'on observe les différentes

comparaisons ("RF *vs* Sham", "RF *vs* Témoin", "Sham *vs* Témoin"), mais aussi vis-à-vis du nombre de gènes modulés par l'apprentissage au sein de chaque condition expérimentale (Témoin, Sham, RF).

L'hippocampe est une structure cérébrale très hétérogène, avec des régions très différentes contenant elles-mêmes des cellules de nature différente : neurones pyramidaux (cornes d'Amon), neurones granulaires (gyrus dente) et non-pyramidales (cellules en corbeille, les neurones fusiformes, les cellules en corbeille de type pyramidal, les cellules bipolaires et multipolaires) (Caeser et Aertsen 1991). De plus, l'hippocampe peut être découpé en 3 sous-parties : l'hippocampe dorsal, intermédiaire et ventral. Dans nos expériences, nous avons choisi de couper l'hippocampe uniquement en deux sous-parties, dorsale et ventrale. Cette "découpe" sépare l'hippocampe intermédiaire en deux, le répartissant entre l'Hip dorsal et l'Hip ventral. Suivant la "précision" de la dissection, l'échantillon d'Hip dorsal peut contenir une part plus ou moins grande d'Hip intermédiaire voire d'Hip ventral. Or, il a déjà été montré que l'expression des gènes est différente selon la sous-partie étudiée (Fanselow et Dong 2010), comme par exemple *Wfs1* (Wolfram Syndrome 1) exprimé dans CA1 dorsal et *Htr2c* (5-Hydroxytryptamine Receptor 2C) dans CA1 ventral.

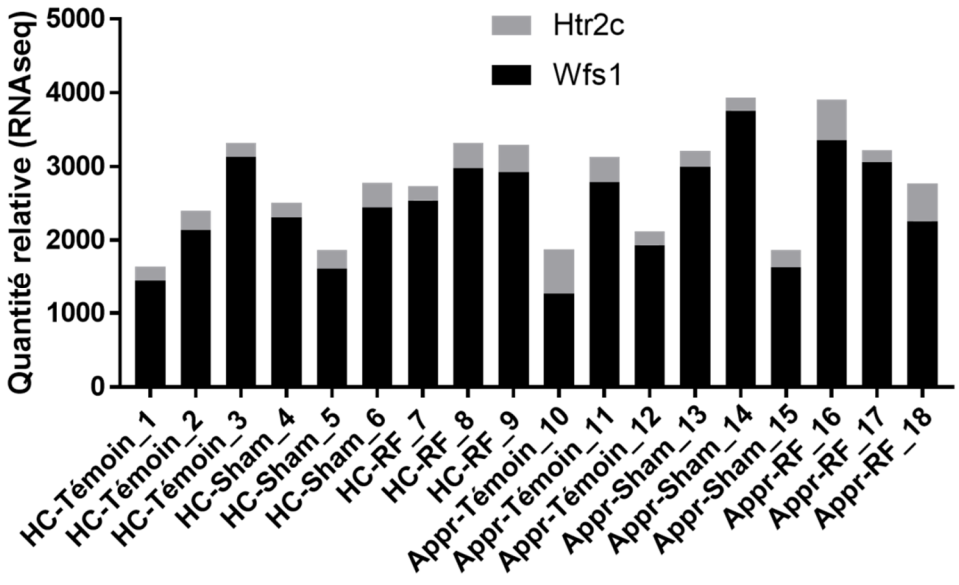


Figure 84 : Evaluation du ratio dorsal/ventral dans l'Hip dorsal.
L'expression des gènes htr2c, et wfs1 est obtenue à partir des données de RNA-seq effectuées sur des extraits d'ARNm de la dissection de la partie dorsale de l'Hip. Les échantillons utilisés pour le séquençage sont identifiés par leur nom de groupe suivi d'un numéro de 1 à 18.

Cette hétérogénéité des tissus hippocampiques pourrait en partie rendre compte de la modulation variable des gènes obtenue par RNA-seq. Cependant, nous avons vérifié l'expression de ces gènes dans les RNA-seq pour confirmer les dissections (ventral *vs* dorsal ; Figure 84) mais n'avons observé que peu de différences entre les échantillons. Pour rappel, les échantillons retirés sont : HC-Témoin_2, HC-RF_7 et Appr-Témoin_12 ; ce ne sont pas ceux dont le ratio dorso-ventral est le plus faible (correspondant à une contamination de l'Hip dorsal par l'Hip ventral).

En plus de l'hétérogénéité des tissus au sein de l'hippocampe, d'autres paramètres tels que l'heure et/ou le jour de dissection, les ratios de DO (densité optique ; pouvant révéler des contaminations) peuvent expliquer cette hétérogénéité dans la modulation de l'expression des gènes. Afin de confirmer ces résultats, un nouveau séquençage des ARNm d'un nouveau groupe de rats "Adultes" sera réalisé fin 2018.

I.2. La validation par RT-qPCR

Après l'analyse des résultats de RNA-seq, nous avons réalisé des validations par RT-qPCR chez les "Adultes". Nous avons également mesuré l'expression de ces gènes "a priori" modulés chez les "Adultes" dans les deux autres groupes d'âge ("Ados" et "Agés"). Aucune modulation de gènes par les RF visible en RNA-seq n'a été confirmée en RT-qPCR sur les gènes sélectionnés, dans l'Hip dorsal comme dans le CPFm. Rappelons que les RT-qPCR ont été réalisées sur un plus grand nombre d'échantillons (n = 6 contre n = 3 pour le RNA-seq). Pour le groupe des "Adultes", 3 rats sur les 6 validés en RT-qPCR ont déjà été séquencés en RNA-seq, limitant la force de cette validation. En revanche, il faut noter que pour les gènes précoces (*c-fos* et *Egr1*) induits par l'apprentissage, leur modulation est validée par RT-qPCR, et ce, pour tous les groupes.

Nous avons sélectionné des gènes à valider selon de nombreux critères, comme leur appartenance à un groupement fonctionnel, un FC important (faisant partie des 20 gènes les plus modulés de la comparaison choisie), ou encore leur utilisation au sein du laboratoire. Cette sélection (cf tableau de sélection) montre des expressions de gènes variables pouvant être importantes en "Basal". Ceci pourrait expliquer le fait que seules les gènes *c-fos* et *Egr1* sont validés en RT-qPCR après un apprentissage. En effet, leur niveau d'expression en "Basal" est faible, ce qui permet de mettre en évidence plus facilement leur induction.

Ceci montre que lorsque l'induction est forte (Log2(FC) > 1, soit deux fois plus élevée), elle peut être validée par RT-qPCR. La validation par cette technique n'est pas

toujours systématique et ne permet pas toujours de valider les résultats de séquençage, car finalement l'analyse par RT-qPCR est moins sensible que l'analyse par RNA-seq (James P. McNamee *et al.* 2016; Adamantia F. Fragopoulou *et al.* 2018). Dans le cadre de notre travail, nous ne nous attendions pas à des modulations très fortes par les RF. La validation par RT-qPCR pourrait ne pas être la meilleure solution pour étudier les effets des RF sur le génome. Le séquençage d'ARNm, plus sensible, serait à privilégier, et sur un grand nombre d'échantillons.

I.3. Le comportement et la génétique pas toujours en accord

Nos résultats en piscine de Morris n'ont montré aucun effet délétère de l'exposition chronique aux RF quel que soit le groupe d'âge et le délai (1J ou 8/25J) considérés. Pour le groupe "Agés", nous avons même observé une amélioration des performances mnésiques chez les RF au rappel de 8 jours. En condition "Apprentissage", nous avons mis en évidence 57 gènes modulés dans le cortex préfrontal médian et 261 gènes qui restaient modulés 33 jours après l'arrêt de l'exposition (effet à long terme). Bien que ces gènes relativement nombreux sont en partie connus pour leur implication dans la mémoire (voir § suivant), nos résultats comportementaux laissent à croire que la modulation de ces gènes n'impacterait pas les performances en mémoire ancienne.

Même si les résultats comportementaux n'ont montré aucun impact des RF sur la mémoire, les résultats de RNA-seq ont mis en évidence des modulations de gènes par les RF en "Basal" et "Apprentissage", ainsi qu'à long terme.

II. <u>Effets des RF sur le génome</u>

II.1. En condition "Basal" dans l'Hip dorsal

L'analyse RNA-seq montre une surexpression de 347 gènes par les RF en condition "Basal" dans l'Hip dorsal. L'analyse fonctionnelle de ces gènes a permis de mettre en évidence des regroupements de gènes en lien avec la traduction, le ribosome, les processus métaboliques et la phosphorylation oxydative. Ces regroupements sont également retrouvés lors de l'analyse fonctionnelle des 500 gènes les plus surexprimés par l'apprentissage chez les Sham. Nous avons croisé les 347 gènes surexprimés chez les RF en "Basal" avec les 500 gènes surexprimés par l'apprentissage et obtenu 200 gènes communs (Figure 85).

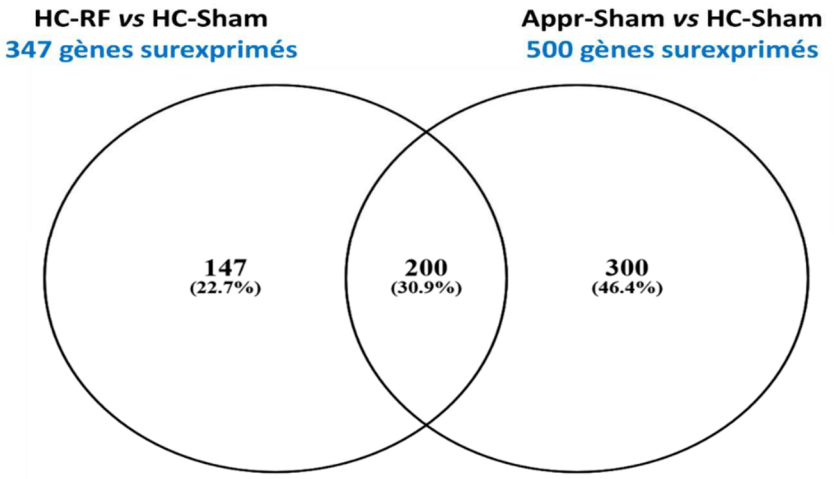


Figure 85 : Comparaison entre les 347 gènes surexprimés ("HC-RF *vs* HC-Sham") et les 500 gènes les plus surexprimés ("Appr-Sham *vs* HC-Sham").

L'analyse fonctionnelle de ces gènes communs confirme nos observations, avec la mise en évidence, en outre, de clusters regroupant des gènes en lien avec la traduction (p-value = $1{,}27E^{-9}$), le ribosome (p-value = $7{,}94E^{-11}$), les processus métaboliques (p-value = $3{,}69E^{-6}$), les fonctions moléculaires (p-value = $4{,}85E^{-6}$) et la phosphorylation oxydative (p-value = $6{,}81E^{-7}$) (Figure 86).

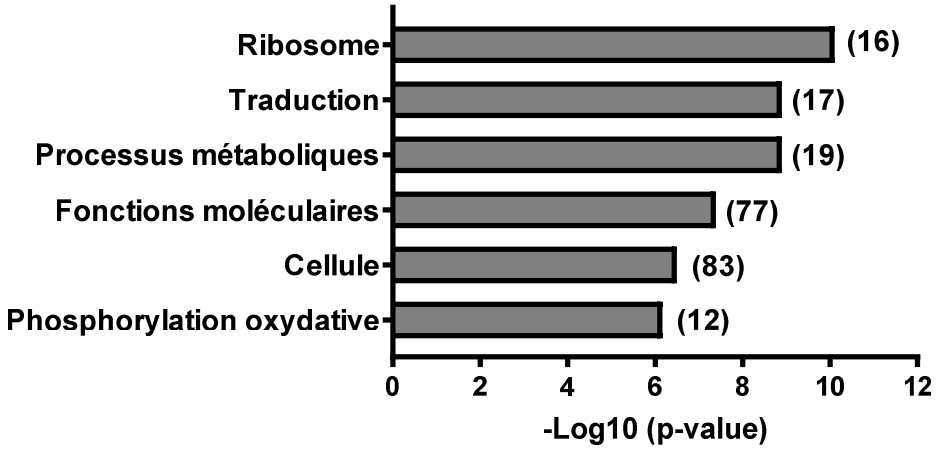


Figure 86 : Exemples de clusters obtenus par STRING pour les 200 gènes communs surexprimés chez les RF en "Basal" et chez les Sham après l'apprentissage.

L'exposition aux RF aurait ici un effet similaire à l'apprentissage sur l'expression des gènes, déjà en condition "Basal". Sans pouvoir préjuger des conséquences de cet effet à long terme, il n'est pas à l'encontre des mécanismes d'apprentissage mis en jeu en mémoire

spatiale. Il s'agira de vérifier si l'expression de ces gènes est maintenue dans le temps (effet à long terme).

II.2. En condition "Apprentissage" et "LT-Apprentissage" dans le CPFm

Suite à l'exposition aux RF, nous avons observé dans le CPFm 55 gènes sous-exprimés en condition "Apprentissage", soit 3 jours après l'arrêt de l'exposition, et 261 gènes sous-exprimés en condition "LT-Apprentissage", soit 33 jours après l'arrêt de l'exposition. La comparaison entre ces deux groupes de gènes a mis en évidence 45 gènes en commun, c'est-à-dire que 45 gènes sous-exprimés 3 jours après l'arrêt de l'exposition, l'étaient encore 30 jours plus tard.

L'analyse fonctionnelle de ces gènes n'a pas permis de mettre en évidence des regroupements. Cependant, nous avons retrouvé des gènes impliqués dans la transcription (Rpl36, Bmyc et JunD), la cellule et son devenir (C1qntf4, Gadd45g, Ckb, Rprml et Tomm6), et des kinases impliquées dans différents métabolismes (Camk2n2, Cdk5r2 et Galk1).

Parmi les gènes ci-dessus, certains sont connus dans la littérature pour être impliqués dans la mémoire (formation et/ou maintenance). Par exemple, il a été mis en évidence que le gène Gadd45g était impliqué dans la mémoire via l'induction des gènes précoces et la déméthylation de l'ADN (Sultan *et al.* 2012; X. Li *et al.* 2018). Un autre gène important appartenant aux gènes précoces est JunD, dont l'augmentation lors de la PLT est prouvée (Lynch 2004). Ckb (créatine kinase) reste également très importante dans le domaine de la mémoire à long terme, en effet, Jost et collaborateurs (Jost *et al.* 2002) ont montré que des souris KO pour la Ckb montraient une baisse des performances en mémoire spatiale. De plus, une augmentation de la créatine, que la Ckb transforme en phosphocréatine, améliorerait les performances mnésiques (Snow *et al.* 2018). Enfin, Camk2n2 est un inhibiteur de CamKII. Il a été mis en évidence que son inhibition impacterait la mémoire à long terme sans avoir d'effet sur l'apprentissage, et qu'à l'inverse, sa surexpression dans l'hippocampe empêcherait la formation de la mémoire émotionnelle sans en impacter la maintenance (F. Vigil *et al.* 2014, 2017).

L'analyse fonctionnelle des 261 gènes sous exprimés à long terme par les RF révélait des clusters regroupant des gènes en lien avec la phosphorylation oxydative, la synapse et les de jonctions cellulaires. La phosphorylation oxydation permet la production d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). La répression de cette voie ainsi que des gènes

impliqués dans la synapse et les jonctions cellulaires, laisse penser que les RF réprimeraient des gènes nécessaires à la communication synaptique sur le long terme.

L'importance de ces gènes dans la formation de la mémoire et sa maintenance à long terme laisse à penser que leur répression dans le CPFm à long terme pourrait entrainer la perte du souvenir. Cependant, rappelons que les résultats de comportement ne montrent aucun déficit de mémoire à ce délai. Cette diminution de l'expression des gènes n'impacterait pas la mise en place du processus de rappel à long terme à ce délai. Un effet potentiel à plus long terme reste à établir.

II.3. Comparaison entre l'Hip dorsal et le CPFm

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que l'exposition chronique aux RF induisait, en condition "Basal", des gènes (347) impliqués dans l'apprentissage dans l'hippocampe dorsal. D'un autre côté, cette exposition réprimait aussi des gènes (261 gènes) en lien avec l'apprentissage, 33 jours après l'arrêt des RF (et 25 jours après un apprentissage spatial) dans le CPFm. La comparaison entre ces deux groupes de gènes met en évidence 108 gènes en commun (Figure 87). L'analyse fonctionnelle de ces derniers montrent plusieurs clusters, dont deux représentés dans deux noyaux distincts : "constituants du ribosome" (6 gènes, *p-value* = 0,033) et "phosphorylation oxydative" (9 gènes, *p-value* = $3{,}97E^{-6}$). On notera également la présence de clusters regroupant des gènes en lien avec la maladie de Huntington, d'Alzheimer et de Parkinson (8-9 gènes, p-value comprise entre $1{,}3E^{-4}$ et $1{,}18E^{-5}$).

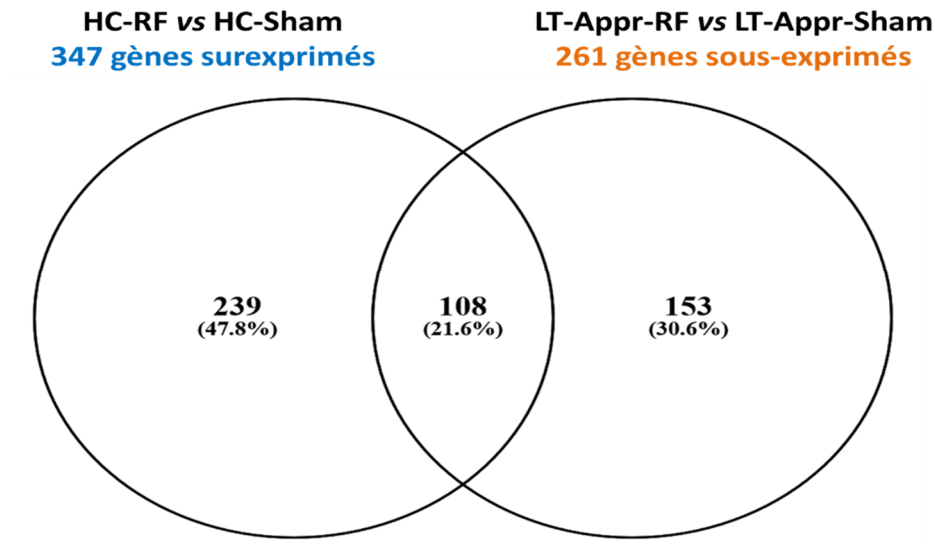


Figure 87 : Comparaison entre les 347 gènes surexprimés ("HC-RF vs HC-Sham") et les 261 gènes sous-exprimés ("LT-Appr-RF vs LT-Appr-Sham").

Cette comparaison permet de montrer que les gènes induits par les RF en "Basal" dans l'hippocampe sont finalement en grande partie réprimés à long terme dans le CPFm.

L'étude de l'expression des gènes a montré que les RF induiraient l'expression des gènes en lien avec l'apprentissage en condition "Basal" dans l'Hip dorsal. Ces gènes ne sont pas retrouvés en condition "Apprentissage", car ils seraient induits chez tous les groupes. Dans le CPFm, les gènes modulés à la fois en "Basal" et "Apprentissage" sont différents de ceux retrouvés dans l'Hip dorsal. Cependant, dans les effets à long terme, on retrouve un grand nombre de gènes sous-exprimés 25 jours après un apprentissage spatial de 8 jours. Une partie de ces gènes l'étaient déjà au bout de 3 jours d'apprentissage, montrant un effet à long terme des RF. Parmi ces gènes, on retrouve des gènes en lien avec la mémoire à long terme, ce qui est étonnant vis-à-vis de nos résultats comportementaux. Cependant, la diminution de l'expression de ces gènes n'empêcherait pas le rappel d'un souvenir en mémoire ancienne en condition de rappel.

Conclusions & perspectives

Conclusions

Cette étude sur les effets d'une exposition chronique (3 mois chez le rat, soit environ 10 ans pour l'Homme) à un signal LTE 4G est la première étude sur ce type d'ondes. En effet, de nombreux articles exposent encore à ce jour des résultats sur des signaux de type 2G et 3G, bien que la 4ème génération soit déjà en fonctionnement depuis plus de 8 ans. Notre exposition de type environnementale est réalisée avec le champ électrique maximal autorisé en France, soit 61 V/m ce qui est bien supérieur à sa valeur mesurée (< 2,7 V/m, d'après le rapport COPIC 2013). De plus, le DAS utilisé (0,33 W/kg) est, quant à lui, 4 fois supérieur à la limite fixée pour une exposition corps entier (0,08 W/kg).

Avec ces paramètres d'exposition, nos résultats ne montraient pas d'effet des RF au niveau comportemental (anxiété, activité locomotrice et mémoire spatiale). En revanche, nous avons observé un effet biologique avec la modulation de gènes dans l'hippocampe dorsal et le cortex préfrontal médian. Cependant ces variations d'expression ne sembleraient pas impacter les capacités mnésiques dans nos conditions expérimentales. Avec notre exposition, nous pu observer un effet "chambre" chez "Ados" au niveau du poids corporel et chez les "Adultes" lors du rappel d'un souvenir ancien et dans l'expression basale de *c-fos*. Cet effet pourrait être dû à des conditions différentes d'exposition, avec probablement un stress plus faible chez les animaux entrant dans la chambre (moins de bruit et de passage, ainsi qu'une lumière différente). En effet, il est clairement démontré qu'un stress aigu ou chronique altère les performances en mémoire spatiale (Moreira *et al.* 2016).

Enfin, les effets d'un signal 4G ne seraient pas différents selon l'âge de l'individu, tout comme il l'a déjà été montré avec un signal différent (Klose *et al.* 2014; Bouji *et al.* 2016).

Perspectives

Cette première étude sur les effets d'une exposition chronique d'un signal 4G (900 MHz, DAS = 0,33 W/kg) a permis de montrer qu'il n'y aurait pas d'effet négatif des RF sur divers aspects du comportement et de la cognition. Nous avons été les premiers à montrer qu'une exposition chronique aux RF n'impacterait pas la mémoire à long terme ancienne chez le rat âgé de 5 et 10 mois, avec un effet "chambre" chez les "Adultes". Ce dernier pourrait également être retrouvé chez les rats "Agés". Cependant, lors du rappel à 8 jours pour ce groupe d'âge, nous n'avons pas observé cette effet, notamment parce que la consolidation système (plus lente que la consolidation synaptique) ne serait pas encore totalement terminée.

Il serait donc intéressant de tester les rats "Agés" 25 jours après l'apprentissage (en piscine de Morris) avec de vérifier la présence ou non de cet effet chambre.

En biologie moléculaire, l'étude de l'expression des gènes a mis en évidence un grand nombre de gènes modulés par les RF en condition "Basal" dans l'Hip dorsal. Cependant, l'hétérogénéité de ce dernier (différentes populations de neurones et plusieurs sous-régions) pourrait expliquer nos résultats hétérogènes. Afin de confirmer nos résultats, sur un nombre d'échantillons plus important, les ARNm d'un deuxième lot de rat "Adultes" seront séquencés fin 2019. De plus, afin d'étudier les effets à long terme des RF dans cette structure, le RNA-seq de l'hippocampe dorsal en condition 2 (effet à long terme) est envisager afin de vérifier si les effets observés 3 jours après la fin de l'exposition se maintiennent dans le temps.

De nombreuses études (voir pour revue, J. P. McNamee et Chauhan 2009) se sont intéressé à l'impact des RF sur le stress. Donc, afin de compléter nos données, il serait intéressant d'étudier des régions impliquées dans le stress comme l'amygdale ou l'hippocampe ventral (structure déjà disponible). On pourrait peut-être expliquer l'effet chambre à l'aide de ces deux structures.

Lorsque l'on s'intéresse à l'exposition environnementale, on s'aperçoit que le corps est soumis à plusieurs types de RF artificielles (amenées par l'Homme), telles que la Wi-Fi, le Bluetooth, la 2G, la 3G, la 4G et bientôt la 5G. Or dans nos conditions, nous n'avons exposé nos animaux qu'a un seul signal (LTE 4G). Un futur projet, au laboratoire, pourrait s'intéresser à la combinaison de plusieurs signaux comme l'association 4G et 5G.

Un autre paramètre que nous n'avons pas testé lors de cette thèse c'est l'impact sur sexe des animaux sur l'effet des RF. En effet, il a été montré que le sexe peut avoir un impact plus ou moins important sur les effets des RF (Haghani *et al.* 2013). Il pourrait être envisageable de comparer nos résultats avec un nouveau projet axé sur l'exposition de femelles.

Enfin, au laboratoire et de notre équipe, l'une des thématiques est l'étude des maladies neurodégénérative, telle que la maladie d'Alzheimer. Il a déjà été montré que l'exposition aux RF de souris transgéniques améliorait les performances mnésiques de ces dernières (Arendash *et al.* 2010, 2012). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'une exposition chronique à un signal 4G sur les modèles de souris utilisés au sein de laboratoire afin d'étudier au niveau comportemental et par approches moléculaires les effets des RF sur cette pathologie.

Annexes

Annexe 1 : Mises au point en piscine de Morris

Avant de commencer le protocole d'apprentissage et de mémoire en piscine de Morris chez les rats Témoins, Sham et RF, des essais de mise au point avec différents protocoles sur des rats "naïfs" (sans exposition) d'âge proche de celui de nos rats "Ados" et "Adultes" ont été réalisé. Il s'agissait de vérifier les capacités de rappel à long terme (25 jours) après un 1er test de rappel à 24h au cours de la phase d'apprentissage, sachant que ce dernier peut induire un phénomène d'extinction et nécessite la poursuite des essais d'apprentissage.

Dans une première étude, des animaux de 4 mois sont élevés à un par cage pendant toute la durée des tests. Ils sont répartis en 4 groupes de 12 rats chacun :

- Le groupe **G1** réalise un apprentissage de **6 jours** (4 essais/jour) avec un test de rappel le 5ème jour avant les 4 essais.
- Le groupe **G2** réalise un apprentissage de **8 jours** (4 essais/jour) avec un test de rappel le 5ème jour avant les 4 essais.
- Le groupe **G3** réalise un apprentissage de **5 jours** (4 essais/jour) avec un test de rappel le 5ème jour avant les 4 essais.
- Le groupe **G4** réalise un apprentissage de **4 jours** (4 essais/jour) avec un test de rappel le 4ème jour avant les 4 essais.

Pour tous les groupes, un test de rappel en mémoire ancienne est aussi réalisé 25 jours après le dernier jour d'apprentissage. Lors du test de rappel intermédiaire (4 ou 5ème jour), tous les animaux passent le test puis une fois que le dernier rat fini son test, le premier commence les 4 essais du jour.

Lors du rappel à 1 jour après le dernier essai du 4^{e} jour, tous les groupes passent significativement ($p<0,001$) plus de 25% du **temps dans le quadrant cible** (test de Student, avec comparaison de la moyenne à un standard fixé à 25%, Figure 88)

Lors du rappel à 25 jour après le dernier essai du dernier jour d'apprentissage, seul le groupe G2 passe significativement ($p<0,001$) plus de 25% du **temps dans le quadrant cible** (test de Student, avec comparaison de la moyenne à un standard fixé à 25%, Figure 88B)

De plus, les résultats (Figure 88) de l'analyse statistique par ANOVA à deux facteurs (Délai et Quadrant) montrent pour les groupes G1, G2 et G3 un effet Quadrant ($F(1,88) > 10,20$; $p<0,01$) sans effet Délai ($F(1,88) < 0,65$; ns pour tous) ni interaction entre les deux facteurs (Délai x Quadrant, $F(1,88) < 2,85$; ns pour tous). Pour le groupe G4, l'analyse par ANOVA à deux facteurs ne montre pas d'effet Quadrant ($F(1,92) = 0,79$, ns) mais un effet Délai ($F(1,92) = 4,92$; $p<0,05$) et une interaction entre les deux (Délai x Quadrant, $F(1,92) = 19,6$; $p<0,001$).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence une différence significative entre le quadrant cible et les autres au 1er test de rappel (1J) pour tous les groupes ($p<0,05$). Alors qu'à 25J, seuls les rats des groupes G2 (Figure 88B) et G3 (Figure 88C) passent plus de temps dans le quadrant cible que les autres quadrants ($p<0,001$ et $p<0,05$, respectivement).

Les rats des groupes G1 (Figure 88A) et G4 (Figure 88D) passent un temps équivalent dans tous les quadrants, voire plus de temps dans les autres quadrants pour le groupe G4.

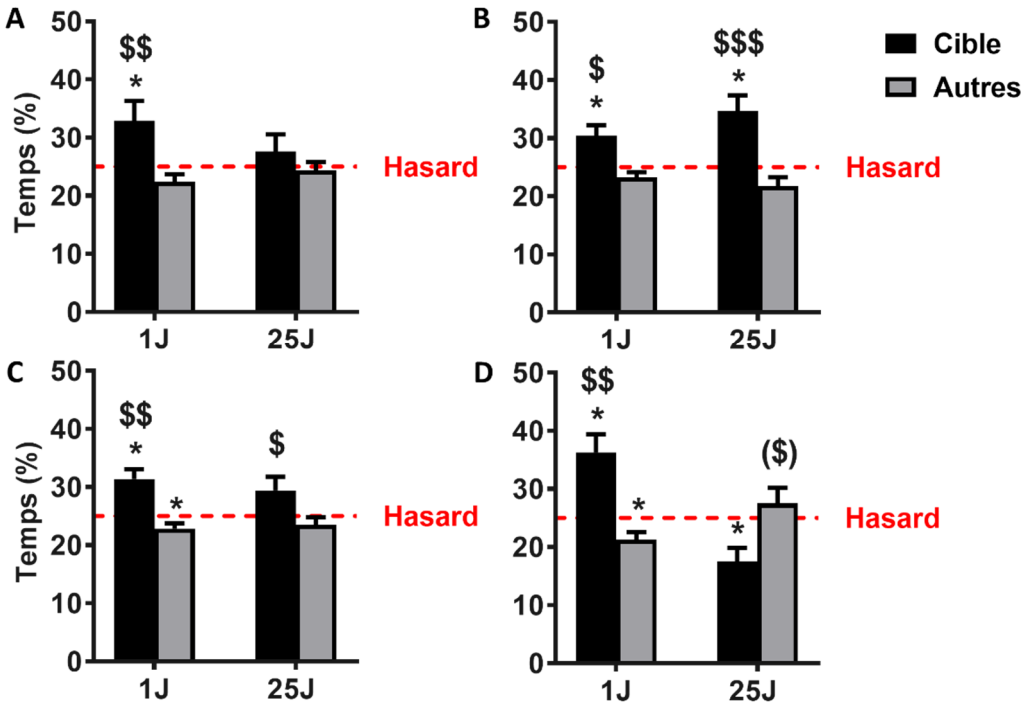


Figure 88 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale pour les groupes G1 à G4 : récente (1 jour) et ancienne (25 jours).

*Le temps (%) passé dans le quadrant cible est comparé à celui passé dans les 3 autres quadrants (($)p<0,1, $p<0,05, $$p<0,01, $$$p<0,001) pour les groupes G1 (A), G2 (B), G3 (C) et G4 (D) avec n = 12 pa groupe. Le trait en pointillés illustre le hasard fixé à 25% : lorsque les animaux se souviennent de l'emplacement de la plateforme, le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible est supérieur au hasard (*p<0,05 vs hasard).*

*Les résultats montrent que seuls les rats du groupe G2 (8 jours d'apprentissage) montrent un rappel en mémoire récente **et** ancienne. Nous avons donc retenu ce protocole pour la seconde expérience.*

Lors de l'analyse de ces résultats, nous nous sommes aperçu qu'au délai de 25 jours, les rats avaient tendance à revenir et passer du temps dans le quadrant de lâcher (quadrant adjacent au quadrant cible). Nous avons aussi constaté que plus le souvenir était fragile (ex : à 25J pour les rats du groupe G4), plus le temps passé dans le quadrant de lâcher était important.

Nous avons donc étudié la disposition des indices dans la pièce et nous nous sommes aperçus qu'il y avait une similitude dans les indices qui couvraient ces deux quadrants (Figure 89A). Nous avons donc procédé au "camouflage" d'une partie des indices afin de ré-indicer la pièce (Figure 89B) et réaliser une 2^{e} expérience

Figure 89 : Pièce de la piscine de Morris avec les indices classiques(A) et les nouveaux indices (B).

À la suite d'un problème technique au sein de la chambre d'exposition lors de la première exposition de 3 mois aux RF, les rats de 4 et 9 mois qui étaient exposés à ce moment-là furent répartis en 6 groupes afin de tester les nouveaux indices mais aussi des points de lâcher (lors du rappel) et des quadrants cibles différents (lors de l'apprentissage) avec des rats dont les âges étaient identiques aux rats "Ados" (4-5 mois) et "Adultes" (9-10 mois) (Figure 90) :

- Le groupe **G5** est composé de rats de **4 mois** au début de l'apprentissage, avec une **plateforme cachée en NO** (quadrant cible classique) et un **point de lâcher en NE** (classique) mais avec les **nouveaux indices** (n = 11).
- Le groupe **G6** est composé de rats de **9 mois** au début de l'apprentissage, avec une **plateforme cachée en NO** (quadrant cible classique) et un **point de lâcher en NE** (classique) mais avec les **nouveaux indices** (n = 9).
- Le groupe **G7** est composé de rats de **4 mois** au début de l'apprentissage, avec une **plateforme cachée en NO** (quadrant cible classique) et un **point de lâcher en NE** (classique) mais avec les **indices classiques** (n = 10).
- Le groupe **G8** est composé de rats de **9 mois** au début de l'apprentissage, avec une **plateforme cachée en NO** (quadrant cible classique) et un **point de lâcher en NE** (classique) mais avec les **indices classiques** (n = 9).
- Le groupe **G9** est composé de rats de **9 mois** au début de l'apprentissage, avec une **plateforme cachée en NO** (quadrant cible classique) et un **point de lâcher en SE** (quadrant opposé au quadrant cible) mais avec les **indices classiques** (n = 9).
- Le groupe **G10** est composé de rats de **9 mois** au début de l'apprentissage, avec une **plateforme cachée en SE** (quadrant opposé aux indices identiques) et un **point de lâcher en NE** (classique) mais avec les **indices classiques** (n = 9).

Pour tous les groupes, un test de rappel en mémoire ancienne est réalisé 25 jours après le dernier jour d'apprentissage (8 jours d'apprentissage). Lors du test de rappel intermédiaire (5ème jour), tous les animaux passent le test puis poursuivent avec les 4 essais du jour toute de suite après (pas de délai entre le test et les 4 essais).

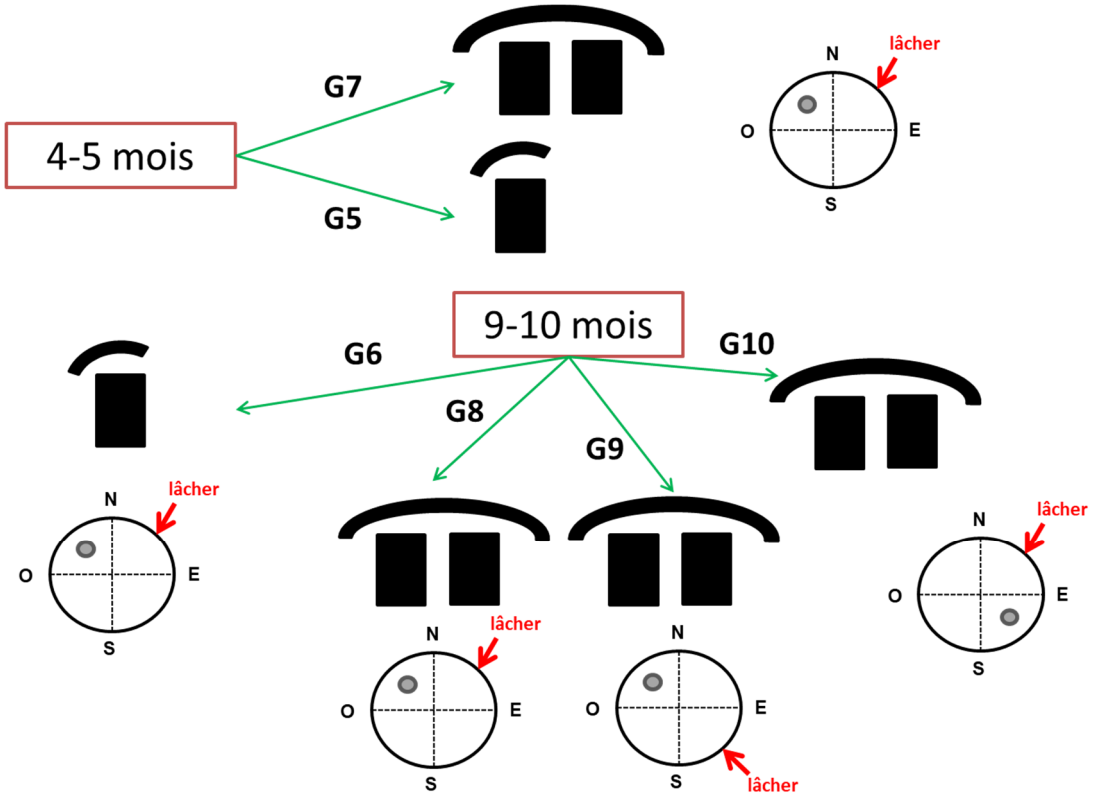


Figure 90 : Nouveaux groupes de rats de 4-5 mois et 9-10 mois pour la seconde expérience de mise en point du protocole en piscine de Morris.

Lors du rappel à 1 jour après le dernier essai du 4e jour, tous les groupes, sauf G9 passent significativement ($p<0,001$) plus de 25% du **temps dans le quadrant cible** (test de Student, avec comparaison de la moyenne à un standard fixé à 25%, Figure 91)

Lors du rappel à 25 jour après le dernier essai du dernier jour d'apprentissage, les rats des groupes G5, G6, G7 et G10 passent significativement ($p<0,001$) plus de 25% du **temps dans le quadrant cible** (test de Student, avec comparaison de la moyenne à un standard fixé à 25%, Figure 91)

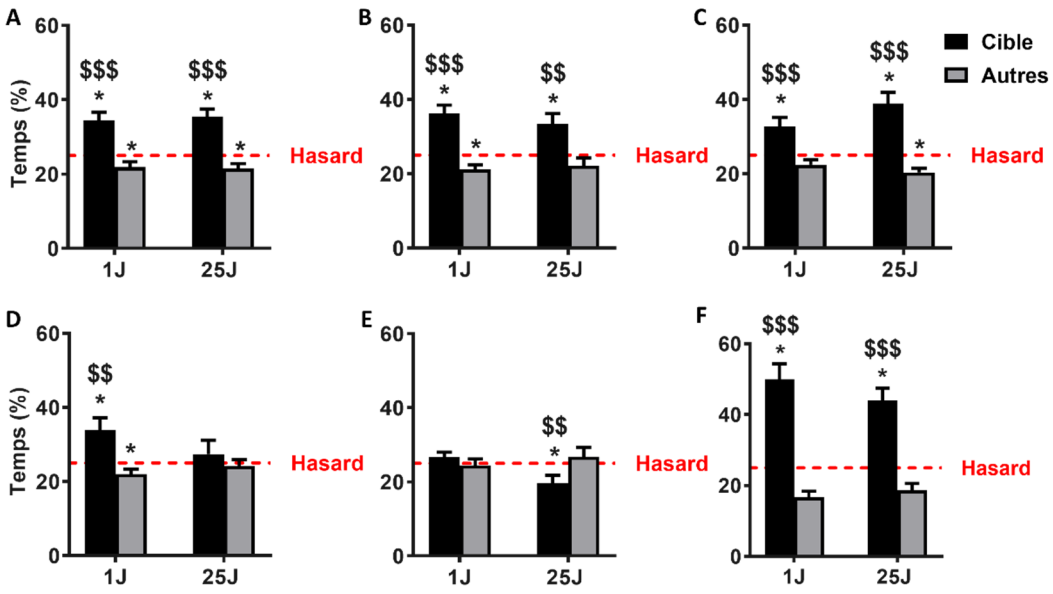


Figure 91 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale pour les groupes G5 à G10 : récente (1 jour) et ancienne (25 jours).
*Le temps (%) passé dans le quadrant cible est comparé à celui passé dans les 3 autres quadrants ($$p<0,01, $$$p<0,001) pour les groupes G5 (A), G6 (B), G7 (C), G8 (D), G9 (E), G10 (F) avec n = 9-12. Le trait en pointillés illustre le hasard fixé à 25% : lorsque les animaux se souviennent de l'emplacement de la plateforme, le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible est supérieur au hasard (*p<0,05 vs hasard).*

De plus, les résultats (Figure 91) de l'analyse statistique par ANOVA à deux facteurs (Délai et Quadrant) montrent pour G5 un effet Quadrant ($F(1,84) = 47,93$; $p<0,001$) sans effet Délai ($F(1,84) = 0,04$: ns) ni interaction entre les deux facteurs (Quadrant x Délai, $F(1,84) = 0,15$: ns); pour G7, un effet Quadrant ($F(1,76) = 57,04$; $p<0,001$) sans effet Délai ($F(1,76) = 1,17$: ns) mais avec une interaction entre les deux facteurs (Quadrant x Délai, $F(1,76) = 4,70$: $p<0,05$). Les résultats mettent en évidence pour les groupes G6, G8 et G10 un effet Quadrant ($F(1,68) > 10,27$; $p<0,01$) sans effet Délai ($F(1,68) < 0,84$: ns pour tous) ni interaction entre les deux facteurs (Quadrant x Délai, $F(1,68) < 3,34$: ns pour tous). Pour G9, l'analyse par ANOVA ne montre aucun effet Quadrant ($F(1,68) = 0,79$; ns) ni effet Délai ($F(1,68) = 0,71$: ns) ni interaction entre les deux facteurs (Quadrant x Délai, $F(1,68) = 2,85$: ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) met en évidence une différence significative entre le quadrant cible et les 3 autres quadrants à 1J pour tous les groupes sauf G9 (Figure 91E) ($p<0,05$). Alors qu'à 25 , seuls les rats des groupes G5 (Figure 91A), G6 (Figure 91B), G7 (Figure 91C) et G10 (Figure 91F) passent plus de temps dans le quadrant cible que les autres quadrants ($p<0,001$ou $p<0,01$).

Les rats des groupes G8 (Figure 91Figure 88D) et G9 (Figure 91E) passent un temps équivalent dans tous les quadrants, voir plus de temps dans les 3 autres quadrants pour le groupe G9.

Les conditions classiques (indices classiques, avec plateforme en NO et point de lâcher en NE) avec 8 jours d'apprentissage montrent un rappel en mémoire récente intact pour les deux groupes d'âge par contre seuls les rats les plus jeunes (4-5 mois, G7) montrent un rappel à 25J comparés aux rats plus âgés (9-10 mois, G8)

Le changement d'indices n'impacte pas la mémoire récente ni ancienne chez les rats de 4-5 mois (G5 et G7), mais elle améliore les performances chez les rats de 9-10 mois (G6).

Par contre le changement du point de lâcher en SE, perturbe le rappel en mémoire récente et ancienne (G9). Enfin les meilleures performances sont obtenues avec la plateforme en SE et le point de lâcher classique (G9) même pour des rats de 9-10 mois. Cependant pour les groupes G9 et G10, il faut préciser que le quadrant SE est le quadrant le plus proche de l'expérimentateur. Ceci pourrait expliquer le retour dans le quadrant SE lors du rappel à 25J et une attirance très forte pour les rappels du groupe G10, expliquant les très bonnes performances de ce groupe.

Après ces deux expériences nous avons choisi de garder les indices classiques, avec un protocole de 8 jours d'apprentissage, une plateforme en NO et un point de lâcher en NE. Pour le test de rappel à 1J, la plateforme est repositionnée à sa place sous le rat après les 60 sec de nage afin d'éviter la mise en place d'un processus d'extinction (pouvant être déclenché par l'absence de plateforme).

Annexe 2 : Evolution du poids corporel par âge et par groupe

I. Groupes des rats "Ados"

I.1. Au cours de l'exposition

Pour rappel, le groupe des "Ados" commence le protocole d'exposition (3 mois) à l'âge d'un mois, il termine donc à l'âge de 4 mois. Le groupe de 108 rats "Ados" est donc divisé en deux lots exposés séparément :

- Le premier lot (N = 72, soit n = 24/groupe d'exposition) fut exposé de juin à août 2016 et divisé en deux pour la suite des expériences : tests comportementaux (N = 36, soit n = 12/groupe d'exposition) et biologie moléculaire, apprentissage (N = 36, soit n = 6 par groupe expérimental)
- Le second lot (N = 36, soit n = 6/groupe expérimental) fut exposé de septembre à décembre 2018 pour les analyses en biologie moléculaire (effet des RF à LT).

Le premier lot "Ados" (Figure 31A) ne montre aucune différence significative entre les trois groupes d'exposition à leur composition (ANOVA à un facteur, $F(2,69)=0,23$; ns). Ces résultats statistiques sont également valables pour le second lot de rats "Ados" (Figure 31B) (ANOVA à un facteur, $F(2,33)=1,79$; ns).

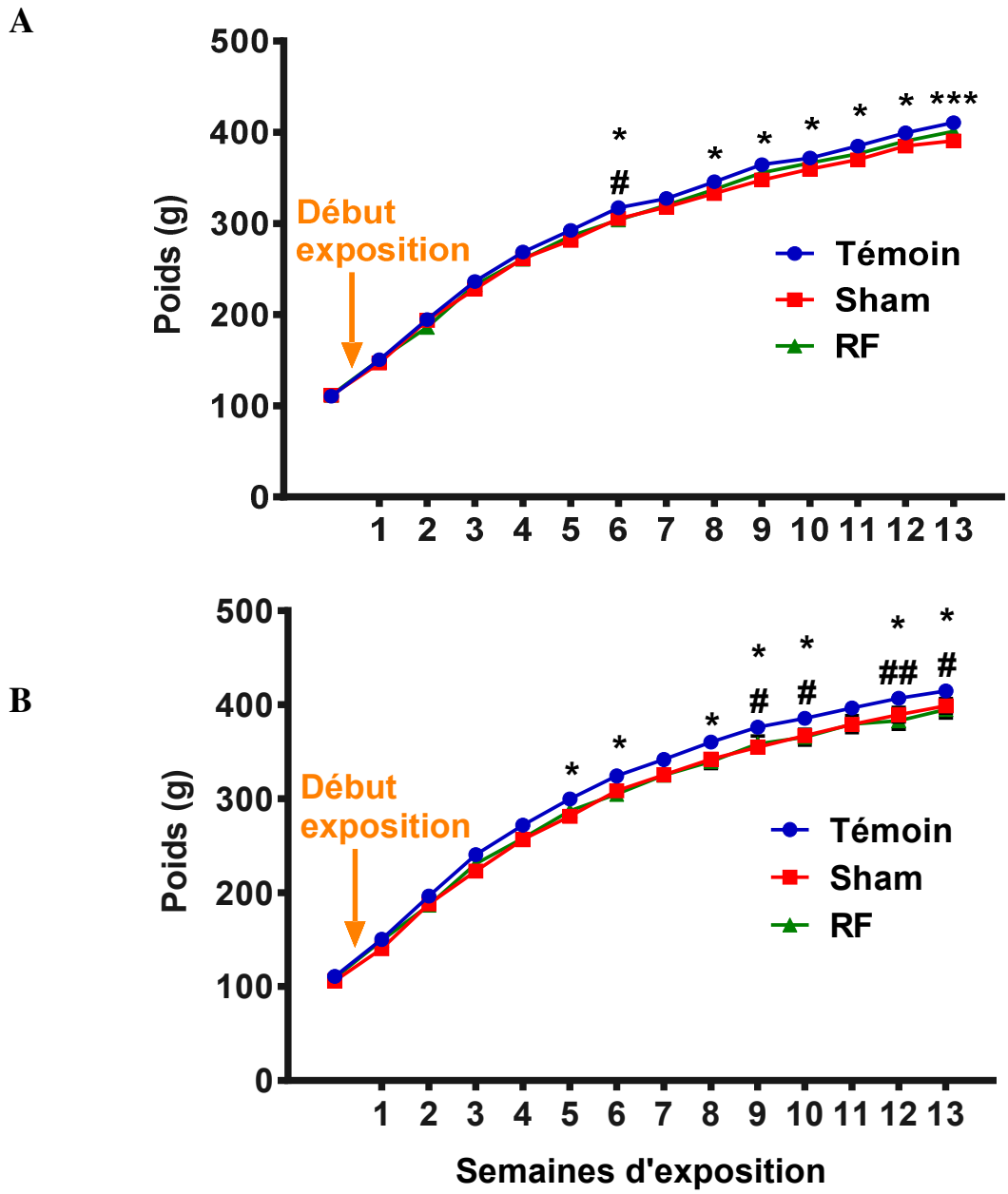


Figure 92 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Ados".
A : Rats poursuivant en comportement et en biologie moléculaire (apprentissage), B : Rats poursuivant en biologie moléculaire (persistance). *p<0,05; ***p<0,001 pour Sham *vs* Témoin et #p<0,05; ##p<0,01 pour RF *vs* Témoin.

L'analyse statistique, par ANOVA à mesures répétées (Groupe et Semaines), de la prise de poids de ces deux lots de rats "Ados" au cours des trois mois d'exposition (14-15 semaines) montrent un effet Semaine. Pour le premier lot, les résultats statistiques montrent une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, F(13,897)=7137; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,69)=2,75; p=0,07). Cependant une interaction entre les deux facteurs est observée (Groupe x Semaine, F(26,897)=3,36; p<0,001). L'analyse des

comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre des différences entre les Sham et les Témoins (semaines 6, et de 8 à 12, p<0,05 et semaine 13, p<0,001) et entre les RF et les Témoins (semaine 6, p<0,05). Ces résultats sont retrouvés dans le second lot, avec un effet du facteur Semaine sur la prise de poids (F(13,429)=3802; p<0,001) sans effet Groupe seul (F(2,33)=3,26; p=0,05) mais une interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, F(26,429)=2,13; p<0,001). L'analyse des comparaisons multiples par test de NK montre des différences entre les Sham et les Témoins (semaines 5, 6, 8, 9, 10, 12 et 13, p<0,05) et entre les RF et les Témoins (semaines 9, 10 et 13, p<0,05 et semaine 12, p<0,01).

I.2. Après l'exposition

Après l'exposition, certains animaux continuent d'être suivis pendant la suite du protocole (comportement ou biologie moléculaire) :

- Le premier lot (Figure 32A, N=36, soit n=12/groupe d'exposition) continue pendant 5 semaines les tests comportementaux.
- Le second (Figure 32B, N=36, soit n=6/groupe expérimental) est divisé en deux : la moitié entre dans un protocole d'apprentissage en piscine de Morris avec mise à mort 25 jours après le dernier passage en piscine, l'autre partie reste dans leur cage d'élevage (HC), pendant 3 semaines.

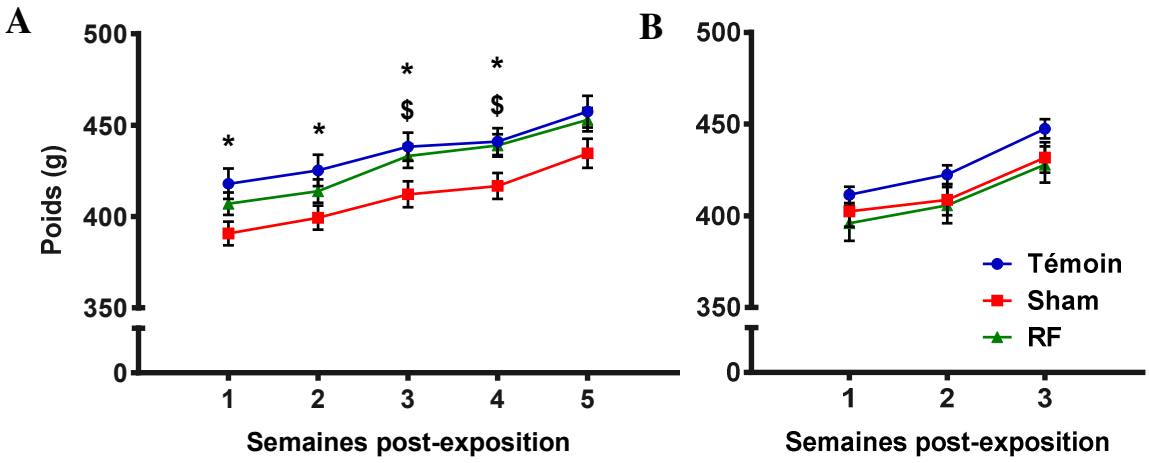


Figure 93 : Evolution du poids après l'exposition pour les deux lots de rats "Ados".
A : Rats poursuivant en comportement (n=12/groupe), *p<0,05 Témoin *vs* Sham, $p<0,05 RF *vs* Sham ; B : Rats poursuivant en biologie moléculaire (persistance)(n=12/groupe).

L'analyse statistique, par ANOVA à mesures répétées (Groupe et Semaines), de la prise de poids de ces deux lots de rats "Ados" après les trois mois d'exposition montre un effet

Semaine. Pour le premier lot (Figure 32A), les résultats statistiques montrent une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, $F(4,132)=253,1$; $p<0,001$), avec un effet Groupe ($F(2,33)=3,43$; $p<0,05$). Cependant aucune interaction entre les deux facteurs n'est observée (Groupe x Semaine, $F(8,132)=1,87$; ns). L'analyse des comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre une prise de poids plus faible chez les Sham par rapport au groupe Témoin (toutes les semaines, $p<0,05$) et du groupe RF par rapport aux Sham (semaines 3 et 4, $p<0,05$).

Les résultats du second lot de rats ((Figure 32B) montrent un effet du facteur Semaine sur la prise de poids ($F(2,66)=299,7$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,33)=1,28$; ns) ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, $F(4,66)=1,15$; ns). L'analyse des comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence entre les trois groupes d'exposition, concernant la prise de poids.

En résumé, les résultats ne montrent aucun effet propre des RF sur la prise de poids chez le jeune rat mâle (1-4 mois) pendant l'exposition. Par contre pour le premier groupe, après l'exposition le poids moyen des rats Sham est plus faible que celui des Témoins et RF. Enfin, au cours de l'exposition, un effet "chambre réverbérante" est observé à partir de la 5e semaine (plus visible dans le 2ème lot que le premier). En effet, le poids corporel des rats Sham et RF est inférieur à celui des Témoins. Cette baisse tend à persister jusqu'à 4 semaines après la fin de l'exposition surtout pour les rats Sham du lot 1.

II. Groupes des rats "Adultes"

II.1. Pendant l'exposition

Pour rappel, le groupe des "Adultes" commence le protocole d'exposition (3 mois) à l'âge de 6 mois, il termine donc à l'âge de 9 mois. Au sein des "Adultes", deux lots différents ont été exposés :

- Le premier lot (Figure 33A, N=72, soit n=24/groupe d'exposition) fut exposé de janvier à avril 2016 et divisé en deux pour la suite des expériences : tests comportementaux (N=36, soit n=12/groupe d'exposition) et biologie moléculaire, apprentissage (N=36, soit n=6 par groupe expérimental)

- Le second lot (Figure 33B, N=33, soit n=5-6/groupe expérimental) fut exposé de septembre à décembre 2016 pour les analyses en biologie moléculaire (effet des RF à LT).

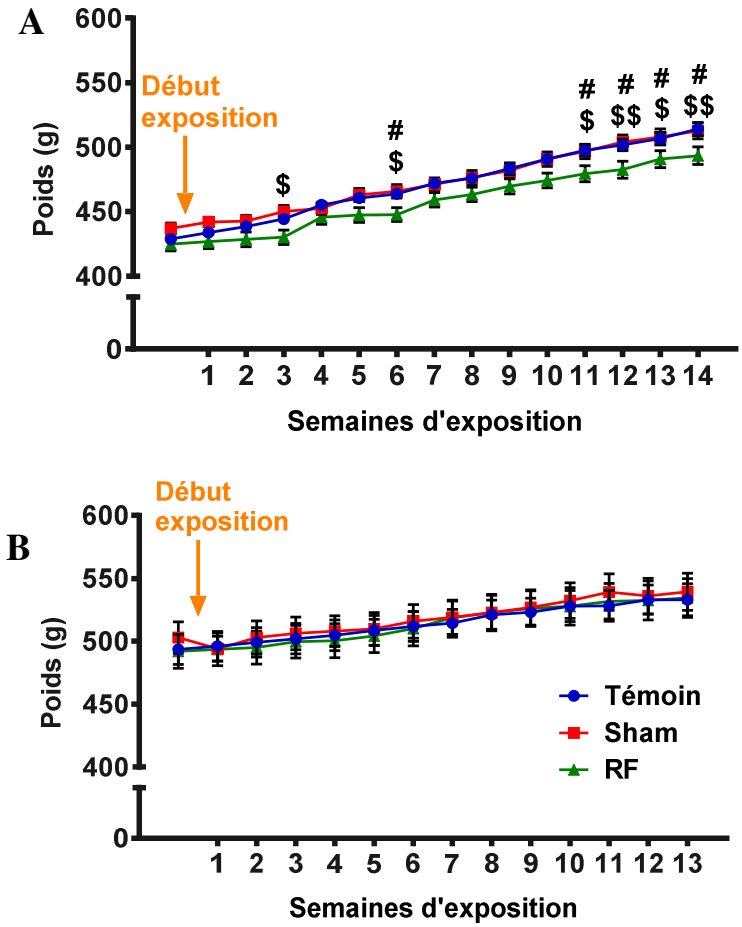


Figure 94 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "adultes".
A : Rats poursuivant en comportement et en biologie moléculaire (apprentissage), $p<0,05; $$p<0,01 pour RF vs Sham et #p<0,05; ##p<0,01 pour RF vs Témoin. B : Rats poursuivant en biologie moléculaire (persistance).

Le premier lot "Adultes" (Figure 33A) ne montre aucune différence significative entre les trois groupes d'exposition à leur composition (ANOVA à un facteur, F(2,33)=1,53; ns). Ces résultats statistiques sont également valables pour le second lot de rats "Adultes" (Figure 33B) (ANOVA à un facteur, F(2,30)=0,21; ns).

L'analyse statistique, par ANOVA à mesures répétées (Groupe et Semaines), de la prise de poids de ces deux lots de rats "adultes" au cours des trois mois d'exposition (14-15 semaines) montrent un effet Semaine. Pour le premier lot, les résultats statistiques montrent une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, F(14,966)=1058; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,69)=2,85; p=0,06). Cependant une interaction entre les deux

facteurs est observée (Groupe x Semaine, F(28,966)=4,11; p<0,001). L'analyse des comparaisons multiples par test de NK montre une différence entre le groupe Sham et RF (semaines 3, 6, 11 et 13; p<0,05 et semaines 12 et 14; p<0,01), entre RF et Témoin (semaines 6 et 11 à 14; p<0,05), avec un poids plus petit pour les rats RF.

Les résultats dans le second lot montrent un effet du facteur Semaine sur la prise de poids (F(13,390)=108,7; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,30)=0,04; ns) ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, F(26,390)=0,84; ns).

II.2. Après l'exposition

Après l'exposition, certains animaux continuent d'être suivis pendant la suite du protocole (comportement ou biologie moléculaire) :

- Le premier lot (Figure 34A, N=36, soit n=11-12/groupe d'exposition) continue pendant 5 semaines les tests comportementaux.
- Le second lot (Figure 34B, N=36, soit n=6/groupe expérimental) est divisé en deux : la moitié entre dans un protocole d'apprentissage en piscine de Morris avec mise à mort 25 jours après le dernier passage en piscine, l'autre partie reste dans leur cage d'élevage (HC), pendant 4 semaines.

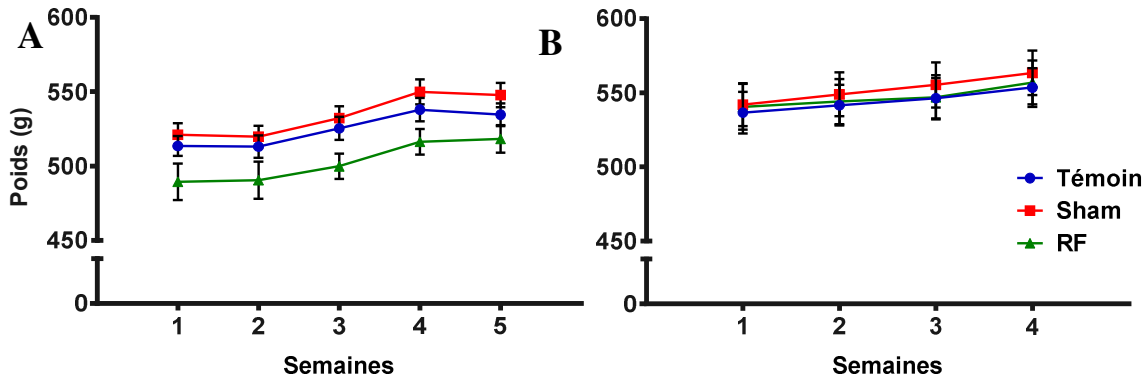


Figure 95 : Evolution du poids après l'exposition pour les deux lots de rats "Adultes".
A : Rats poursuivant en comportement, B : Rats poursuivant en biologie moléculaire (persistance).

L'analyse statistique, par ANOVA à mesures répétées (Groupe et Semaines), de la prise de poids de ces deux lots de rats "Adultes" après les trois mois d'exposition montre un effet Semaine. Pour le premier lot, les résultats statistiques montrent une augmentation significative du poids au cours du temps (Semaine, F(4,128)=54,94; p<0,001), avec un effet Groupe (F(2,32)=3,76; p<0,05). Cependant aucune interaction entre les deux facteurs n'est

observée (Groupe x Semaine, F(8,128)=0,43; ns). Les résultats du second lot de rats montre un effet du facteur Semaine sur la prise de poids (F(3,90)=106,7; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,30)=0,07; ns) ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, F(6,90)=1,46; ns).

Ceci reflète une prise de poids constante pour les trois groupes : Sham, RF et Témoin.

Les statistiques montrent un effet des RF à la baisse sur la prise de poids chez le rat mâle adulte (6-9 mois) du premier lot, mais qui n'est pas retrouvé sur le second lot. Après l'exposition, la prise de poids est identique chez tous les groupes (Témoin, Sham et RF). La différence entre ces 2 lots de rats reste inexpliquée.

III. Groupe des rats "Agés"

III.1. Pendant l'exposition

Pour rappel, le groupe des "Agés" commence le protocole d'exposition (3 mois) à l'âge de 18 mois, il termine donc à l'âge de 21 mois. Au sein ce groupe, deux lots différents ont été exposés :

- Le premier lot (Figure 35A, N=33, soit n=11/groupe d'exposition) fut exposé de mars à mai 2017 pour mener les tests comportementaux.
- Le second lot (Figure 35B, N=56, soit n=8/groupe expérimental) fut exposé de juin à août 2017 pour les analyses en biologie moléculaire.

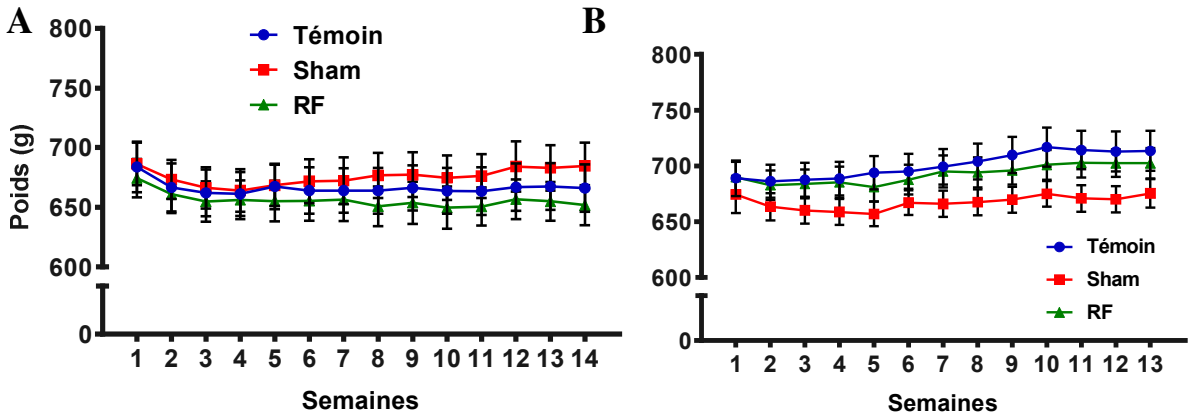


Figure 96 : Evolution du poids corporel pour les deux lots de rats "Agés".
A : Rats poursuivant en comportement, B : Rats poursuivant en biologie moléculaire (apprentissage).

Le premier lot de rats "Agés" (Figure 35A)Figure 31 : Evolution du poids corporel pour les rats du groupe "Ados".

Les données sont représentées sous la forme moyenne ± SEM, au cours du temps (n = 36/groupe). Le premier point correspond à la pesée avant l'entrée dans le protocole d'exposition afin de constituer les groupes Sham, RF et Témoin. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, différences statistiquement significatives groupe Sham *vs* Témoin et #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 différences statistiquement significatives groupe RF *vs* Témoin.

ne montre aucune différence significative entre les trois groupes à leur composition (ANOVA à un facteur, F(2,28)=0,11; ns). Ces résultats statistiques sont également valables pour le second lot de rats "Agés" (Figure 35B) (ANOVA à un facteur, F(2,53)=0,30; ns).

L'analyse statistique, par ANOVA à mesures répétées (Groupe et Semaines), de la prise de poids de ces deux lots de rats "Agés" au cours des trois mois d'exposition (14-15 semaines) montre un effet Semaine. Pour le premier lot, les résultats statistiques montrent des fluctuations du poids au cours du temps (Semaine, F(13,364)=4,54; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,28)=0,31; ns) ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Semaine, F(26,364)=0,99; ns). Les résultats dans le second lot de rats "Agés" montrent les mêmes résultats que le premier lot avec un effet du facteur Semaine (F(12,636)=15,21; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,53)=1,65; ns). Cependant une interaction entre les deux facteurs est observée (Groupe x Semaine, F(24,636)=1,66; p=0,03). L'analyse des comparaisons multiples par test de NK ne montre aucune différence pour une semaine donnée.

III.2. Après l'exposition

Après l'exposition, le premier lot de rats poursuit le protocole par des tests comportementaux (N=33, soit n=11/groupe d'exposition) pendant 3 semaines.

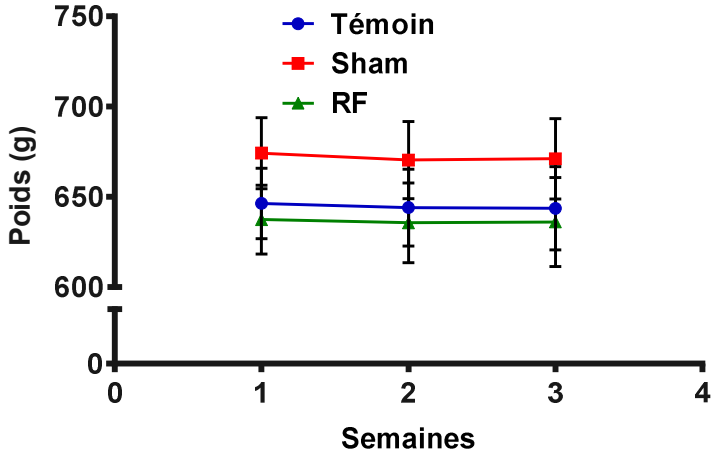


Figure 97 : Evolution du poids après l'exposition pour le premier lot de rats "Agés".

L'analyse statistique (Figure 97), par ANOVA à mesures répétées (Groupe et Semaines), de la prise de poids de ce lot de rats "Agés" ne montre aucun effet des différents facteurs ((F2,56)<0,8; ns pour tous). Aucune interaction entre les deux paramètres n'est visible (Groupe x Semaine, F(4,56)=0,03; ns).

Les statistiques ne montrent aucun effet des RF sur la prise de poids chez le rat mâle âgé (18-21 mois) pendant et après l'exposition chronique.

Pour les trois groupes d'âges, la prise de poids n'est pas impactée par les RF, pendant l'exposition mais également à plus long terme (jusqu'à plus d'un mois plus tard). Cependant chez le groupe "Ados", un effet lié à la chambre (groupe RF et Sham) par rapport au groupe Témoin est mis en évidence. En effet sur ce groupe d'âge, une prise de poids moins rapide est observée pour les rats passant dans la chambre d'exposition.

Annexe 3 : Evaluation de la température pour tous les âges (seconde lot)

La température rectale est mesurée toutes les semaines au cours de l'exposition (RF, Sham) sur la moitié des animaux/semaine, c'est-à-dire que pour un rat, elle est mesurée toutes les deux semaines. La température corporelle est mesurée juste avant le début et juste après la fin des 4 h d'exposition, pour les deux sessions journalières (Sham ou RF, matin ou après-midi). Il en est de même pour les rat Témoins. Dans cette annexe les résultats du second lot (non détaillés dans la partie "Contributions expérimentales") seront analysés.

I. Groupes des rats "Ados"

Comme pour le premier lot, la prise de température est réalisée au cours de l'exposition des rats "Ados", comme présentée dans les Tableau 26Tableau 27.

MATIN		**mois**		
Groupes	*Moment*	**1**	**2**	**3**
Témoin	*AVANT*	37,68 ± 0,08	37,6 ± 0,08	37,32 ± 0,05
	APRES	37,22 ± 0,05 ***	36,97 ± 0,09 ***	36,99 ± 0,05 ***
Sham	*AVANT*	37,69 ± 0,07	37,63 ± 0,07	37,23 ± 0,06
	APRES	37,15 ± 0,06 ***	37,02 ± 0,05 ***	37,03 ± 0,05 **
RF	*AVANT*	37,63 ± 0,07	37,09 ± 0,09	37,38 ± 0,05
	APRES	37,16 ± 0,05 ***	37,02 ± 0,07	36,98 ± 0,04 ***

Tableau 26 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Ados", le matin.
*Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition du matin (*Tableau 26*) mois par mois, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque mois. Pour les mois 1 et 3, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) > 58$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,66) < 0,37$; ns pour tous) sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) < 2,1$; ns pour tous). Pour le mois 2, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 50,42$; $p<0,001$) avec un effet Groupe ($F(2,66) = 7,33$; $p<0,01$), et une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 8,69$; $p<0,01$).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour le matin (*Tableau 26*)**, met en évidence une baisse significatives de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins et les Sham pour les 3 mois ($p<0,01$ ou $p<0,01$); et chez les RF pour les mois 1 et 3 ($p<0,01$).

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour le matin, avant l'exposition (*Tableau 26*), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,66) = 18,78$; $p<0,001$), avec un effet Groupe ($F(2,33) = 6,36$; $p<0,01$) et une interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,66) = 6,81$; $p<0,001$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Témoins et les Sham, une baisse significative de la température entre les mois 1 *vs* 3 et 2 *vs* 3 ($p<0,01$), et chez les RF, une augmentation de la température entre le mois 2 *vs* 3 ($p < 0,01$), et une baisse de la température entre le mois 1 *vs* 2 ($p<0,001$) et entre le mois 1 *vs* 3 ($p<0,05$).

Pour le matin, après l'exposition (*Tableau 26*), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,66) = 10,01$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,33) = 0,55$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,66) = 0,46$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Témoins, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* les mois 2 et 3 ($p<0,01$). Pas d'effet significatif n'est observé pour les rats Sham et RF.

En résumé, le matin, *on observe une diminution de la température corporelle pour tous les groupes après vs avant l'exposition. De plus, on observe une diminution de la température (avant et après) entre le premier mois d'exposition et le dernier. Cette baisse globale de la température au cours du temps est observée chez tous les groupes pour les températures avant l'exposition et ne concerne que les témoins pour les températures après l'exposition.*

APRES-MIDI		mois		
Groupes	*Moment*	**1**	**2**	**3**
Témoin	*AVANT*	37,42 ± 0,06	37,31 ± 0,04	37,31 ± 0,07
	APRES	37,1 ± 0,03 **	37,05 ± 0,05 **	37,03 ± 0,04 **
Sham	*AVANT*	37,46 ± 0,08	37,35 ± 0,06	37,21 ± 0,07
	APRES	37,18 ± 0,05 **	37,18 ± 0,05	37,02 ± 0,04
RF	*AVANT*	37,37 ± 0,05	37,23 ± 0,05	37,19 ± 0,06
	APRES	37,13 ± 0,05 *	37,02 ± 0,04 *	36,98 ± 0,03 *

Tableau 27 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Ados", l'après-midi.
*Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition de l'après-midi (Tableau 27), l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque mois. Pour les mois 1 et 3, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) > 29$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,66) < 1,68$; ns pour tous) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) < 0,40$; ns pour tous). Pour le mois 2, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,66) = 28,39$; $p<0,001$) avec un effet Groupe ($F(2,66) = 4,58$; $p<0,05$), mais sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,66) = 0,45$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour l'après-midi** (**Tableau 27**), met en évidence une baisse significatives de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins et les RF pour tous les mois ($p<0,01$ ou $p<0,05$); et chez les Sham pour le mois 1 ($p<0,05$).

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour l'après-midi, avant l'exposition (Tableau 27), l'analyse statistique montre un effet du facteur Mois ($F(2,66) = 5,77$; $p<0,01$), sans effet Groupe ($F(2,33) = 2,89$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,66) = 0,41$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Sham, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* 3 ($p<0,05$), aucune différence n'est notée chez les RF et les Témoins.

Pour l'après-midi après l'exposition (Tableau 27), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,66) = 8,09$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,33) = 2,90$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,66) = 1,17$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Sham, une baisse significative de la température entre les mois 1 *vs* 3 et 2 *vs 3* ($p<0,05$), et chez les RF entre les mois 1 *vs* 3 ($p<0,05$).

En résumé, l'après-midi, *on observe des variations de la température corporelle avant vs après à l'exposition mais qui demeurent modestes en amplitude. De plus, on observe une diminution de la température (avant et après) entre le premier mois d'exposition et le dernier. Cette baisse globale de la température au cours du temps est observée chez tous les groupes. Pas les témoins après et pas les RF et les témoins avant ! Il faut supprimer cette phrase. Par contre peut-être dire que chez l'Adulte, on observe moins de variations de la température corporelle au cours des 3 mois d'exposition, pour les expositions de l'après-midi dans les 3 groupes.*

De manière générale, aucun effet propre des RF sur la température corporelle n'est visible, que ce soit ponctuellement (avant/après l'exposition), ni au cours des mois d'exposition, chez le groupe de rats "Ados". Cependant une baisse de la température corporelle le matin, après l'exposition de 4h au cours des 3 mois d'expérience est observée chez tous les groupes. Cependant il faut noter que ces variations de température restent modestes < 0,2-0,3°C, et correspondent probablement à des variations diurnes (avant vs après) et/ou physiologiques.

II. Groupes des rats "Adultes"

Comme pour le premier lot, la prise de température est réalisée au cours de l'exposition des rats "Adultes", comme présentée dans les Tableau 28Tableau 29.

MATIN		mois		
Groupes	*Moment*	**1**	**2**	**3**
Témoin	*AVANT*	37,55 ± 0,15	37,57 ± 0,15	37,30 ± 0,16
	APRES	37,10 ± 0,06 *	37,18 ± 0,09	36,97 ± 0,06
Sham	*AVANT*	37,36 ± 0,11	37,58 ± 0,16	37,09 ± 0,11
	APRES	37,26 ± 0,10	37,05 ± 0,08 *	36,99 ± 0,05
RF	*AVANT*	37,16 ± 0,08	37,21 ± 0,08	37,50 ± 0,10
	APRES	37,34 ± 0,06	37,07 ± 0,11	37,09 ± 0,04 **

Tableau 28 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Adultes", le matin.
*Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition du matin (Tableau 28) mois par mois, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque mois. Pour le mois 1, l'analyse statistique ne montre aucun effet Moment ($F(1,60) = 2,24$; ns) ni effet Groupe ($F(2,60) = 0,33$; ns) mais avec une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,60) = 5,02$; $p<0,05$). Pour le mois 2, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,60) = 14,09$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,60) = 2,24$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,60) = 1,53$; ns). Et pour le mois 3, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,60) = 12,93$; $p<0,001$) avec un effet Groupe ($F(2,60) = 3,67$; $p<0,05$) mais sans interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,60) = 1,42$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour le matin** (Tableau 28), met en évidence une baisse significative de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins pour le mois 1 et les Sham pour le mois 2 ($p<0,05$); et chez les RF pour le mois 3 ($p<0,01$).

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour le matin, avant l'exposition (Tableau 28), l'analyse statistique ne montre pas d'effet Mois ($F(2,60) = 1,40$; ns), ni d'effet Groupe ($F(2,30) = 1,34$; ns) mais montre une interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,60) = 3,57$; $p<0,01$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Témoins, une baisse

significative de la température entre le mois 2 *vs* 3 (p<0,01). Pas d'effet significatif n'est observé pour les rats Témoins et RF**.**

Pour le matin, après l'exposition (Tableau 28), l'analyse statistique montre un effet Mois (F(2,60) = 8,61; p<0,001), sans effet Groupe (F(2,30) = 0,67; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Mois, F(4,60) = 2,23; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les RF et les Sham, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* les mois 2 et 3 (p<0,05). Pas d'effet significatif n'est observé pour les rats Témoins.

En résumé, le matin, *on observe de manière moins marquée que chez les rats "Ados" et le plus souvent non significative, une baisse de température corporelle après vs avant l'exposition. De plus, on observe une diminution de la température (avant et après) entre le premier ou 2e mois d'exposition et le dernier chez les Témoins et les Sham le matin, et les Sham et RF l'après-midi. Ces variations de la température corporelle au cours des 3 mois d'exposition montrent un effet "chambre d'exposition" pour les températures après l'exposition.*

APRES-MIDI		**mois**		
Groupes	*Moment*	**1**	**2**	**3**
Témoin	*AVANT*	37,71 ± 0,16	37,57 ± 0,16	37,46 ± 0,10
	APRES	37,26 ± 0,06 *	37,14 ± 0,12	37,07 ± 0,07 **
Sham	*AVANT*	37,76 ± 0,15	37,64 ± 0,15	37,26 ± 0,09
	APRES	37,14 ± 0,06 **	37,15 ± 0,09 *	36,96 ± 0,09 *
RF	*AVANT*	37,37 ± 0,13	37,36 ± 0,10	37,34 ± 0,07
	APRES	37,12 ± 0,11	37,05 ± 0,06	37,07 ± 0,06

Tableau 29 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Adultes", l'après-midi.
*Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition de l'après-midi (Tableau 29), l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque mois. Pour tous les mois, l'analyse statistique montre un effet Moment (F(1,60) > 18; p<0,001) sans effet Groupe (F(2,66) < 2,40; ns pour tous) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, F(2,66) < 1,24; ns pour tous).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour l'après-midi** (**Tableau 29**), met en évidence une baisse significatives de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins pour les mois 1 et 3 ($p<0,01$ ou $p<0,05$); et chez les Sham pour tous les mois 1 ($p<0,05$), aucune différence n'est notée chez les RF.

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour l'après-midi, avant l'exposition (Tableau 29), l'analyse statistique montre un Mois ($F(2,60) = 4,60$; $p<0,05$), sans effet Groupe ($F(2,30) = 1,75$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,60) = 1,26$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Témoin, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* les mois 2 et 3 ($p<0,05$), aucune différence n'est notée chez les RF et les Sham.

Pour l'après-midi après l'exposition (Tableau 29), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,60) = 3,73$; $p<0,05$), sans effet Groupe ($F(2,30) = 0,54$; ns) ni interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,60) = 0,99$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne montre aucune différence entre les mois pour chaque groupe.

<u>En résumé, l'après-midi,</u> *on observe de manière moins marquée, une baisse de température corporelle après vs avant l'exposition, significative uniquement chez les Sham et les Témoins. De plus, on observe une diminution de la température (avant et après) entre le premier mois d'exposition et les deux suivants, uniquement chez les Témoins Cette observation montre un effet "chambre d'exposition".*

De manière générale, aucun effet propre des RF sur la température corporelle n'est visible que ce soit ponctuellement (pour une prise donnée) ni au cours des semaines l'exposition chez le groupe de rats "Adultes". Aucune variation de la température n'est observée au cours des 3 mois d'exposition le matin. Cependant une baisse significative de la température corporelle, avant ou après l'exposition de 4h au cours des 3 mois d'expérience est observée chez les rats Sham et à un degré moindre chez les rats RF avant l'exposition le matin et l'après-midi chez les Témoins. Ces résultats montrent une différence entre les RF/Sham d'un côté et les Témoins de l'autre, argumentant en faveur d'un effet

"chambre". Comme pour les rats "Ados", ces variations de température restent modestes < 0,5°C, et correspondent probablement à des variations diurnes (avant vs après) et/ou physiologiques.

III. Groupes des rats "Agés"

Comme pour le premier lot, la prise de température est réalisée au cours de l'exposition des rats "Agés", comme présentée dans les Tableau 30Tableau 31.

MATIN		mois		
Groupes	*Moment*	**1**	**2**	**3**
Témoin	*AVANT*	37,58 ± 0,09	37,37 ± 0,07	37,19 ± 0,07
	APRES	37,20 ± 0,05 **	37,08 ± 0,04 **	37,04 ± 0,03
Sham	*AVANT*	37,51 ± 0,09	37,47 ± 0,08	37,29 ± 0,07
	APRES	37,55 ± 0,07	37,10 ± 0,04 ***	37,17 ± 0,04
RF	*AVANT*	38,02 ± 0,11	37,58 ± 0,08	37,61 ± 0,08
	APRES	37,17 ± 0,04 ***	37,14 ± 0,04 ***	37,10 ± 0,02 ***

Tableau 30 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Agés", le matin.
*Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition du matin (Tableau 30) mois par mois, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque mois. Pour les mois 1 et 3, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,124) > 30$; $p<0,001$) avec un effet Groupe ($F(2,62) > 3,5$; $p<0,05$) et une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,124) > 6,9$; $p<0,01$). Pour le mois 2, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,124) = 56,1$; $p<0,001$) sans effet Groupe ($F(2,62) = 2,31$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,124) = 0,83$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour le matin** (Tableau 30), met en évidence une baisse significative de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins pour le mois 1 et 2 ($p<0,01$), chez les Sham pour le mois 2 ($p<0,001$); et chez les RF pour tous les mois ($p<0,001$).

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour le matin, avant l'exposition (Tableau 30), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,124) = 14,81$; $p<0,001$), et un effet Groupe ($F(2,62) = 14,15$; $p<0,001$) mais sans interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,124) = 1,72$; ns). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Témoins, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* 3 ($p<0,001$) et chez les RF entre le mois 1 *vs* les mois 2 et 3 ($p<0,001$). Pas d'effet significatif n'est observé pour les rats Sham**.**

Pour le matin, après l'exposition (Tableau 30), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,124) = 20,10$; $p<0,001$), et un effet Groupe ($F(2,62) = 11,01$; $p<0,001$) ainsi qu'une interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,124) = 6,55$; $p<0,001$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Sham, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* 2/3 ($p<0,001$) et chez les Témoins entre le mois 1 *vs* 3 ($p<0,05$). Pas d'effet significatif n'est observé pour les rats RF.

En résumé, le matin, *on observe des fluctuations significatives de température corporelle selon le moment (après vs avant) et ponctuellement au cours du temps.*

APRES-MIDI		**mois**		
Groupes	*Moment*	**1**	**2**	**3**
Témoin	*AVANT*	37,73 ± 0,05	37,34 ± 0,07	37,41 ± 0,06
	APRES	37,48 ± 0,05 **	37,22 ± 0,05	37,10 ± 0,04 ***
Sham	*AVANT*	37,84 ± 0,08	37,51 ± 0,10	37,13 ± 0,05
	APRES	37,35 ± 0,05 ***	37,26 ± 0,04	37,09 ± 0,06
RF	*AVANT*	37,81 ± 0,09	37,33 ± 0,08	37,46 ± 0,05
	APRES	37,29 ± 0,04 ***	37,29 ± 0,05	37,28 ± 0,04 *

Tableau 31 : Evolution de la température corporelle au cours de l'exposition aux RF pour le deuxième lot de rats "Agés", l'après-midi.
*Les valeurs représentent des moyennes ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 différences significatives entre les températures prises AVANT et APRES l'exposition.*

Pour les comparaisons avant et après l'exposition du matin (Tableau 31) mois par mois, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (Groupe et Moment) a permis de comparer la température corporelle avant et après l'exposition pour chaque mois. Pour les mois 1 et 3, l'analyse statistique montre un effet Moment ($F(1,124) > 18$; $p<0,001$) et un effet Groupe ($F(2,62) > 11$; $p<0,001$) avec une interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,124) > 3,7$; $p<0,05$). Pour le mois 2, l'analyse statistique montre un effet Moment

($F(1,124) = 6,16$; $p<0,05$) sans effet Groupe ($F(2,62) = 1,31$; ns) ni interaction entre les deux facteurs (Moment x Groupe, $F(2,124) = 1,07$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), **pour l'après-midi** (Tableau 31), met en évidence une baisse significatives de la température après *vs* avant l'exposition (effet du facteur Moment) chez les Témoins et les RF pour les mois 1 et 3 ($p<0,05$), chez les Sham pour le mois 1 ($p<0,001$).

Ensuite, l'analyse des données par ANOVA à deux facteurs dont un en mesures répétées (Groupe et Semaine) a été réalisée pour chaque Moment (avant et après l'exposition).

Pour l'après-midi, avant l'exposition (Tableau 31), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,124) = 37,18$; $p<0,001$), sans effet Groupe ($F(2,62) = 0,35$; ns) mais avec une interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,124) = 4,08$; $p<0,01$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Témoins et les RF, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* les mois 2 et 3 ($p<0,01$) et chez les Sham entre les mois 1 *vs* 2/3 et 2 *vs* 3 ($p<0,01$).

Pour l'après-midi, après l'exposition (Tableau 31), l'analyse statistique montre un effet Mois ($F(2,124) = 41,86$ $p<0,001$), et un effet Groupe ($F(2,62) = 7,49$; $p<0,01$) ainsi qu'une interaction entre les deux (Groupe x Mois, $F(4,124) = 12,78$; $p<0,001$). L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) montre chez les Sham, une baisse significative de la température entre le mois 1 *vs* les mois 2 et 3 et le mois 2 *vs* 3 ($p<0,05$) et chez les Témoins entre le mois 1 *vs* 2/3 ($p<0,001$). Pas d'effet significatif n'est observé pour les rats RF.

En résumé, l'après-midi, *on observe une baisse de la de température corporelle selon le moment (après vs avant) significative au mois 1 dans les 3 groupes et au mois 3 pour les rats témoins et RF. Ponctuellement au cours du temps pour les températures avant ou après des différences significatives ont été observées dans chacun des groupes.*

De manière générale, aucun effet propre des RF sur la température corporelle n'est visible, que ce soit ponctuellement (pour une prise donnée), ni au cours des semaines d'exposition chez le groupe de rats "Agés". Comme pour les 2 groupes d'âge précédents, les variations de température restent modestes < 0,5°C, et correspondent probablement à des variations diurnes (avant vs après) et/ou physiologiques.

Annexe 4 : Suivi des cohortes de rats "Agés"

Les animaux utilisés pour les deux lots de rats "Agés" sont arrivés au laboratoire à l'âge d'un mois. Pendant les 17 mois de "vieillissement", pendant l'exposition aux RF et les tests comportementaux, les animaux sont surveillés : apparition des tumeurs et évolution de leur taille, prise de poids, état santé général, vitalité …

Différentes pathologies sont observées à partir l'âge de 8 mois et plus particulièrement vers 15 mois. Nous avons eu en plus des tumeurs spontanées (voir ci-dessous) des cas d'occlusions œsophagiennes, des insuffisances rénales et des AVC (accident vasculaire cérébral) non soignables, mais aussi de problèmes dont le traitement a fonctionné (problème de pattes et d'articulations).

.

Pathologies	Signes/symptômes	Traitement	Autopsie
Occlusions œsophagiennes	Faiblesse générale, irritation oculaire, mucus au niveau du nez, tête mouillée. Mort en 24h par remplissage des poumons "noyade"	Aucun / ponction tentée sans succès	Bouchon de nourriture dans l'œsophage au-dessus de l'estomac, mucus dans la trachée et les poumons
Insuffisance rénale	Perte de poids rapide 8-10% / semaine, faiblesse générale, perte d'appétit, poils sec	Aucun / prolongement avec gelée de croquettes	Déshydratation, péritoine dur, reins marrons et granuleux, estomac et intestin relativement vide
Diabétique	Surconsommation d'eau, litière rapidement sale et odorante, rat petit et peu vif	Glycémie surveillée 1 fois / jour et si ≥ à 2g/L, injection de 2UI de Lantus (durée d'action 24h) en s.c. (1 fois /jour). Si ça ne permet pas de diminuer la glycémie, injection de 2UI en 2UI	/
AVC	Paralysie soudaine, arrière ou de côté, avec souvent perte de poids rapide associée	/	/
Problème patte arrière	Difficulté à marcher, traine la patte ou boite	"kiné" : extension et massage de l'articulation	
Gonflement des articulations	Pattes arrières gonflées et rouges, grande difficulté de marche	Injection en sous cutanée de métacam pendant 5 jours	

Tableau 32 : Résumé des différentes pathologies observées avec le traitement tenté ou réalisé ainsi que les résultats de l'autopsie.

Enfin nous avons eu un cas de diabète détecté chez un rat à l'âge de 18 mois et diagnostiqué à 19,5 mois. Hélas le traitement a été proposé mais non testé car trop difficile à mettre en place avec nos conditions expérimentales

Au sein de chaque groupe expérimental, le nombre de cas pour chaque pathologie est relativement identique (Tableau 33). Dans la ligne "autres", on retrouvera le cas du rat diabétique ou encore des pathologies non décelées ou inconnues conduisant à une mort rapide.

	Avant	Sham	RF	Témoin
Tumeurs	10	10	11	14
	34%	26%	28%	33%
Occlusions oesophagiennes	4	2	1	3
	14%	5%	3%	7%
Problèmes rénaux	0	3	3	4
	0%	8%	8%	9%
Autres	15	3	6	1
	52%	5%	15%	1%

Tableau 33 : Pathologies rencontrées chez les rats "Agés".
Les valeurs représentent le nombre de rats touchés par la pathologie et en dessous le pourcentage de rats que cela représente vis-à-vis du nombre de rats présents dans chaque groupe (Témoin, Sham et RF).

Enfin les tumeurs, dont l'apparition est très étudiée dans le domaine des RF, apparaissent de façon spontanée dans tous les groupes après 18 mois et même avant l'entrée dans le protocole d'exposition. Pendant toute la durée de l'exposition elles sont mesurées (sur deux cotés) et nous permettent de faire un suivi de leur croissance. Dès qu'une tumeur atteinte 4 cm sur un de ces côté (limite éthique fixée en accord avec notre vétérinaire), l'animal est mis à mort. Si par ailleurs, la tumeur devient douloureuse, où qu'elle entraine un mal être général de l'animal (perte de poids ou de vitalité) l'animal est mis à mort. En cas de multiples tumeurs présentes sur des zones délicates (à proximité des côtes, dans le cou, …) l'animal est également écarté du protocole et mis à mort.

Certaines tumeurs sous cutanées ont été analysées par le laboratoire vétérinaire Vebio en région Parisienne. Les résultats de l'analyse histopathologique a révélé que ces tumeurs étaient des fibromes (masse bégnine).

Annexe 5 : Anxiété : analyses des redressements et toilettage (labyrinthe en croix surélevé)

Lors de leur passage dans le labyrinthe en croix surélevé, les animaux sont filmés pendant leur 5 min de test. Les vidéos sont analysées à postériori et le nombre de toilettages et de redressements totaux sont comptabilisés pour chaque groupe.

Ces deux comportements ont lieu presqu'intégralement dans les bras fermés, zone plus sécurisée pour le rat et donnent une indication de l'activité générale de l'animal.

Ces analyses sont réalisées chez les rats "Ados" et "Agés" seulement en raison de l'absence d'enregistrement pour le groupe des "Adultes".

I. Groupes des rats "Ados"

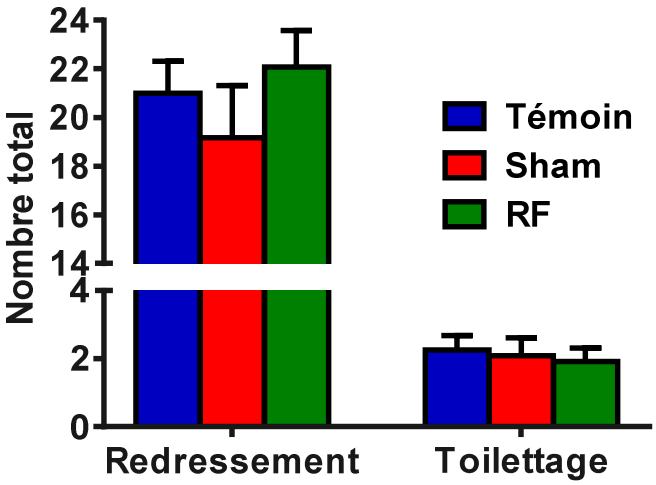


Figure 98 : Nombre de redressements et de toilettages pour le groupe des "Ados"

Chez les "Ados" (Figure 98), l'analyse statistique par ANOVA à un facteur ne montre aucun effet Groupe ni pour les redressements ($F(2,33) = 0,77$; ns) ni pour les toilettages ($F(2,33) = 0,13$; ns).

Chez les "Ados", aucun effet des RF sur le nombre de toilettages ni de redressements n'est observé.

II. Groupe des rats "Agés"

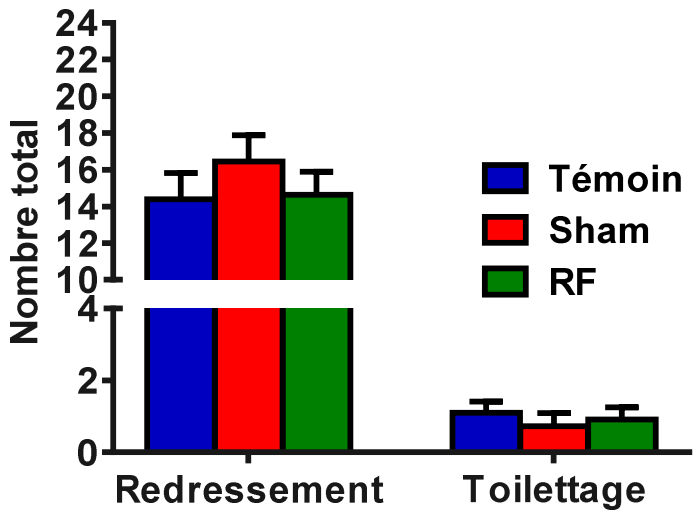


Figure 99 : Nombre de redressements et de toilettages pour le groupe des "Agés"

Chez les "Adultes" (Figure 99), l'analyse statistique par ANOVA à un facteur ne montre aucun effet Groupe ni pour les redressements ($F(2,29) = 0,68$; ns) ni pour les toilettages ($F(2,29) = 0,29$; ns).

Chez les "Agés", aucun effet des RF sur le nombre de toilettages ni de redressements n'est observé.

Chez les deux groupes d'âge, le nombre de redressements et de toilettages ne sont pas impactés par l'exposition chronique aux RF. On notera tout de même que chez les rats "Agés", les redressements et toilettages sont moins nombreux que chez les rats "Ados" reflet d'une baisse de l'activité attendue à cet âge.

ANNEXE 6 : Données supplémentaires pour les tests de rappel d'un souvenir spatial (piscine de Morris)

Lors des tests de rappels (mémoire récente et ancienne), la latence du premier passage dans la zone de la plateforme ainsi que la vitesse de nage sont mesurées en plus des autres paramètres présentés dans la partie "Contributions expérimentales" (Figure 100).

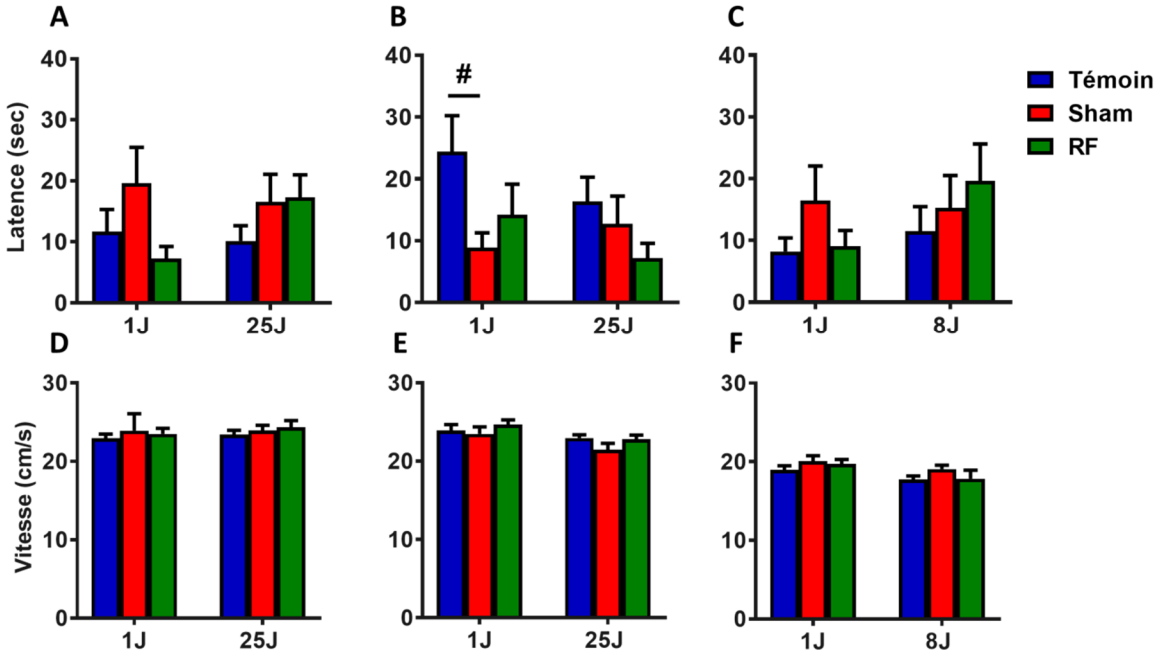


Figure 100 : Performances de rappel d'une mémoire spatiale : récente (1 jour) et ancienne (25 jours).
Latence du 1er passage dans la zone de la plateforme *pour les groupes "Ados" (A), "Adultes" (B) et "Agés" (C).* ***Vitesse de nage*** *pour les groupes "Ados" (D), "Adultes" (E) et "Agés" (F). Les valeurs représentent des moyennes ± SEM de 11-12 rats/groupe, #p<0,05 différence statistiquement significative entre deux groupes.*

L'étude de la **latence du 1er passage dans la zone de la plateforme** (Figure 100 A-C) (ANOVA à 2 facteurs Groupe, Délai), pour les "Ados" et les "Agés", ne montre pas d'effet Groupe ($F < 2$, ns pour tous), ni d'effet Délai ($F < 1,32$; ns pour tous) ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Délai, $F < 1,76$; ns pour tous). Pour le groupe "Adultes", les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs mettent en évidence un effet Groupe ($F(2,60) = 3,50$; $p<0,05$) sans effet Délai ($F(1,60) = 1,14$; ns) ni interaction entre eux (Groupe x Délai, $F(2,60) = 1,19$; ns).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK), met en évidence une diminution significative chez les Sham *vs* Témoins pour le rappel à 1J ($p<0,05$).

L'étude de la **vitesse** (Figure 100 D-E) (ANOVA à 2 facteurs Groupe, Délai), pour les "Ados" ne montre pas d'effet Groupe ($F(2,66) = 0,32$, ns), ni d'effet Délai ($F(1,66) = 0,26$; ns) ni d'interaction entre les deux facteurs (Groupe x Délai, $F(2,66) = 0,06$; ns). Pour les groupes "Adultes" et "Agés", les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs ne mettent pas en évidence d'effet Groupe ($F < 1,84$; ns pour tous) mais un effet Délai ($F > 8$; $p<0,01$) sans interaction entre eux (Groupe x Délai, $F < 0,35$; ns pour tous).

L'analyse post-hoc en comparaisons multiples par Newman-Keuls (NK) ne met en évidence aucune différence significative entre les deux rappels pour chaque groupe.

Sur ces deux paramètres, lors des tests de rappel, aucun effet propre des RF n'est mis en évidence chez les rats "Ados" et "Agés".

ANNEXE 7 : Listes des amorces utilisées en RT-qPCR

Gènes	Amorces	
	Sens (F)	Anti-sens (R)
Atp1a2	ggtgacctttccagcctag	catcgagctccttctctttctg
Atp2a3	accacaagtcaccttccatc	tggtcacaagcacagataagg
GPX1	ttgagaatgtcgcgtccctc	ctcaccattcacctcgcact
JunB	aggcagctacttttcgggtc	ccagggctttgacaaaaccg
Gria1	caaatcccgtagcgagtcga	ggattgcatggacttgggga
Med1	tcccgttgtttgagactccg	cagggtgctggaaggtgatt
Ppp1r9a	tttcgctgcaactgttctgc	cagctccctctgtctcctct
Gfap	gactttctccaacctccagatc	ctcctgcttcgactccttaatg
Kif3a	aactgacacgtctcctgcag	gagcctgacacttcttcccc
Iba1 (Aif1)	atgctgggcaagagatctg	ccaccgtgttatatccacctc
Dnah12	ccgtaatactctgcgggacc	cttcagccgggtcaggaaat
Dnah6	atgctggcaatggaagagct	ctgatatttgcacgcaggcc
Abca5	ccctcagagtagcagcatcg	atcccaatcagaaaggcgc
Col5a2	agcacttcttggcactctatct	ccttctccatgccagatctgt
Kif5b	tttctccaaggcctgctagc	cgctagtctagtccccttgc
Hdac10	ggccactttgatccgctcta	tccactacccggctctgtc
Tspan2	acagaggagtgtgcagcaaa	cgtgaatggggagttgcaga
Ugt8	accatccctcacctgtaataca	gcagtgaaccatttagaagcct
Drc1/Ccdc164	tgtcacttcctgtccctgtc	tgttagcgttccagacccat
Adamts10	ctcttgcttccacctttcgg	ctctccctatctgcccatcg
Nxph3	aacaaagtcccctaccctcg	atggagatgttaccctggcc
Tor1aip2	gcagcagtggttccctagtt	gagattctgaggtgcccact
Camk2n2	agatcctaccctacggcga	acgtcgtctatccggtcatc
JunD	ctgaagaaagacgcgctgac	cccgttggactggatgatca
Bmyc	tcatgtgcgacgatgaggag	tctgcggtggagaagctatc
CKB	catatggccaaggtgctgac	atggggtcgaaaaggtcctt

ANNEXE 8 : Résultats des analyses statistiques (ANOVA à deux facteurs Délai et Groupe) pour les validations RT-qPCR

"Ados" CPFm			
		F (DFn, DFd)	P value
c-fos	Interaction	F (2, 29) = 0,7828	P=0,47
	Délai	F (1, 29) = 155,8	P<0,001
	Groupe	F (2, 29) = 1,357	P=0,27
Egr1	Interaction	F (2, 29) = 4,935	P=0,01
	Délai	F (1, 29) = 232,4	P<0,001
	Groupe	F (2, 29) = 8,201	P=0,002
Atp1a2	Interaction	F (2, 29) = 0,2281	P=0,80
	Délai	F (1, 29) = 1,499	P=0,23
	Groupe	F (2, 29) = 4,955	P=0,01
Dnah6	Interaction	F (2, 24) = 0,4415	P=0,65
	Délai	F (1, 24) = 6,18	P=0,02
	Groupe	F (2, 24) = 1,219	P=0,31
Dnah12	Interaction	F (2, 28) = 0,02444	P=0,98
	Délai	F (1, 28) = 0,3874	P=0,54
	Groupe	F (2, 28) = 0,5615	P=0,58
Drc1	Interaction	F (2, 30) = 1,54	P=0,23
	Délai	F (1, 30) = 15,2	P<0,001
	Groupe	F (2, 30) = 0,1116	P=0,89
Sgk3	Interaction	F (2, 28) = 3,062	P=0,06
	Délai	F (1, 28) = 19,3	P<0,001
	Groupe	F (2, 28) = 0,3165	P=0,73
Tor1aip2	Interaction	F (2, 30) = 2,115	P=0,14
	Délai	F (1, 30) = 1,452	P=0,24
	Groupe	F (2, 30) = 1,832	P=0,18
Tspan2	Interaction	F (2, 29) = 3,756	P=0,04
	Délai	F (1, 29) = 5,985	P=0,02
	Groupe	F (2, 29) = 1,783	P=0,19
UGT8	Interaction	F (2, 29) = 2,101	P=0,14
	Délai	F (1, 29) = 4,832	P=0,04
	Groupe	F (2, 29) = 3,146	P=0,06
Bmyc	Interaction	F (2, 29) = 5,426	P=0,010
	Délai	F (1, 29) = 6,768	P=0,01
	Groupe	F (2, 29) = 0,9687	P=0,39
CKB	Interaction	F (2, 30) = 2,05	P=0,15
	Délai	F (1, 30) = 1,915	P=0,18
	Groupe	F (2, 30) = 4,775	P=0,02
Hdac10	Interaction	F (2, 28) = 0,1206	P=0,89
	Délai	F (1, 28) = 0,02355	P=0,88
	Groupe	F (2, 28) = 8,375	P=0,001
AdamTS10	Interaction	F (2, 29) = 0,3524	P=0,71
	Délai	F (1, 29) = 2,277	P=0,14
	Groupe	F (2, 29) = 5,268	P=0,01
Col5a2	Interaction	F (2, 28) = 0,2621	P=0,77
	Délai	F (1, 28) = 0,003782	P=0,95
	Groupe	F (2, 28) = 1,238	P=0,31
Col27a1	Interaction	F (2, 29) = 1,102	P=0,35
	Délai	F (1, 29) = 5,656	P=0,02
	Groupe	F (2, 29) = 3,737	P=0,04
JunD	Interaction	F (2, 30) = 0,09682	P=0,91
	Délai	F (1, 30) = 3,022	P=0,09
	Groupe	F (2, 30) = 0,4365	P=0,65
Camk2n2	Interaction	F (2, 30) = 2,02	P=0,15
	Délai	F (1, 30) = 0,01228	P=0,91
	Groupe	F (2, 30) = 4,577	P=0,02
Iba1	Interaction	F (2, 30) = 0,2065	P=0,81
	Délai	F (1, 30) = 5,299	P=0,03
	Groupe	F (2, 30) = 1,578	P=0,22

"Ados" Hip dorsal			
		F (DFn, DFd)	P value
c-fos	Interaction	F (2, 30) = 4,211	P=0,02
	Délai	F (1, 30) = 134	P<0,001
	Groupe	F (2, 30) = 0,7408	P=0,49
Egr1	Interaction	F (2, 30) = 1,334	P=0,28
	Délai	F (1, 30) = 10,28	P=0,003
	Groupe	F (2, 30) = 0,3097	P=0,74
Atp1a2	Interaction	F (2, 30) = 1,347	P=0,28
	Délai	F (1, 30) = 1,588	P=0,22
	Groupe	F (2, 30) = 1,608	P=0,22
Dnah6	Interaction	F (2, 30) = 0,1067	P=0,90
	Délai	F (1, 30) = 1,421	P=0,24
	Groupe	F (2, 30) = 1,307	P=0,29
Dnah12	Interaction	F (2, 28) = 0,1829	P=0,83
	Délai	F (1, 28) = 1,603	P=0,22
	Groupe	F (2, 28) = 1,355	P=0,27
Drc1	Interaction	F (2, 27) = 0,6255	P=0,54
	Délai	F (1, 27) = 0,9258	P=0,34
	Groupe	F (2, 27) = 0,5811	P=0,57
Bmyc	Interaction	F (2, 30) = 1,883	P=0,17
	Délai	F (1, 30) = 6,251	P=0,02
	Groupe	F (2, 30) = 1,032	P=0,37
CKB	Interaction	F (2, 30) = 0,551	P=0,58
	Délai	F (1, 30) = 0,58	P=0,45
	Groupe	F (2, 30) = 1,108	P=0,34
Nxph3	Interaction	F (2, 28) = 1,601	P=0,22
	Délai	F (1, 28) = 1,101	P=0,30
	Groupe	F (2, 28) = 1,19	P=0,32
Gpx1	Interaction	F (2, 29) = 1,327	P=0,28
	Délai	F (1, 29) = 0,07751	P=0,78
	Groupe	F (2, 29) = 0,4278	P=0,66
JunB	Interaction	F (2, 30) = 2,806	P=0,08
	Délai	F (1, 30) = 23,55	P<0,001
	Groupe	F (2, 30) = 0,4178	P=0,66
Atp2a3	Interaction	F (2, 30) = 0,9485	P=0,40
	Délai	F (1, 30) = 0,2886	P=0,60
	Groupe	F (2, 30) = 0,09148	P=0,91
Kif3a	Interaction	F (2, 28) = 1,509	P=0,24
	Délai	F (1, 28) = 6,126	P=0,02
	Groupe	F (2, 28) = 0,3028	P=0,74
Abca5	Interaction	F (2, 30) = 7,374	P=0,002
	Délai	F (1, 30) = 3,405	P=0,07
	Groupe	F (2, 30) = 1,238	P=0,30
Gria1	Interaction	F (2, 29) = 9,693	P<0,001
	Délai	F (1, 29) = 60,25	P<0,001
	Groupe	F (2, 29) = 14,88	P<0,001
Ppp1r9a	Interaction	F (2, 29) = 1,139	P=0,33
	Délai	F (1, 29) = 0,1241	P=0,73
	Groupe	F (2, 29) = 0,08575	P=0,92
Med1	Interaction	F (2, 29) = 0,8274	P=0,45
	Délai	F (1, 29) = 6,715	P=0,01
	Groupe	F (2, 29) = 5,61	P=0,009
Gfap	Interaction	F (2, 30) = 0,09783	P=0,91
	Délai	F (1, 30) = 1,816	P=0,19
	Groupe	F (2, 30) = 0,7816	P=0,47
Iba 1	Interaction	F (2, 30) = 0,03233	P=0,97
	Délai	F (1, 30) = 0,01517	P=0,90
	Groupe	F (2, 30) = 0,2855	P=0,75

"Agés" CPFm			
		F (DFn, DFd)	P value
c-fos	Interaction	F (2, 37) = 0,1916	P=0,83
	délai	F (1, 37) = 58,62	P<0,001
	Groupe	F (2, 37) = 0,7541	P=0,48
Egr1	Interaction	F (2, 37) = 0,022	P=0,98
	délai	F (1, 37) = 21,7	P<0,001
	Groupe	F (2, 37) = 0,4162	P=0,66
Atp1a2	Interaction	F (2, 37) = 0,3478	P=0,71
	délai	F (1, 37) = 0,003832	P=0,95
	Groupe	F (2, 37) = 0,5476	P=0,58
Dnah6	Interaction	F (2, 37) = 1,662	P=0,20
	délai	F (1, 37) = 0,04665	P=0,83
	Groupe	F (2, 37) = 0,1982	P=0,82
Dnah12	Interaction	F (2, 37) = 1,237	P=0,30
	délai	F (1, 37) = 0,00515	P=0,94
	Groupe	F (2, 37) = 0,1786	P=0,84
Drc1	Interaction	F (2, 37) = 0,05973	P=0,94
	délai	F (1, 37) = 1,996	P=0,17
	Groupe	F (2, 37) = 0,3183	P=0,73
Sgk3	Interaction	F (2, 37) = 0,1962	P=0,82
	délai	F (1, 37) = 0,3549	P=0,55
	Groupe	F (2, 37) = 0,9841	P=0,38
Tor1aip2	Interaction	F (2, 37) = 0,3498	P=0,71
	délai	F (1, 37) = 0,04652	P=0,83
	Groupe	F (2, 37) = 2,004	P=0,15
Tspan2	Interaction	F (2, 37) = 1,217	P=0,31
	délai	F (1, 37) = 0,01668	P=0,90
	Groupe	F (2, 37) = 1,121	P=0,34
UGT8	Interaction	F (2, 37) = 0,5576	P=0,58
	délai	F (1, 37) = 0,6162	P=0,44
	Groupe	F (2, 37) = 1,227	P=0,30
Bmyc	Interaction	F (2, 37) = 2,313	P=0,11
	délai	F (1, 37) = 0,05433	P=0,82
	Groupe	F (2, 37) = 0,5364	P=0,59
CKB	Interaction	F (2, 37) = 0,5098	P=0,60
	délai	F (1, 37) = 0,7858	P=0,38
	Groupe	F (2, 37) = 1,732	P=0,19
Hdac10	Interaction	F (2, 37) = 0,0002845	P>0,99
	délai	F (1, 37) = 0,8717	P=0,36
	Groupe	F (2, 37) = 1,991	P=0,15
AdamTS10	Interaction	F (2, 37) = 0,3193	P=0,73
	délai	F (1, 37) = 0,01839	P=0,89
	Groupe	F (2, 37) = 0,468	P=0,63
Col5a2	Interaction	F (2, 37) = 0,06013	P=0,94
	délai	F (1, 37) = 0,455	P=0,50
	Groupe	F (2, 37) = 0,295	P=0,75
Col27a1	Interaction	F (2, 37) = 1,487	P=0,24
	délai	F (1, 37) = 3,4e-005	P>0,99
	Groupe	F (2, 37) = 3,584	P=0,04
JunD	Interaction	F (2, 37) = 0,1414	P=0,87
	délai	F (1, 37) = 0,1702	P=0,68
	Groupe	F (2, 37) = 1,232	P=0,30
Camk2n2	Interaction	F (2, 37) = 0,1865	P=0,83
	délai	F (1, 37) = 2,771	P=0,10
	Groupe	F (2, 37) = 3,371	P=0,05
Iba1	Interaction	F (2, 37) = 0,1693	P=0,84
	délai	F (1, 37) = 1,819	P=0,19
	Groupe	F (2, 37) = 0,7899	P=0,46

"Agés" Hip dorsal			
		F (DFn, DFd)	P value
c-fos	Interaction	F (2, 40) = 0,2994	P=0,74
	Délai	F (1, 40) = 28,34	P<0,001
	Groupe	F (2, 40) = 0,3179	P=0,73
Egr1	Interaction	F (2, 40) = 1,05	P=0,36
	Délai	F (1, 40) = 18,86	P<0,001
	Groupe	F (2, 40) = 0,3798	P=0,69
Atp1a2	Interaction	F (2, 40) = 1,322	P=0,28
	Délai	F (1, 40) = 5,692	P=0,02
	Groupe	F (2, 40) = 3,335	P=0,05
Dnah6	Interaction	F (2, 39) = 1,287	P=0,29
	Délai	F (1, 39) = 1,305	P=0,26
	Groupe	F (2, 39) = 0,2815	P=0,76
Dnah12	Interaction	F (2, 40) = 2,693	P=0,08
	Délai	F (1, 40) = 0,7934	P=0,38
	Groupe	F (2, 40) = 0,2005	P=0,82
Drc1	Interaction	F (2, 40) = 1,004	P=0,38
	Délai	F (1, 40) = 0,1339	P=0,72
	Groupe	F (2, 40) = 1,765	P=0,18
Bmyc	Interaction	F (2, 40) = 2,687	P=0,08
	Délai	F (1, 40) = 2,888	P=0,10
	Groupe	F (2, 40) = 1,987	P=0,15
CKB	Interaction	F (2, 40) = 0,8061	P=0,45
	Délai	F (1, 40) = 4,416	P=0,04
	Groupe	F (2, 40) = 0,1157	P=0,89
Nxph3	Interaction	F (2, 40) = 0,195	P=0,82
	Délai	F (1, 40) = 2,026	P=0,16
	Groupe	F (2, 40) = 0,3736	P=0,69
Gpx1	Interaction	F (2, 40) = 1,358	P=0,27
	Délai	F (1, 40) = 0,1808	P=0,67
	Groupe	F (2, 40) = 1,647	P=0,21
JunB	Interaction	F (2, 40) = 1,002	P=0,38
	Délai	F (1, 40) = 20,75	P<0,001
	Groupe	F (2, 40) = 0,07787	P=0,93
Atp2a3	Interaction	F (2, 40) = 0,2113	P=0,81
	Délai	F (1, 40) = 2,256	P=0,14
	Groupe	F (2, 40) = 0,3358	P=0,72
Kif3a	Interaction	F (2, 40) = 2,133	P=0,13
	Délai	F (1, 40) = 2,773	P=0,10
	Groupe	F (2, 40) = 0,6561	P=0,52
Abca5	Interaction	F (2, 40) = 1,022	P=0,37
	Délai	F (1, 40) = 1,738	P=0,19
	Groupe	F (2, 40) = 0,2654	P=0,77
Gria1	Interaction	F (2, 40) = 1,469	P=0,24
	Délai	F (1, 40) = 3,489	P=0,07
	Groupe	F (2, 40) = 0,4799	P=0,62
Ppp1r9a	Interaction	F (2, 40) = 1,48	P=0,24
	Délai	F (1, 40) = 2,664	P=0,11
	Groupe	F (2, 40) = 0,01575	P=0,98
Med1	Interaction	F (2, 40) = 0,7848	P=0,46
	Délai	F (1, 40) = 3,603	P=0,06
	Groupe	F (2, 40) = 0,4023	P=0,67
Gfap	Interaction	F (2, 40) = 1,336	P=0,27
	Délai	F (1, 40) = 2,349	P=0,13
	Groupe	F (2, 40) = 0,8095	P=0,45
Iba 1	Interaction	F (2, 40) = 0,9922	P=0,38
	Délai	F (1, 40) = 0,6199	P=0,44
	Groupe	F (2, 40) = 2,6	P=0,09

"Adultes" CPFm			
		F (DFn, DFd)	P value
c-fos	Interaction	F (2, 29) = 0,5253	P=0,60
	Délai	F (1, 29) = 98,22	P<0,001
	Groupe	F (2, 29) = 2,646	P=0,09
Egr1	Interaction	F (2, 30) = 0,5937	P=0,56
	Délai	F (1, 30) = 39,73	P<0,001
	Groupe	F (2, 30) = 2,74	P=0,08
Atp1a2	Interaction	F (2, 30) = 3,975	P=0,03
	Délai	F (1, 30) = 10,05	P=0,003
	Groupe	F (2, 30) = 1,779	P=0,19
Dnah6	Interaction	F (2, 30) = 0,3035	P=0,74
	Délai	F (1, 30) = 0,5498	P=0,46
	Groupe	F (2, 30) = 2,934	P=0,07
Dnah12	Interaction	F (2, 29) = 1,807	P=0,18
	Délai	F (1, 29) = 0,06693	P=0,80
	Groupe	F (2, 29) = 2,171	P=0,13
Drc1	Interaction	F (2, 29) = 3,382	P=0,05
	Délai	F (1, 29) = 0,08019	P=0,78
	Groupe	F (2, 29) = 1,284	P=0,29
Sgk3	Interaction	F (2, 29) = 1,54	P=0,23
	Délai	F (1, 29) = 1,757	P=0,20
	Groupe	F (2, 29) = 0,1688	P=0,85
Tor1aip2	Interaction	F (2, 28) = 1,536	P=0,23
	Délai	F (1, 28) = 8,199	P=0,008
	Groupe	F (2, 28) = 6,253	P=0,006
Tspan2	Interaction	F (2, 29) = 0,4133	P=0,67
	Délai	F (1, 29) = 1,124	P=0,30
	Groupe	F (2, 29) = 0,7739	P=0,47
UGT8	Interaction	F (2, 28) = 0,01146	P=0,99
	Délai	F (1, 28) = 0,5608	P=0,46
	Groupe	F (2, 28) = 1,12	P=0,34
Bmyc	Interaction	F (2, 29) = 0,4112	P=0,67
	Délai	F (1, 29) = 12,31	P=0,001
	Groupe	F (2, 29) = 4,123	P=0,03
CKB	Interaction	F (2, 29) = 0,09706	P=0,91
	Délai	F (1, 29) = 0,03358	P=0,86
	Groupe	F (2, 29) = 0,3502	P=0,71
Hdac10	Interaction	F (2, 29) = 4,088	P=0,03
	Délai	F (1, 29) = 2,187	P=0,15
	Groupe	F (2, 29) = 3,26	P=0,05
AdamTS10	Interaction	F (2, 30) = 2,175	P=0,13
	Délai	F (1, 30) = 2,114	P=0,16
	Groupe	F (2, 30) = 0,9187	P=0,41
Col5a2	Interaction	F (2, 28) = 4,2	P=0,03
	Délai	F (1, 28) = 2,654	P=0,11
	Groupe	F (2, 28) = 0,5205	P=0,60
Col27a1	Interaction	F (2, 29) = 4,176	P=0,03
	Délai	F (1, 29) = 9,13	P=0,005
	Groupe	F (2, 29) = 1,307	P=0,29
JunD	Interaction	F (2, 28) = 0,7839	P=0,47
	Délai	F (1, 28) = 0,08765	P=0,77
	Groupe	F (2, 28) = 1,105	P=0,35
Camk2n2	Interaction	F (2, 28) = 3,07	P=0,06
	Délai	F (1, 28) = 0,1465	P=0,70
	Groupe	F (2, 28) = 0,5436	P=0,59
Iba1	Interaction	F (2, 27) = 0,8556	P=0,44
	Délai	F (1, 27) = 0,1298	P=0,72
	Groupe	F (2, 27) = 1,238	P=0,31

"Ados" CPFm Persist			
		F (DFn, DFd)	P value
CKB	Interaction	F (2, 30) = 3,377	P=0,05
	Délai	F (1, 30) = 0,5039	P=0,48
	Groupe	F (2, 30) = 1,706	P=0,20
Bmyc	Interaction	F (2, 30) = 3,305	P=0,05
	Délai	F (1, 30) = 0,3414	P=0,56
	Groupe	F (2, 30) = 0,564	P=0,57
Camk2n2	Interaction	F (2, 30) = 4,223	P=0,02
	Délai	F (1, 30) = 2,471	P=0,13
	Groupe	F (2, 30) = 1,261	P=0,30
Tomm6	Interaction	F (2, 30) = 0,09875	P=0,91
	Délai	F (1, 30) = 5,779	P=0,02
	Groupe	F (2, 30) = 2,971	P=0,07
C1qtnf4	Interaction	F (2, 30) = 0,2979	P=0,74
	Délai	F (1, 30) = 0,7178	P=0,40
	Groupe	F (2, 30) = 0,1116	P=0,89
Gadd45g	Interaction	F (2, 30) = 0,7972	P=0,46
	Délai	F (1, 30) = 0,001613	P=0,97
	Groupe	F (2, 30) = 0,5155	P=0,60
JunB	Interaction	F (2, 29) = 1,316	P=0,28
	Délai	F (1, 29) = 2,469	P=0,13
	Groupe	F (2, 29) = 0,4674	P=0,63
Mif	Interaction	F (2, 30) = 0,7745	P=0,47
	Délai	F (1, 30) = 2,567	P=0,12
	Groupe	F (2, 30) = 0,3859	P=0,68

"Adultes" CPFm Persist			
		F (DFn, DFd)	P value
CKB	Interaction	F (2, 25) = 3,671	P=0,04
	Délai	F (1, 25) = 0,03699	P=0,85
	Groupe	F (2, 25) = 0,2904	P=0,75
Bmyc	Interaction	F (2, 25) = 2,2	P=0,13
	Délai	F (1, 25) = 0,1555	P=0,70
	Groupe	F (2, 25) = 0,37	P=0,69
Camk2n2	Interaction	F (2, 25) = 7,373	P=0,003
	Délai	F (1, 25) = 0,01067	P=0,92
	Groupe	F (2, 25) = 0,1567	P=0,86
Tomm6	Interaction	F (2, 25) = 2,389	P=0,11
	Délai	F (1, 25) = 0,00118	P=0,97
	Groupe	F (2, 25) = 0,3137	P=0,73
C1qtnf4	Interaction	F (2, 25) = 0,6843	P=0,51
	Délai	F (1, 25) = 0,08117	P=0,78
	Groupe	F (2, 25) = 0,8357	P=0,45
Gadd45g	Interaction	F (2, 25) = 4,476	P=0,02
	Délai	F (1, 25) = 0,005472	P=0,94
	Groupe	F (2, 25) = 0,2705	P=0,77
JunB	Interaction	F (2, 25) = 3,232	P=0,06
	Délai	F (1, 25) = 0,5923	P=0,45
	Groupe	F (2, 25) = 0,5793	P=0,57
Mif	Interaction	F (2, 25) = 1,963	P=0,16
	Délai	F (1, 25) = 0,03342	P=0,86
	Groupe	F (2, 25) = 0,1567	P=0,86

Annexe 9 : Rapport pour le RNA-seq de l'hippocampe dorsal

Differential expression analysis of S16278 project

Damien Plassard

March 21, 2017

Contents

1 Heatmap **1**

2 Statistical analysis **1**

3 Delivery files **11**

4 Version of used packages **12**

1 Heatmap

2 Statistical analysis

Comparisons of interest have been performed using the statistical method proposed by Anders and Huber [6]. The Wald test was used to estimate the p-values and they were adjusted for multiple testing with the Benjamini and Hochberg method [7].

The first analysis has been performed after removing the TEMOIN samples (NSLC115, NSLC116, NSLC117, NSLC124, NSLC125, NSLC126) and NSLC121 sample. The second analysis has been performed after removing the NSLC116, NSLC121 and NSLC126 samples.

A summary of the differentially expressed genes, for each comparison, is available in Table 1 and Table 2. A specific design has been used for making these comparisons (a design comprising only the samples to be compared)

Table 1: **Summary of the comparison results without TEMOIN samples and NSLC121 sample.** These genes correspond to genes with p-value adjusted for multiple testing < 0.05.

Comparison	Number of over-expressed genes	Number of under-expressed genes	Total
J0RF vs J0SHAM	862	362	1224
J3RF vs J3SHAM	2	0	2
J3SHAM vs J0SHAM	1627	1593	3220
J3RF vs J0RF	6	1	7

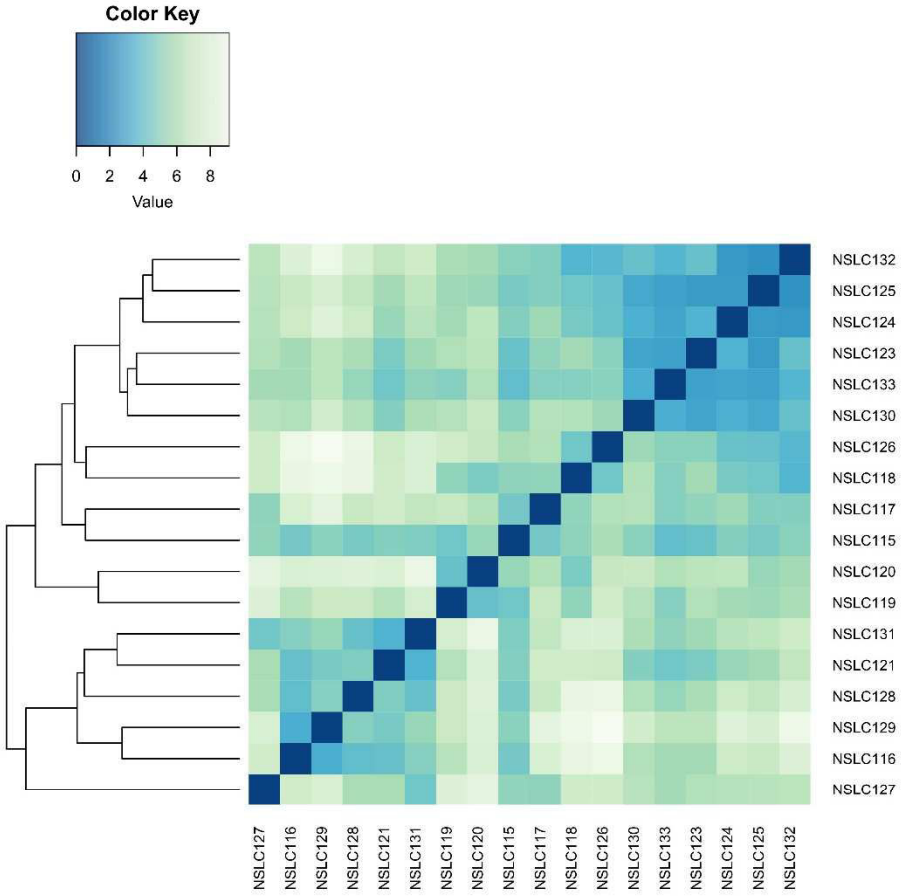


Figure 1: **Sample-to-sample distances.** Hierarchical clustering of all samples was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

2

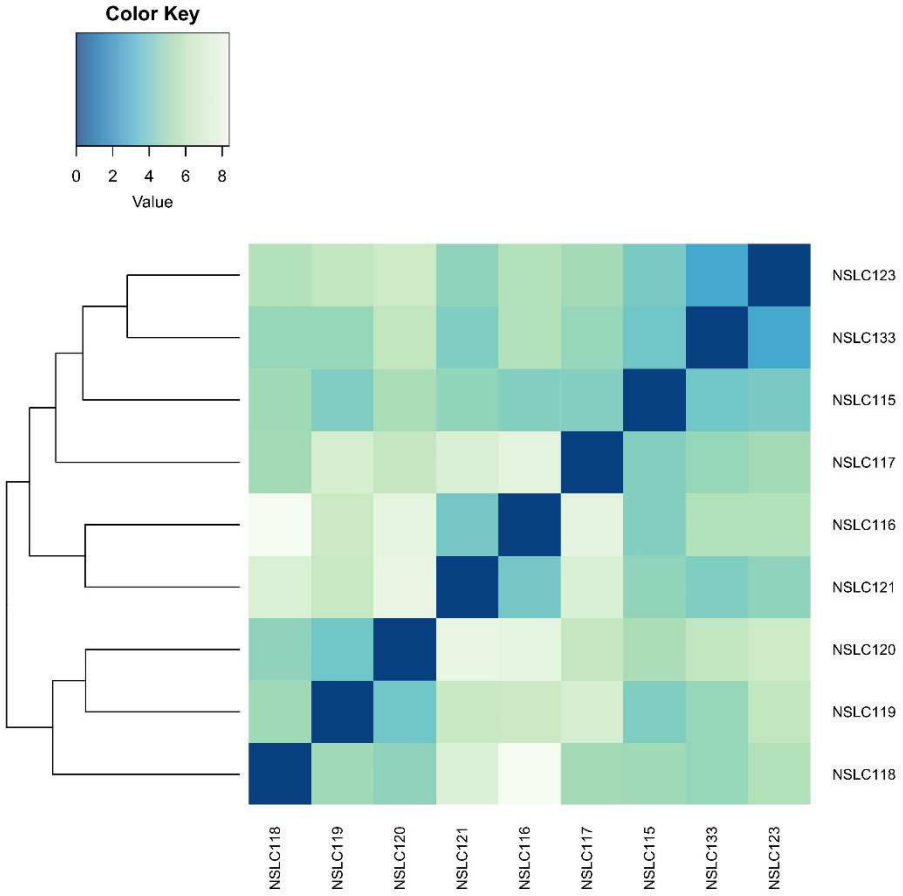


Figure 2: **Sample-to-sample distances.** Hierarchical clustering of J0 samples was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

3

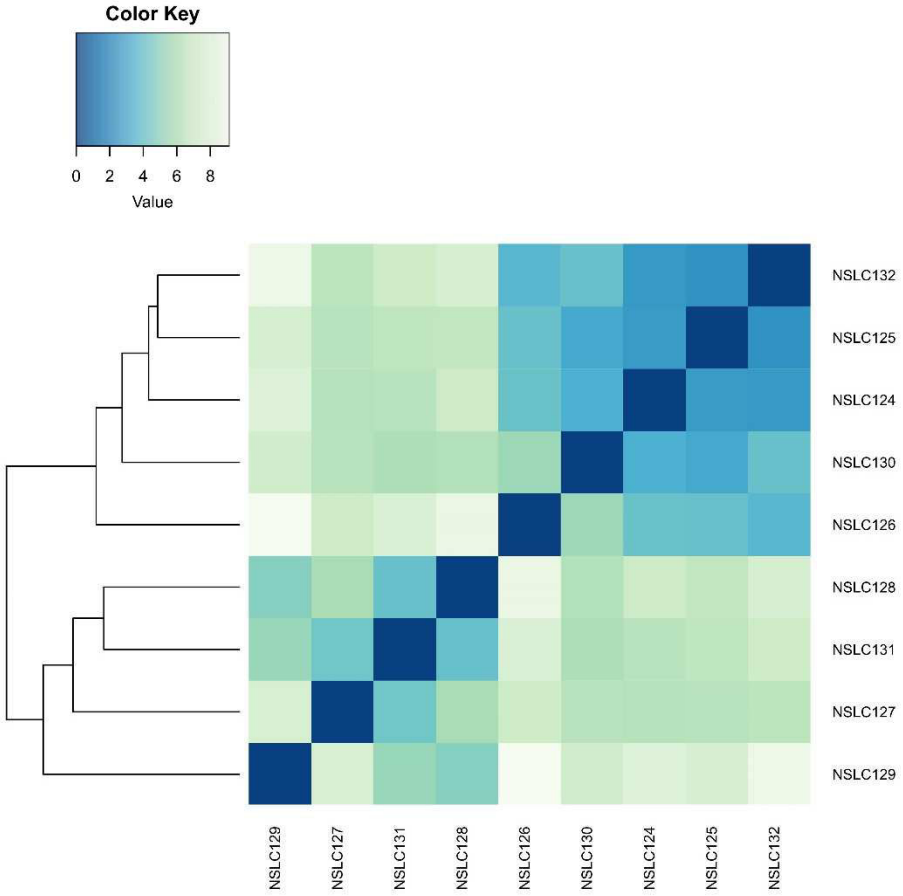


Figure 3: **Sample-to-sample distances.** Hierarchical clustering of J3 samples was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

4

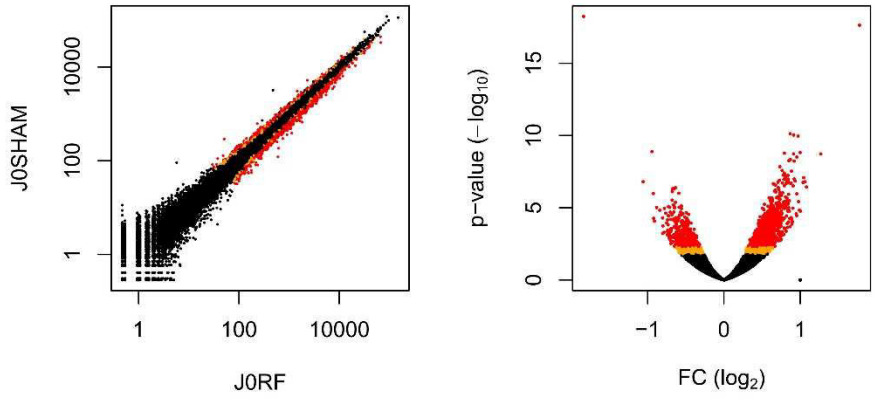


Figure 4: **J0RF vs J0SHAM first analysis: Statistical results.** The graph on the left represents a scatterplot of the normalized gene expression. For a given gene, its value is obtained by mean on all samples belonging to the same condition. The graph on the right represents a volcano plot. The x-axis represents the $\log_2$ Fold Change values and the y-axis the p-values (in $-\log_{10}$). Red points show values with an adjusted p-value < 0.05 and orange points show values with an adjusted p-value < 0.1.

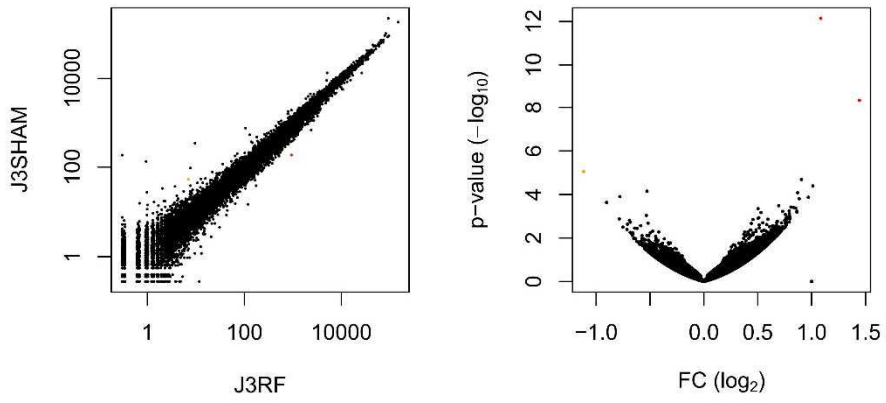


Figure 5: **J3RF vs J3SHAM first analysis: Statistical results.**

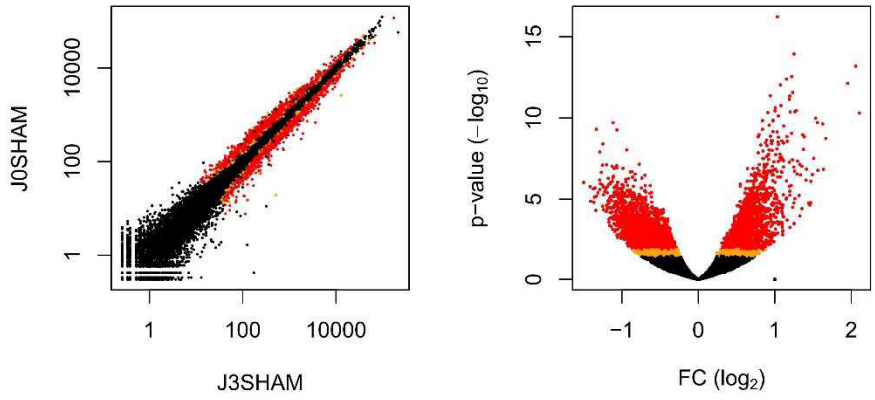


Figure 6: **J3SHAM vs J0SHAM first analysis: Statistical results.**

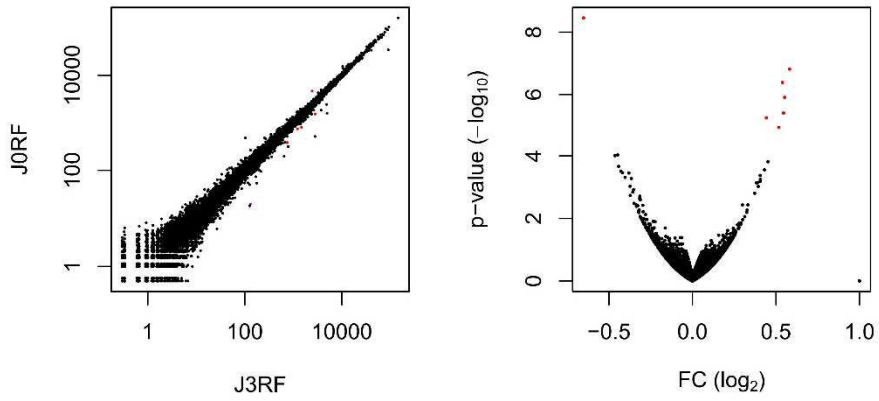


Figure 7: **J3RF vs J0RF first analysis: Statistical results.**

6

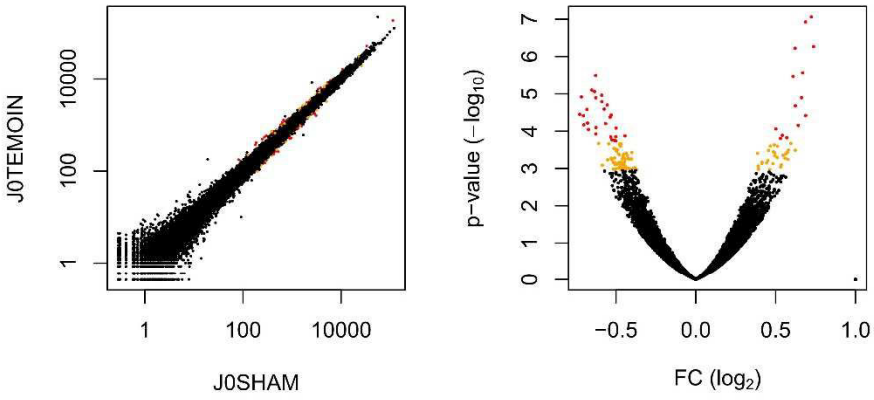


Figure 8: **J0SHAM vs J0TEMOIN second analysis: Statistical results.**

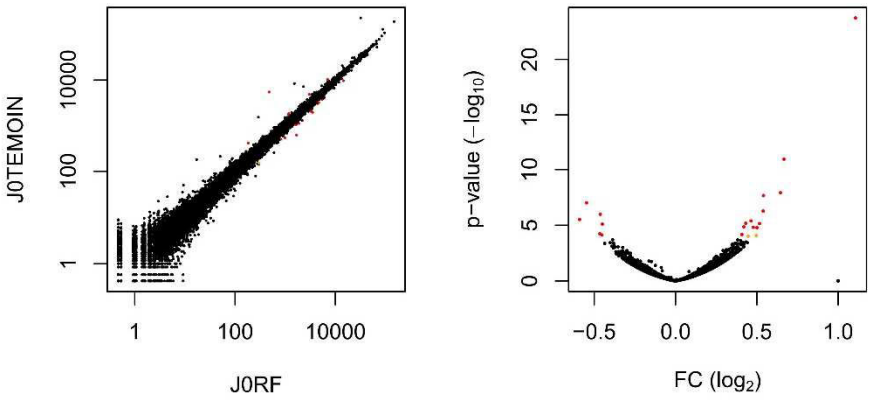


Figure 9: **J0RF vs J0TEMOIN second analysis: Statistical results.**

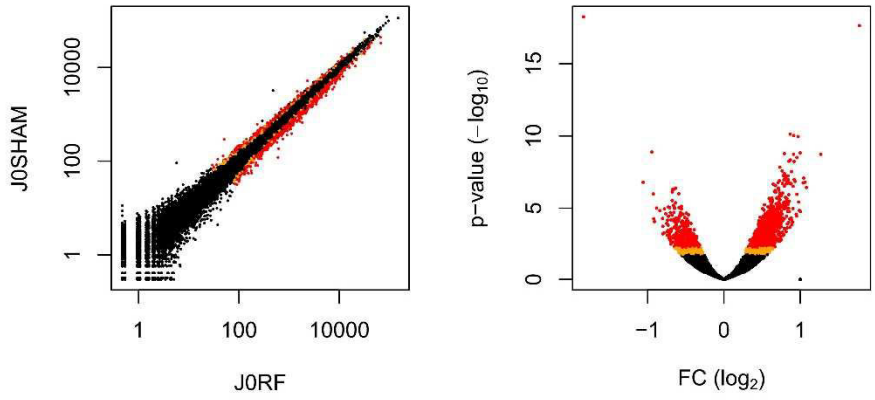


Figure 10: **J0RF vs J0SHAM second analysis: Statistical results.**

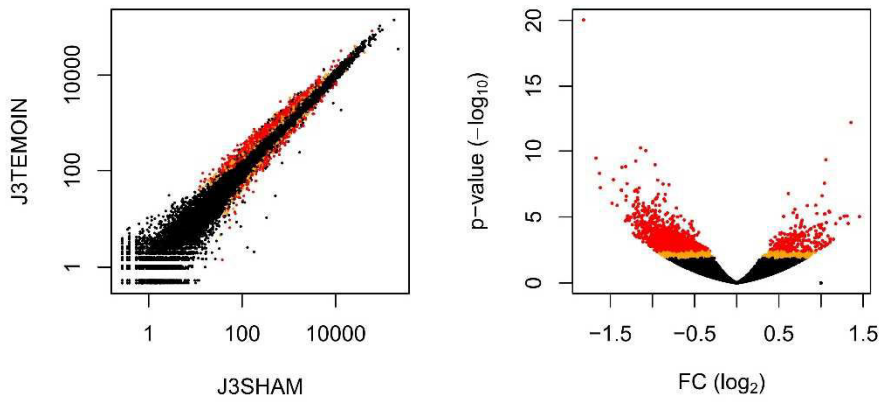


Figure 11: **J3SHAM vs J3TEMOIN second analysis: Statistical results.**

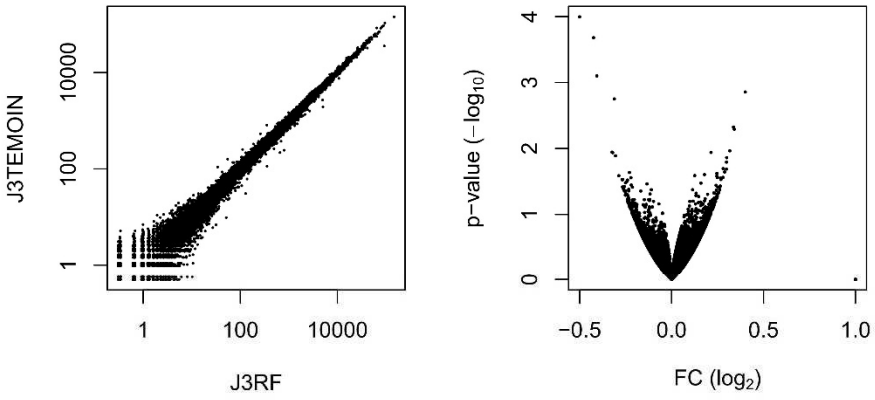


Figure 12: **J3RF vs J3TEMOIN second analysis: Statistical results.**

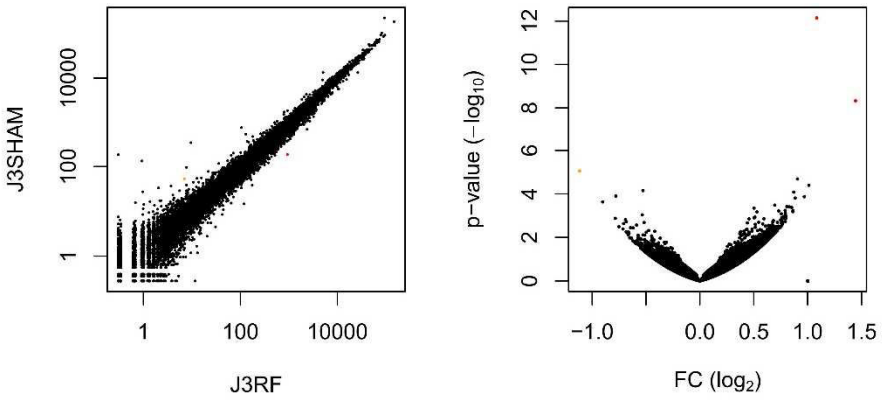


Figure 13: **J3RF vs J3SHAM second analysis: Statistical results.**

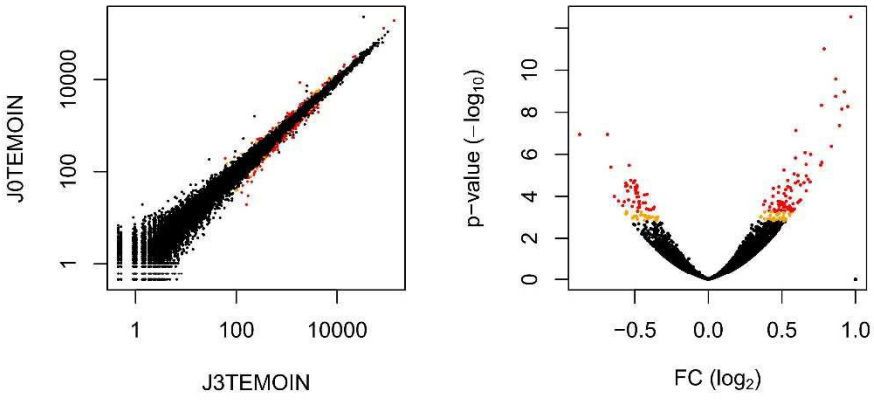


Figure 14: **J3TEMOIN vs J0TEMOIN second analysis: Statistical results.**

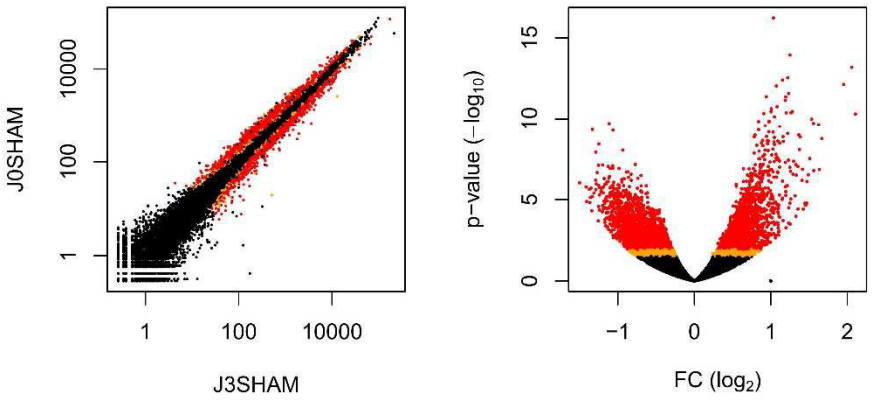


Figure 15: **J3SHAM vs J0SHAM second analysis: Statistical results.**

10

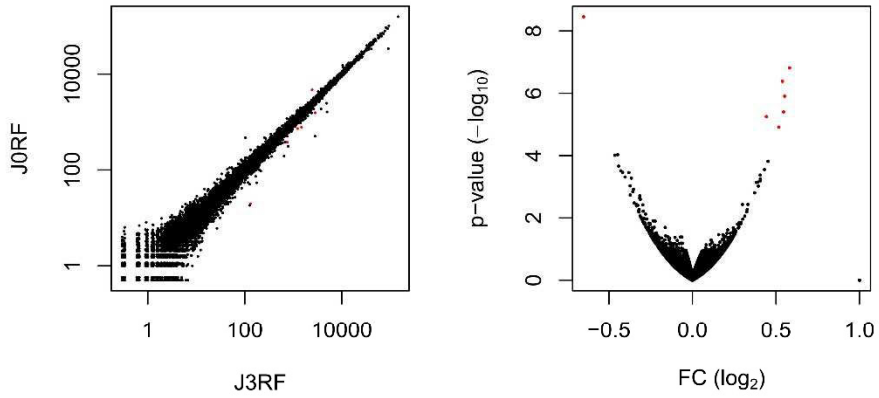


Figure 16: **J3RF vs J0RF second analysis: Statistical results.**

Table 2: **Summary of the comparison results without NSLC116, NSLC121 and NSLC126 samples.** These genes correspond to genes with p-value adjusted for multiple testing < 0.05.

Comparison	Number of over-expressed genes	Number of under-expressed genes	Total
J0SHAM vs J0TEMOIN	14	27	41
J0RF vs J0TEMOIN	12	6	18
J0RF vs J0SHAM	862	362	1224
J3SHAM vs J3TEMOIN	243	897	1140
J3RF vs J3TEMOIN	0	0	0
J3RF vs J3SHAM	2	0	2
J3TEMOIN vs J0TEMOIN	80	46	126
J3SHAM vs J0SHAM	1620	1585	3205
J3RF vs J0RF	6	1	7

3 Delivery files

Alignment files

An alignment file, in bam format, is avaible for each sample, with its index file (bai format). These files can be viewed in any genome browser, like IGV [1] (Integrative Genomics Viewer).

Excel file

An excel file provides raw read counts and normalized read counts for each gene together with the p-value and log2 fold-change for the requested comparisons. Genes with a null raw read count for each sample were removed. Below is a description of each column:

[1] `http://software.broadinstitute.org/software/igv/`

Ensembl gene id The Ensembl ID of the gene.

Raw read counts The quantity of reads that have been mapped to the gene.

Normalized The normalized read counts. You can use these values to compare expression between samples.

Normalized and divided by gene length in kb The normalized read counts that have been divided by the gene length. The gene length has been estimated as the median of all transcripts. You can used these counts to compare expression between genes of a sample.

Gene name The common gene name.

Description The description of the gene.

Chromosome name The name of the chromosome where the gene is.

Start position The start coordinate of the gene.

End position The end coordinate of the gene.

Gene biotype The biotype of the gene as defined by Ensembl.

GO:biological process The Gene Ontology terms associated to the biological process domain. A biological process term describes a series of events accomplished by one or more organized assemblies of molecular functions. A biological process is not equivalent to a pathway.

GO:molecular function The Gene Ontology terms associated to the molecular function domain. Molecular function terms describes activities that occur at the molecular level. They represent activities rather than the entities that perform the actions, and do not specify where, when, or in what context the action takes place.

GO:cellular component The Gene Ontology terms associated to the cellular component domain. These terms describe a component of a cell that is part of a larger object, such as an anatomical structure or a gene product group.

log2 The estimation of the fold change value (in log_2) indicating how much the differential expression of a gene is important between two conditions. The higher the absolute value is, the more differential the expression level is.

P-value The p-value associated to the fold change. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

Adjusted p-value The corrected p-value associated to the fold change when the multiple testing has been taken into account. This value is never lower than the p-value. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

4 Version of used packages

References

[1] Trapnell C, Pachter L, Salzberg L. *Tophat: discovering splice junctions with rna-seq.* Bioinformatics, 25:1105-1111, 2009.

[2] Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.* Genome Biology, 14:R36, 2013.

[3] Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome.* Genome Biology, 10:R25, 2009.

[4] `http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html`

[5] Anders S, Huber W. *Differential expression analysis for sequence count data.* Genome Biology, 11:R106, 2010.

[6] Love M, Huber W, Anders S. *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.* Genome Biology, 15:550, 2014.

[7] Benjamini Y, Hochberg Y. *Controlling the false discovery rate: a pratical and powerful approach to multiple testing.* Journaa of the Royal Statistical Society, 57:289-300, 1995.

Annexe 10 : Rapport pour le RNA-seq du CPFm

Differential expression analysis of S17038 project

Damien Plassard

June 2, 2017

Contents

1 Details about the samples **1**

2 Mapping **1**

3 Quantification **1**

4 Normalization of the data **2**

5 Clustering analysis **3**
5.1 Variance stabilization 3
5.2 Principal Component Analysis and Heatmap 3

6 Statistical analysis **8**

7 Delivery files **8**

8 Version of used packages **17**

1 Details about the samples

All samples were sequenced on the flow cell HS370 in 50-length Single-Read. A summary of the main characteristics of the input data analyzed in this document is available in Table 1.

Input data used in this document correspond to the fastq files where rRNA reads were removed.

2 Mapping

Reads were mapped onto the rn6 assembly of the *Rattus norvegicus* genome using Tophat 2.0.14 [1, 2] and bowtie version 2-2.1.0 [3]. A summary of the mapping results is avaiblable in Table 2.

Only uniquely mapped reads have been retained for further analyses.

3 Quantification

Quantification of gene expression has been performed using HTSeq-0.6.1 [4] with annotations coming from Ensembl 86. Table 3 shows summary about the assignment of the gene name to each read.

Only no-ambiguously assigned reads have been retained for further analyses.

Table 1: **Main characteristics of the analyzed input data.** The field "Nb total reads" indicates the total number of reads in the input fastq files; the field "Nb unique reads" indicates the number of unique reads (without duplicates); and the field "%" corresponds to the percentage of the ratio "Nb unique reads"/"Nb total reads".

Sample ID	Sample name	Nb total reads	Nb unique reads	%
NSLC134	14_J0_TEMCx_1	49,458,039	14,396,663	29.11
NSLC135	16_J0_TEMCx_2	59,316,476	16,808,507	28.34
NSLC136	18_J0_TEMCx_3	40,474,332	13,228,789	32.68
NSLC137	2_J0_SHCx_4	53,317,495	16,451,815	30.86
NSLC138	3_J0_SHCx_5	49,957,346	15,538,538	31.10
NSLC139	4_J0_SHCx_6	47,606,111	14,877,332	31.25
NSLC140	8_J0_RFCx_7	49,943,514	15,184,748	30.40
NSLC141	10_J0_RFCx_8	42,837,517	13,476,014	31.46
NSLC142	11_J0_RFCx_9	46,908,482	14,838,201	31.63
NSLC143	31_J3_TEMCx_10	46,425,778	14,320,919	30.85
NSLC144	32_J3_TEMCx_11	48,940,154	15,042,753	30.74
NSLC145	34_J3_TEMCx_12	52,334,489	15,438,335	29.50
NSLC146	21_J3_SHCx_13	35,848,426	12,139,862	33.86
NSLC147	22_J3_SHCx_14	51,303,708	15,022,548	29.28
NSLC148	24_J3_SHCx_15	53,050,069	15,739,919	29.67
NSLC149	25_J3_RFCx_16	52,826,552	15,457,143	29.26
NSLC150	29_J3_RFCx_17	47,497,371	13,073,573	27.52
NSLC151	30_J3_RFCx_18	44,062,475	14,393,208	32.67

Table 2: **Summary of mapping results.** The field "Nb total reads" indicates the total number of reads in the input fastq files; the field "Nb aligned reads" indicates the number of mapped reads; the field "Nb uniquely mapped" indicates the number of reads uniqueley mapped; and the fields "$\%_1$" and "$\%_2$" are the percentage of the ratios "Nb aligned reads" and "Nb uniquely mapped" divided by "Nb aligned reads" respectively.

Sample ID	Sample name	Nb total reads	Nb aligned reads	$\%_1$	Nb uniquely mapped	$\%_2$
NSLC134	14_J0_TEMCx_1	49,458,039	48,276,258	97.61	43,757,362	90.64
NSLC135	16_J0_TEMCx_2	59,316,476	58,013,067	97.80	53,193,801	91.69
NSLC136	18_J0_TEMCx_3	40,474,332	39,567,268	97.76	36,334,070	91.83
NSLC137	2_J0_SHCx_4	53,317,495	52,059,493	97.64	47,680,412	91.59
NSLC138	3_J0_SHCx_5	49,957,346	48,760,884	97.61	44,547,676	91.36
NSLC139	4_J0_SHCx_6	47,606,111	46,532,559	97.74	42,623,594	91.60
NSLC140	8_J0_RFCx_7	49,943,514	48,813,330	97.74	44,720,372	91.62
NSLC141	10_J0_RFCx_8	42,837,517	41,839,215	97.67	38,203,212	91.31
NSLC142	11_J0_RFCx_9	46,908,482	45,885,960	97.82	41,942,714	91.41
NSLC143	31_J3_TEMCx_10	46,425,778	45,437,274	97.87	41,522,562	91.38
NSLC144	32_J3_TEMCx_11	48,940,154	47,900,257	97.88	43,818,483	91.48
NSLC145	34_J3_TEMCx_12	52,334,489	51,262,955	97.95	47,164,075	92.00
NSLC146	21_J3_SHCx_13	35,848,426	35,112,972	97.95	32,234,195	91.80
NSLC147	22_J3_SHCx_14	51,303,708	50,207,694	97.86	46,024,563	91.67
NSLC148	24_J3_SHCx_15	53,050,069	51,903,465	97.84	47,739,728	91.98
NSLC149	25_J3_RFCx_16	52,826,552	51,759,073	97.98	47,593,420	91.95
NSLC150	29_J3_RFCx_17	47,497,371	46,450,735	97.80	42,469,927	91.43
NSLC151	30_J3_RFCx_18	44,062,475	43,113,373	97.85	39,660,930	91.99

4 Normalization of the data

Read counts have then been normalized across libraries with the median-of-ratios method proposed by Anders and Huber [5].

Table 3: **Summary of quantification results.** The field "Nb uniquely mapped" indicates the number of reads uniqueley mapped; the field "Nb assigned reads" indicates the number of reads that could have been assigned to a gene; the field "Nb no-assigned" indicates the number of reads that could not be assigned to a gene; the field "Nb ambigous assigned" indicates the number of reads that can be asigned to more than one gene; and the fields "$\%_1$", "$\%_2$", and "$\%_3$" are the percentage of the ratios "Nb assigned reads", "Nb no-assigned", and "Nb ambigous assigned" divideb by "Nb uniquely mapped" respectively.

Sample ID	Sample name	Nb uniquely mapped	Nb assigned reads	$\%_1$	Nb no-assigned	$\%_2$	Nb ambigous assigned	$\%_3$
NSLC134	14_J0_TEMCx_1	43,757,362	23,628,693	54.00	20,060,578	45.85	68,091	0.16
NSLC135	16_J0_TEMCx_2	53,193,801	32,843,803	61.74	20,257,131	38.08	92,867	0.17
NSLC136	18_J0_TEMCx_3	36,334,070	23,585,766	64.91	12,681,003	34.90	67,301	0.19
NSLC137	2_J0_SHCx_4	47,680,412	28,695,070	60.18	18,906,074	39.65	79,268	0.17
NSLC138	3_J0_SHCx_5	44,547,676	26,654,230	59.83	17,818,202	40.00	75,244	0.17
NSLC139	4_J0_SHCx_6	42,623,594	26,812,725	62.91	15,733,036	36.91	77,833	0.18
NSLC140	8_J0_RFCx_7	44,720,372	28,894,101	64.61	15,746,741	35.21	79,530	0.18
NSLC141	10_J0_RFCx_8	38,203,212	22,843,237	59.79	15,295,757	40.04	64,218	0.17
NSLC142	11_J0_RFCx_9	41,942,714	25,104,126	59.85	16,770,349	39.98	68,239	0.16
NSLC143	31_J3_TEMCx_10	41,522,562	27,513,185	66.26	13,927,803	33.54	81,574	0.20
NSLC144	32_J3_TEMCx_11	43,818,483	28,655,744	65.40	15,084,101	34.42	78,638	0.18
NSLC145	34_J3_TEMCx_12	47,164,075	32,296,489	68.48	14,774,584	31.33	93,002	0.20
NSLC146	21_J3_SHCx_13	32,234,195	21,833,679	67.73	10,334,688	32.06	65,828	0.20
NSLC147	22_J3_SHCx_14	46,024,563	30,437,697	66.13	15,495,380	33.67	91,486	0.20
NSLC148	24_J3_SHCx_15	47,739,728	32,749,920	68.60	14,894,505	31.20	95,303	0.20
NSLC149	25_J3_RFCx_16	47,593,420	31,892,562	67.01	15,609,578	32.80	91,280	0.19
NSLC150	29_J3_RFCx_17	42,469,927	27,908,030	65.71	14,475,205	34.08	86,692	0.20
NSLC151	30_J3_RFCx_18	39,660,930	26,691,624	67.30	12,893,473	32.51	75,833	0.19

To check if the normalization was correctly performed, Relative Log Expression (RLE) plots were drawn (Figure 1). This kind of plot is a useful diagnostic plot to visualize the differences between the distributions of read counts across samples. It shows the boxplots of the log-ratios of the gene-level read counts of each sample to those of a reference sample (defined as the median across the samples). Ideally, the distributions should be centered around the zero line and as tight as possible. Clear deviations indicate the need for normalization and/or the presence of outlying samples.

5 Clustering analysis

5.1 Variance stabilization

In RNA-Seq data, genes with larger average expression have on average larger observed variances across samples, that is, they vary in expression from sample to sample more than other genes with lower average expression.

The Principal Component Analysis (PCA) method uses the variance to explain the data and may be overly influenced by these genes. To avoid that, variance should be stabilized. Figure 2A shows your data without stabilized variance and Figure 2B shows your data stabilized using the regularized log transformation (rlog) method [6].

5.2 Principal Component Analysis and Heatmap

Figure 3 provides a Principal Component Analysis (PCA) based on their normalized and stabilized gene expression level.

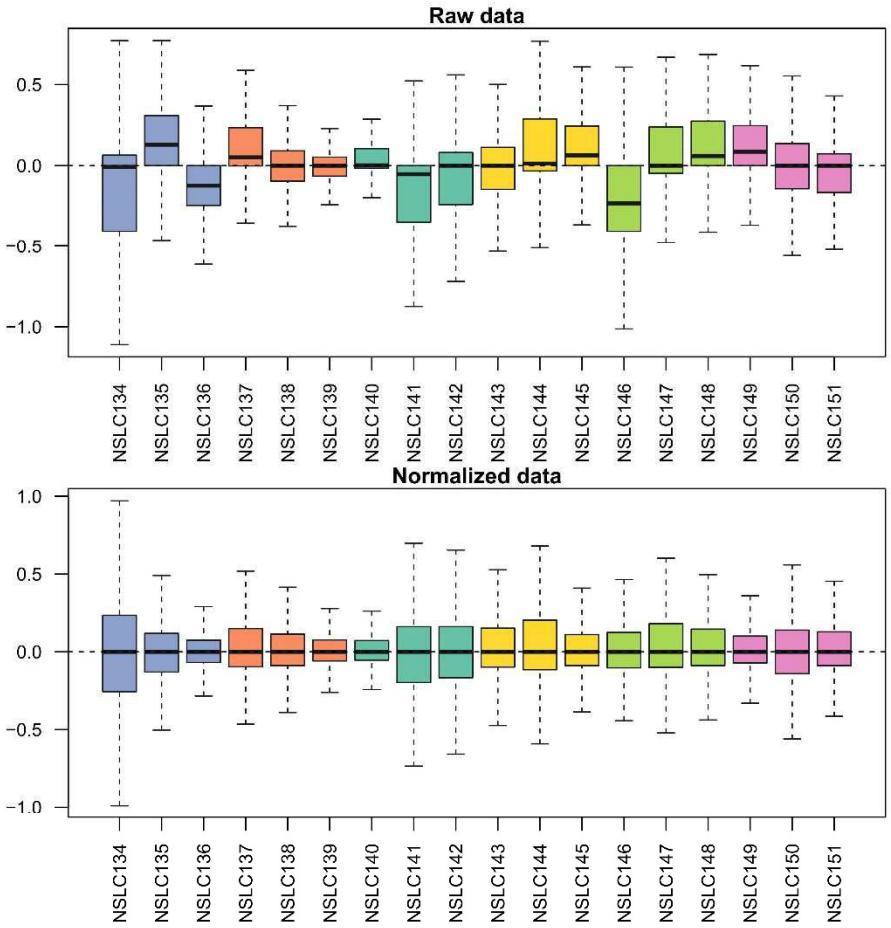


Figure 1: **Relative Log Expression of raw and normalized data.** The x-axis represents the samples that will be analyzed and the y-axis the relative log expression (RLE) values. Each experimental condition is represented by a different color.

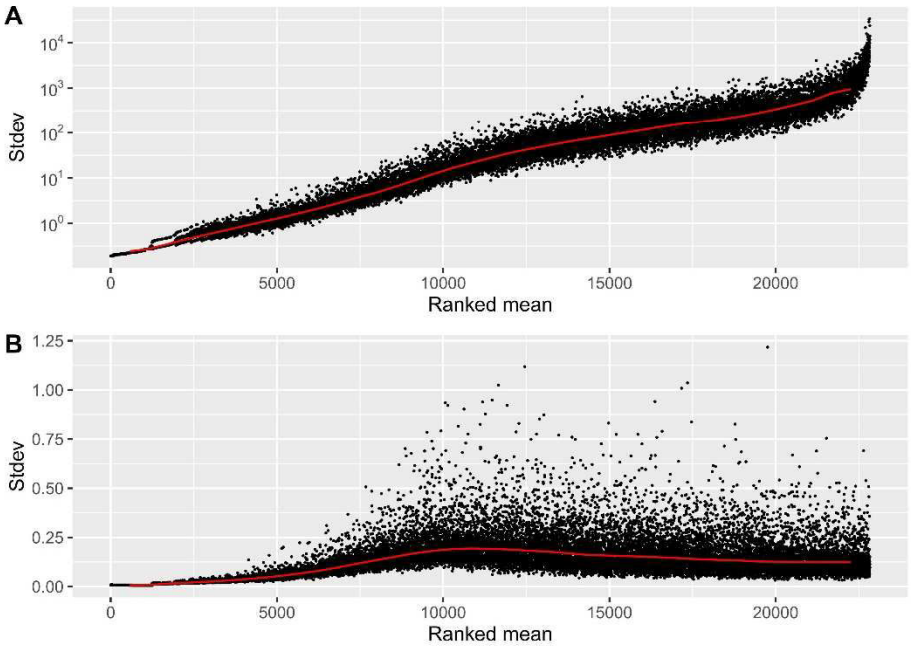


Figure 2: **Standard-deviation in function of the ranked mean.** The x-axis represents the rank of the mean and the y-axis the standard-deviation of the normalized read counts. Each black dot represents a gene. The red line represents the median. If there is no variance-mean dependence, then the line should be approximately horizontal. **(A)** Data without any stabilization; **(B)** data stabilized with the regularized log transformation (rlog) method.

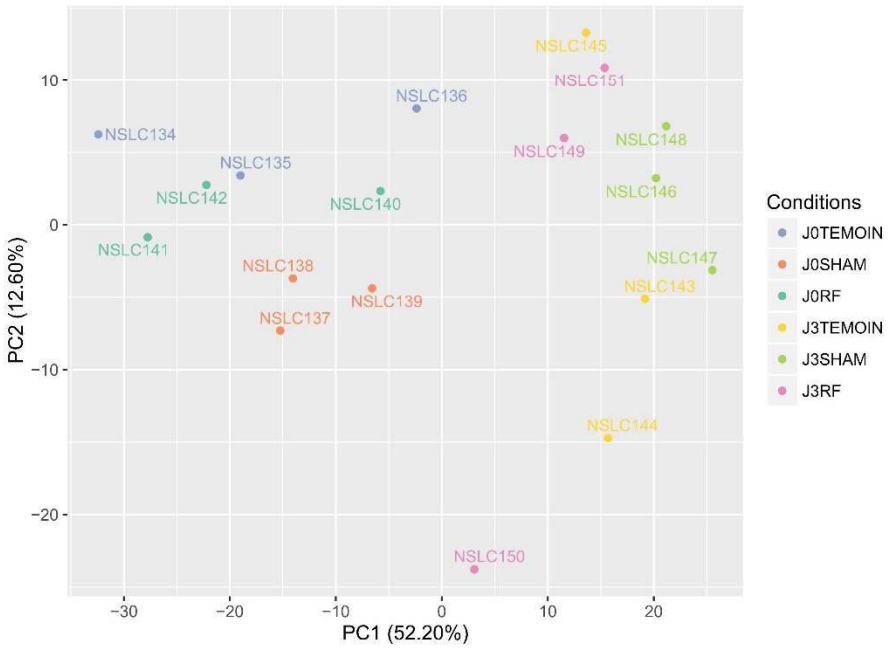


Figure 3: **General principal component analysis.** This PCA contains all of the samples. Each condition is represented by a different color.

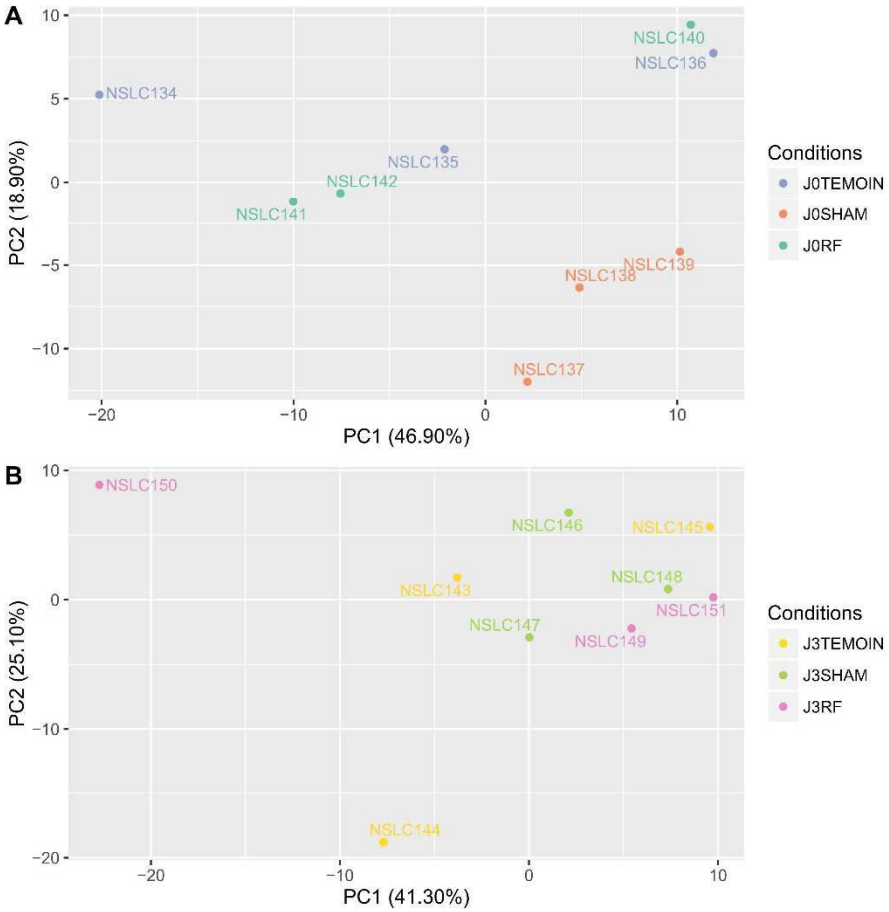


Figure 4: **Principal component analysis for each group.**

Figure 5 represents another samples clustering visualization. Figure 6 et figure 7 represents a sample-to-sample clustering for J0 and J3 groups.

6 Statistical analysis

Comparisons of interest have been performed using the statistical method proposed by Anders and Huber [6]. The Wald test was used to estimate the p-values and they were adjusted for multiple testing with the Benjamini and Hochberg method [7].

A summary of the differentially expressed genes, for each comparison, is available in Table 4.

Table 4: **Summary of the comparison results.** The results corresponds to genes with a p-value adjusted for multiple testing < 0.05.

Comparison	Number of over-expressed genes	Number of under-expressed genes	Total
J0SHAM vs J0TEMOIN	121	165	286
J0RF vs J0TEMOIN	24	1	25
J0RF vs J0SHAM	123	84	207
J3SHAM vs J3TEMOIN	27	1	28
J3RF vs J3TEMOIN	1	0	1
J3RF vs J3SHAM	4	164	168
J3TEMOIN vs J0TEMOIN	2013	774	2787
J3SHAM vs J0SHAM	3417	2029	5446
J3RF vs J0RF	1265	488	1753

7 Delivery files

Alignment files

An alignment file, in bam format, is avaible for each sample, with its index file (bai format). These files can be viewed in any genome browser, like IGV [1] (Integrative Genomics Viewer).

Excel file

An excel file provides raw read counts and normalized read counts for each gene together with the p-value and log2 fold-change for the requested comparisons. Genes with a null raw read count for each sample were removed. Below is a description of each column:

Ensembl gene id The Ensembl ID of the gene.

Raw read counts The quantity of reads that have been mapped to the gene.

Normalized The normalized read counts. You can use these values to compare expression between samples.

Normalized and divided by gene length in kb The normalized read counts that have been divided by the gene length. The gene length has been estimated as the median of all transcripts. You can used these counts to compare expression between genes of a sample.

Gene name The common gene name.

Description The description of the gene.

[1] `http://software.broadinstitute.org/software/igv/`

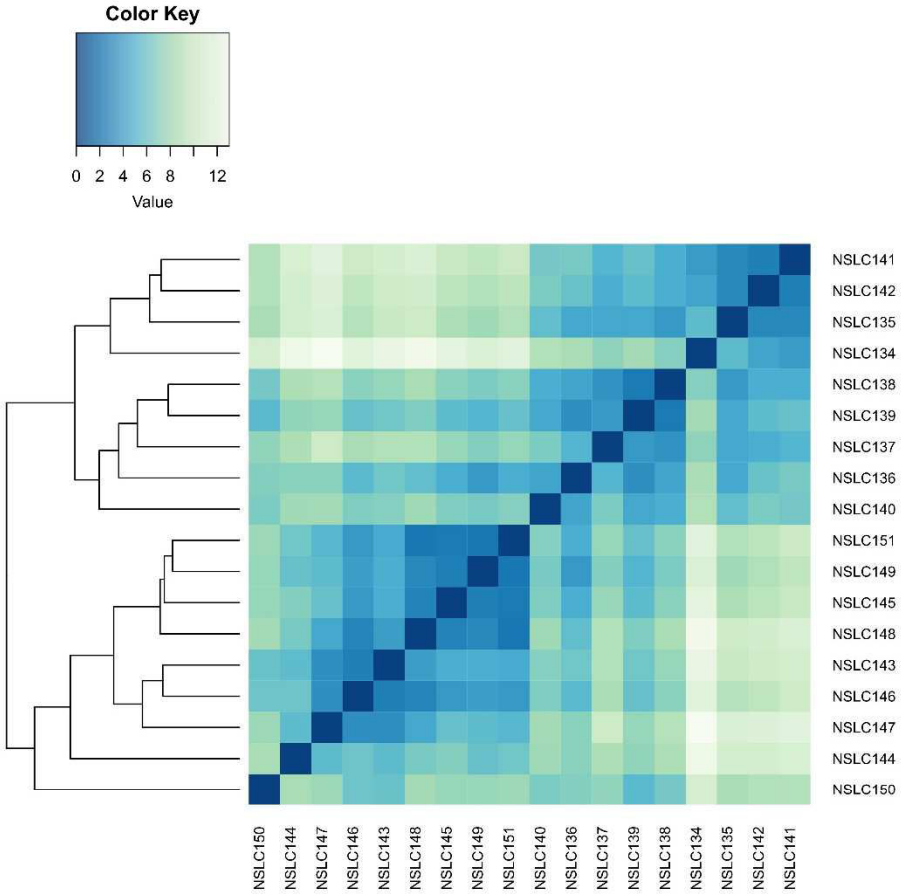


Figure 5: **Sample-to-sample distances.** Hierarchical clustering was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

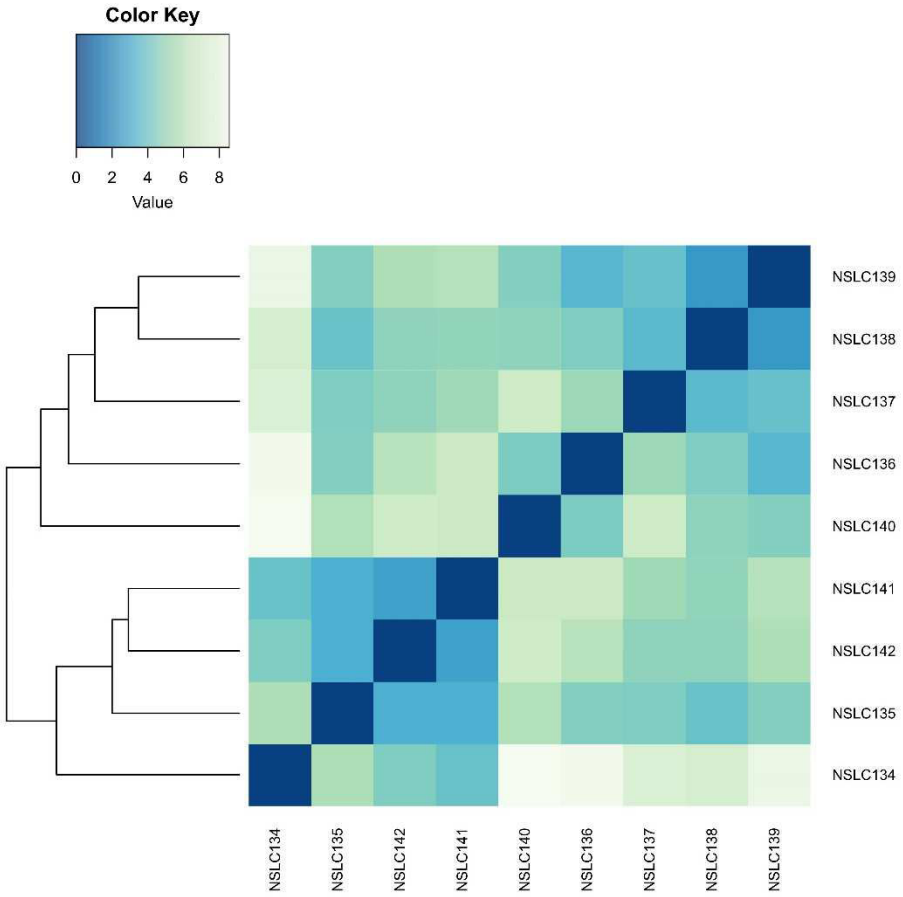


Figure 6: **Sample-to-sample distances for the samples corresponding to J0 group.**

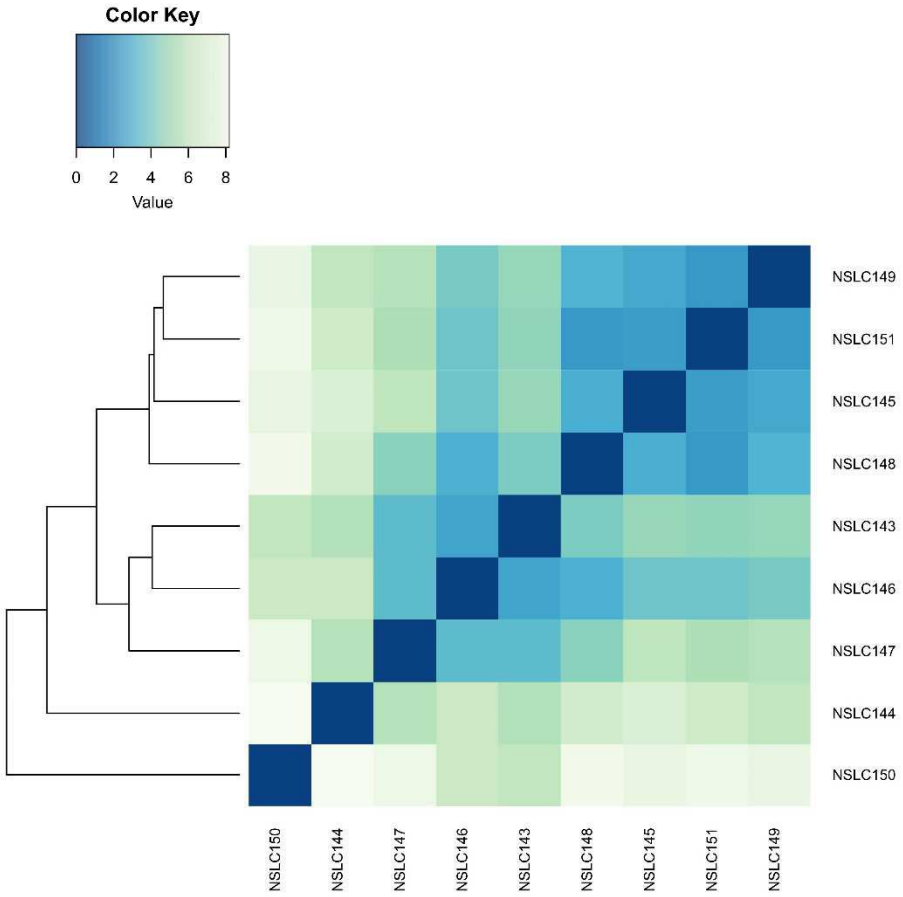


Figure 7: **Sample-to-sample distances for the samples corresponding to J3 group.**

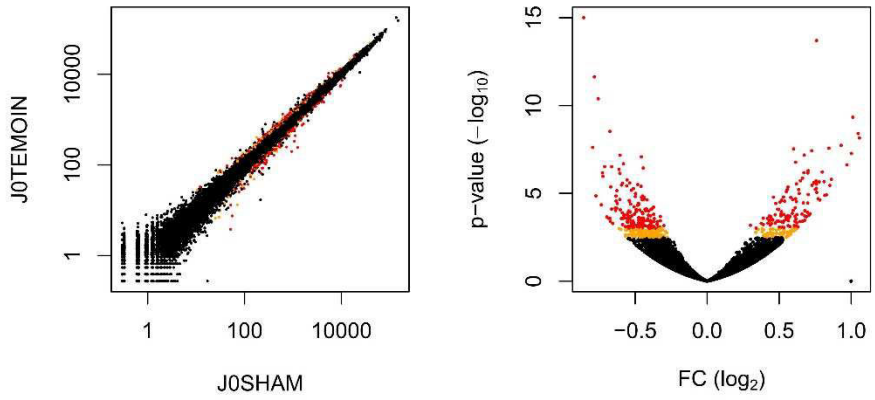


Figure 8: **J0SHAM vs J0TEMOIN : Statistical results.** The graph on the left represents a scatterplot of the normalized gene expression. For a given gene, its value is obtained by mean on all samples belonging to the same condition. The graph on the right represents a volcano plot. The x-axis represents the $\log_2$ Fold Change values and the y-axis the p-values (in $-\log_{10}$). Red points show values with an adjusted p-value < 0.05 and orange points show values with an adjusted p-value < 0.1.

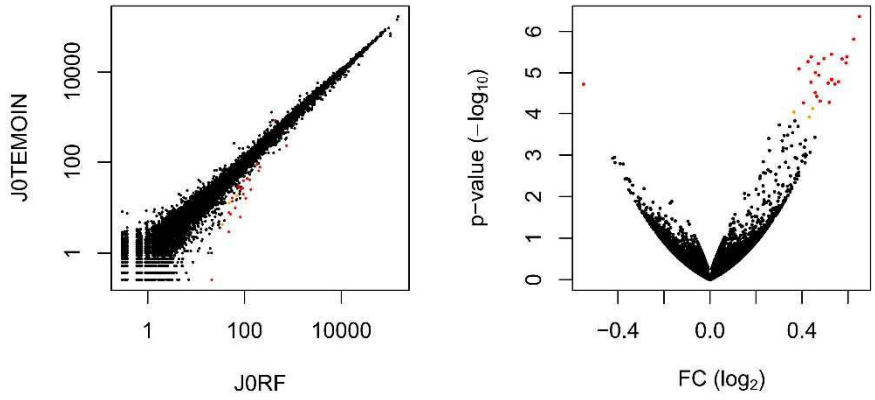


Figure 9: **J0RF vs J0TEMOIN : Statistical results.**

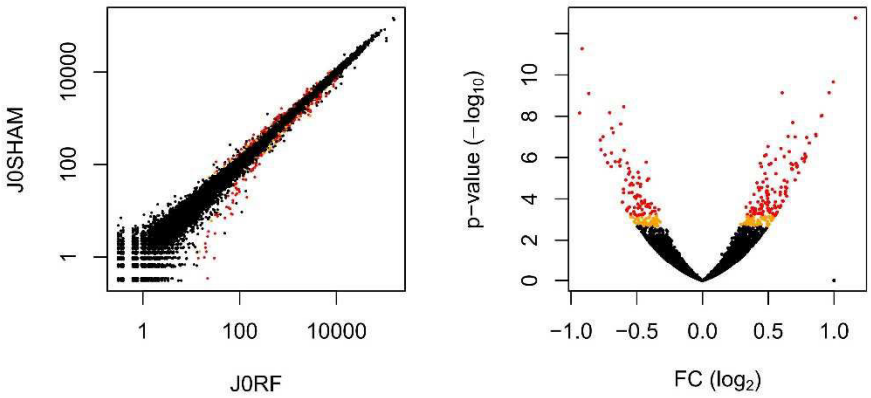


Figure 10: **J0RF vs J0SHAM : Statistical results.**

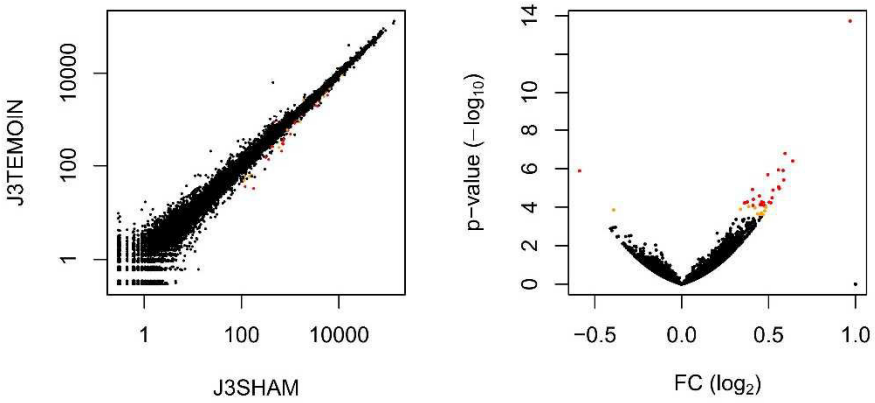


Figure 11: **J3SHAM vs J3TEMOIN : Statistical results.**

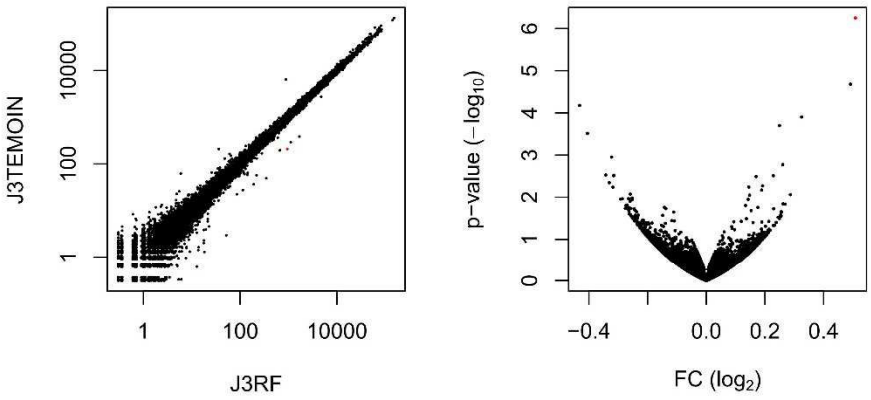


Figure 12: **J3RF vs J3TEMOIN : Statistical results.**

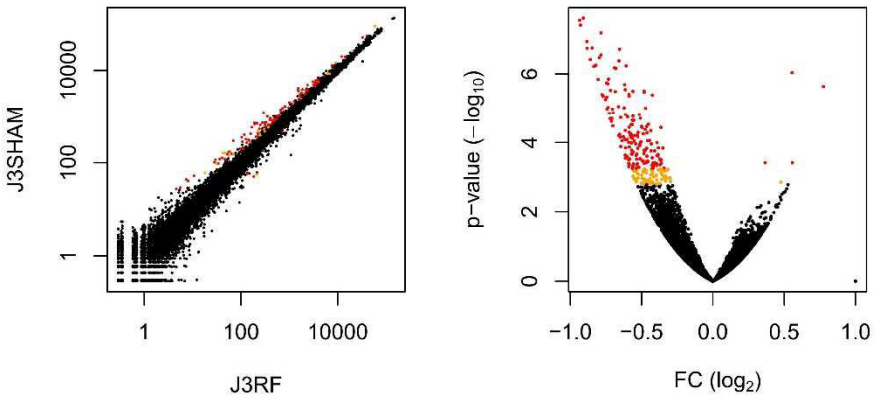


Figure 13: **J3RF vs J3SHAM : Statistical results.**

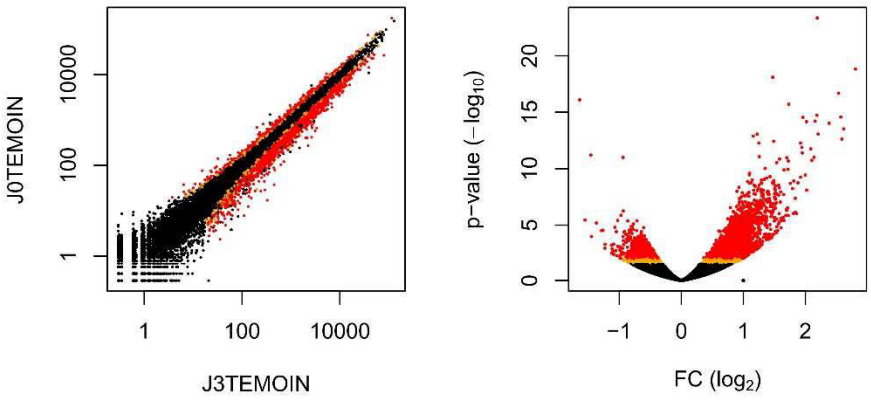


Figure 14: **J3TEMOIN vs J0TEMOIN : Statistical results.**

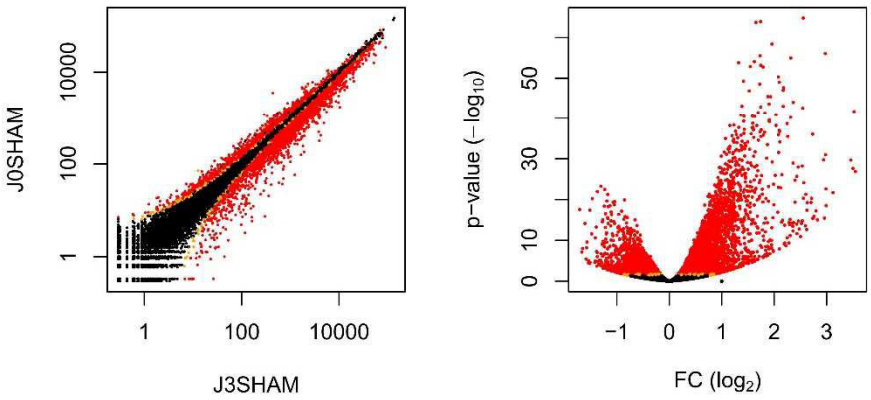


Figure 15: **J3SHAM vs J0SHAM : Statistical results.**

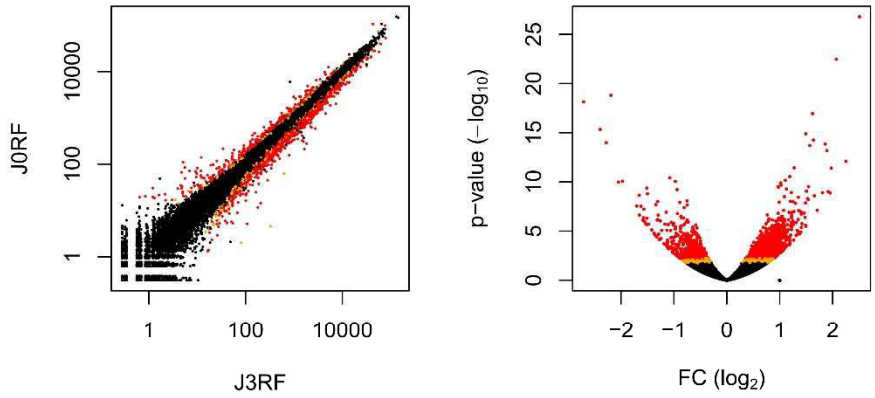


Figure 16: **J3RF vs J0RF : Statistical results.**

Chromosome name The name of the chromosome where the gene is.

Start position The start coordinate of the gene.

End position The end coordinate of the gene.

Gene biotype The biotype of the gene as defined by Ensembl.

GO:biological process The Gene Ontology terms associated to the biological process domain. A biological process term describes a series of events accomplished by one or more organized assemblies of molecular functions. A biological process is not equivalent to a pathway.

GO:molecular function The Gene Ontology terms associated to the molecular function domain. Molecular function terms describes activities that occur at the molecular level. They represent activities rather than the entities that perform the actions, and do not specify where, when, or in what context the action takes place.

GO:cellular component The Gene Ontology terms associated to the cellular component domain. These terms describe a component of a cell that is part of a larger object, such as an anatomical structure or a gene product group.

log2 The estimation of the fold change value (in log_2) indicating how much the differential expression of a gene is important between two conditions. The higher the absolute value is, the more differential the expression level is.

P-value The p-value associated to the fold change. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

Adjusted p-value The corrected p-value associated to the fold change when the multiple testing has been taken into account. This value is never lower than the p-value. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

8 Version of used packages

```
## R version 3.2.5 (2016-04-14)
## Platform: x86_64-pc-linux-gnu (64-bit)
## Running under: Scientific Linux release 6.6 (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] grid      parallel  stats4    stats     graphics  grDevices utils
##  [8] datasets  methods   base
##
## other attached packages:
##  [1] vsn_3.38.0                  scales_0.4.1
##  [3] VennDiagram_1.6.17          futile.logger_1.4.3
##  [5] gplots_3.0.1                ggrepel_0.6.5
##  [7] RColorBrewer_1.1-2          RUVSeq_1.4.0
##  [9] edgeR_3.12.1                limma_3.26.9
## [11] EDASeq_2.4.1                ShortRead_1.28.0
## [13] GenomicAlignments_1.6.3     Rsamtools_1.22.0
## [15] Biostrings_2.38.4           XVector_0.10.0
## [17] BiocParallel_1.4.3          DESeq2_1.10.1
## [19] RcppArmadillo_0.7.500.0.0   Rcpp_0.12.8
## [21] SummarizedExperiment_1.0.2 Biobase_2.30.0
## [23] GenomicRanges_1.22.4        GenomeInfoDb_1.6.3
## [25] IRanges_2.4.8               S4Vectors_0.8.11
## [27] BiocGenerics_0.16.1         cowplot_0.6.3
## [29] ggplot2_2.1.0               knitr_1.15.1
##
## loaded via a namespace (and not attached):
##  [1] splines_3.2.5           R.utils_2.5.0
##  [3] gtools_3.5.0            Formula_1.2-1
##  [5] affy_1.48.0             aroma.light_3.0.0
##  [7] latticeExtra_0.6-28     RSQLite_1.1
##  [9] lattice_0.20-33         digest_0.6.10
## [11] colorspace_1.3-1        preprocessCore_1.32.0
## [13] htmltools_0.3.5         Matrix_1.2-4
## [15] R.oo_1.21.0             plyr_1.8.4
## [17] XML_3.98-1.5            biomaRt_2.26.1
## [19] genefilter_1.52.1       zlibbioc_1.16.0
## [21] xtable_1.8-2            gdata_2.17.0
## [23] affyio_1.40.0           htmlTable_1.7
## [25] annotate_1.48.0         GenomicFeatures_1.22.13
## [27] nnet_7.3-12             survival_2.40-1
## [29] magrittr_1.5            memoise_1.0.0
```

```
## [31] evaluate_0.10           R.methodsS3_1.7.1
## [33] MASS_7.3-45             hwriter_1.3.2
## [35] foreign_0.8-66          BiocInstaller_1.20.3
## [37] tools_3.2.5             data.table_1.10.0
## [39] matrixStats_0.51.0      stringr_1.1.0
## [41] munsell_0.4.3           locfit_1.5-9.1
## [43] cluster_2.0.5           AnnotationDbi_1.32.3
## [45] lambda.r_1.1.9          DESeq_1.22.1
## [47] caTools_1.17.1          RCurl_1.95-4.8
## [49] labeling_0.3            bitops_1.0-6
## [51] tcltk_3.2.5             gtable_0.2.0
## [53] DBI_0.5-1               gridExtra_2.2.1
## [55] rtracklayer_1.30.4      Hmisc_4.0-0
## [57] futile.options_1.0.0    KernSmooth_2.23-15
## [59] stringi_1.1.2           geneplotter_1.48.0
## [61] rpart_4.1-10            acepack_1.4.1
```

References

[1] Trapnell C, Pachter L, Salzberg L. *Tophat: discovering splice junctions with rna-seq*. Bioinformatics, 25:1105-1111, 2009.

[2] Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions*. Genome Biology, 14:R36, 2013.

[3] Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biology, 10:R25, 2009.

[4] `http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html`

[5] Anders S, Huber W. *Differential expression analysis for sequence count data*. Genome Biology, 11:R106, 2010.

[6] Love M, Huber W, Anders S. *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biology, 15:550, 2014.

[7] Benjamini Y, Hochberg Y. *Controlling the false discovery rate: a pratical and powerful approach to multiple testing*. Journaa of the Royal Statistical Society, 57:289-300, 1995.

Annexe 11 : Rapport pour le RNA-seq du CPFm (long terme)

Differential expression analysis of S17356 project

Damien Plassard

March 27, 2018

Contents

1 Details about the samples **1**

2 Mapping **1**

3 Quantification **2**

4 Normalization of the data **2**

5 Clustering analysis **4**
5.1 Variance stabilization 4
5.2 Principal Component Analysis and Heatmap 4

6 Statistical analysis **4**

7 Venn diagrams **15**

8 Delivery files **15**

9 Version of used packages **18**

1 Details about the samples

All samples were sequenced on the flow cell HS436 in 50-length Single-Read. A summary of the main characteristics of the input data analyzed in this document is available in Table 1.

Input data used in this document correspond to the fastq files where rRNA reads were removed.

2 Mapping

Reads were mapped onto the rn6 assembly of the *Rattus norvegicus* genome using Tophat 2.0.14 [1, 2] and bowtie version 2-2.1.0 [3]. A summary of the mapping results is avaiblable in Table 2.

Only uniquely mapped reads have been retained for further analyses.

Table 1: **Main characteristics of the analyzed input data.** The field "Nb total reads" indicates the total number of reads in the input fastq files; the field "Nb unique reads" indicates the number of unique reads (without duplicates); and the field "%" corresponds to the percentage of the ratio "Nb unique reads"/"Nb total reads".

Sample ID	Sample name	Nb total reads	Nb unique reads	%
NSLC156	6_J0-TEMCx_pers_1	45,245,962	14,348,386	31.71
NSLC157	7_J0-TEMCx_pers_2	36,538,803	10,329,598	28.27
NSLC158	23_J0-TEMCx_pers_3	26,661,918	9,581,185	35.94
NSLC159	2_J0-SHCx_pers_4	41,862,828	13,176,013	31.47
NSLC160	18_J0-SHCx_pers_5	48,208,537	14,340,143	29.75
NSLC161	19_J0-SHCx_pers_6	40,206,226	12,725,675	31.65
NSLC162	3_J0-RFCx_pers_7	36,994,676	11,907,505	32.19
NSLC163	4_J0-RFCx_pers_8	41,185,186	12,181,859	29.58
NSLC164	21_J0-RFCx_pers_9	37,566,964	12,396,630	33.00
NSLC165	15_J25-TEMCx_pers_10	41,561,142	12,673,325	30.49
NSLC166	30_J25-TEMCx_pers_11	50,777,638	15,126,904	29.79
NSLC167	31_J25-TEMCx_pers_12	50,968,541	14,394,919	28.24
NSLC168	9_J25-SHCx_pers_13	45,920,198	14,207,336	30.94
NSLC169	10_J25-SHCx_pers_14	46,406,565	14,039,196	30.25
NSLC170	11_J25-SHCx_pers_15	38,521,386	11,302,793	29.34
NSLC171	14_J25-RFCx_pers_16	46,231,846	12,678,849	27.42
NSLC172	25_J25-RFCx_pers_17	47,001,742	14,482,687	30.81
NSLC173	27_J25-RFCx_pers_18	36,849,226	11,258,735	30.55

Table 2: **Summary of mapping results.** The field "Nb total reads" indicates the total number of reads in the input fastq files; the field "Nb aligned reads" indicates the number of mapped reads; the field "Nb uniquely mapped" indicates the number of reads uniqueley mapped; and the fields "$\%_1$" and "$\%_2$" are the percentage of the ratios "Nb aligned reads" and "Nb uniquely mapped" divided by "Nb aligned reads" respectively.

Sample ID	Sample name	Nb total reads	Nb aligned reads	$\%_1$	Nb uniquely mapped	$\%_2$
NSLC156	6_J0-TEMCx_pers_1	45,245,962	44,288,099	97.88	40,496,124	91.44
NSLC157	7_J0-TEMCx_pers_2	36,538,803	35,293,768	96.59	32,160,504	91.12
NSLC158	23_J0-TEMCx_pers_3	26,661,918	26,019,783	97.59	23,967,339	92.11
NSLC159	2_J0-SHCx_pers_4	41,862,828	40,613,225	97.02	37,310,909	91.87
NSLC160	18_J0-SHCx_pers_5	48,208,537	47,150,643	97.81	43,304,425	91.84
NSLC161	19_J0-SHCx_pers_6	40,206,226	38,888,504	96.72	35,829,171	92.13
NSLC162	3_J0-RFCx_pers_7	36,994,676	36,273,469	98.05	33,314,141	91.84
NSLC163	4_J0-RFCx_pers_8	41,185,186	40,321,770	97.90	37,119,648	92.06
NSLC164	21_J0-RFCx_pers_9	37,566,964	36,795,790	97.95	34,015,911	92.45
NSLC165	15_J25-TEMCx_pers_10	41,561,142	40,683,760	97.89	37,580,773	92.37
NSLC166	30_J25-TEMCx_pers_11	50,777,638	49,811,641	98.10	45,905,117	92.16
NSLC167	31_J25-TEMCx_pers_12	50,968,541	49,835,840	97.78	45,899,090	92.10
NSLC168	9_J25-SHCx_pers_13	45,920,198	45,052,266	98.11	41,372,191	91.83
NSLC169	10_J25-SHCx_pers_14	46,406,565	45,454,016	97.95	41,833,606	92.04
NSLC170	11_J25-SHCx_pers_15	38,521,386	37,698,093	97.86	34,566,118	91.69
NSLC171	14_J25-RFCx_pers_16	46,231,846	45,313,079	98.01	41,623,414	91.86
NSLC172	25_J25-RFCx_pers_17	47,001,742	46,040,924	97.96	41,156,409	89.39
NSLC173	27_J25-RFCx_pers_18	36,849,226	36,085,702	97.93	32,913,012	91.21

3 Quantification

Quantification of gene expression has been performed using HTSeq-0.6.1 [4] with annotations coming from Ensembl 86. Table 3 shows summary about the assignment of the gene name to

each read.

Only no-ambiguously assigned reads have been retained for further analyses.

Table 3: **Summary of quantification results.** The field "Nb uniquely mapped" indicates the number of reads uniqueley mapped; the field "Nb assigned reads" indicates the number of reads that could have been assigned to a gene; the field "Nb no-assigned" indicates the number of reads that could not be assigned to a gene; the field "Nb ambigous assigned" indicates the number of reads that can be asigned to more than one gene; and the fields "$\%_1$", "$\%_2$", and "$\%_3$" are the percentage of the ratios "Nb assigned reads", "Nb no-assigned", and "Nb ambigous assigned" divideb by "Nb uniquely mapped" respectively.

Sample ID	Sample name	Nb uniquely mapped	Nb assigned reads	$\%_1$	Nb no-assigned	$\%_2$	Nb ambigous assigned	$\%_3$
NSLC156	6_J0-TEMCx_pers_1	40,496,124	26,227,518	64.77	14,199,319	35.06	69,287	0.17
NSLC157	7_J0-TEMCx_pers_2	32,160,504	21,725,665	67.55	10,369,982	32.24	64,857	0.20
NSLC158	23_J0-TEMCx_pers_3	23,967,339	15,735,260	65.65	8,190,539	34.17	41,540	0.17
NSLC159	2_J0-SHCx_pers_4	37,310,909	24,297,840	65.12	12,949,512	34.71	63,557	0.17
NSLC160	18_J0-SHCx_pers_5	43,304,425	28,656,149	66.17	14,571,897	33.65	76,379	0.18
NSLC161	19_J0-SHCx_pers_6	35,829,171	24,472,743	68.30	11,288,204	31.51	68,224	0.19
NSLC162	3_J0-RFCx_pers_7	33,314,141	22,333,336	67.04	10,921,111	32.78	59,694	0.18
NSLC163	4_J0-RFCx_pers_8	37,119,648	23,968,030	64.57	13,089,025	35.26	62,593	0.17
NSLC164	21_J0-RFCx_pers_9	34,015,911	23,214,479	68.25	10,738,495	31.57	62,937	0.19
NSLC165	15_J25-TEMCx_pers_10	37,580,773	25,157,749	66.94	12,357,334	32.88	65,690	0.17
NSLC166	30_J25-TEMCx_pers_11	45,905,117	30,334,289	66.08	15,494,530	33.75	76,298	0.17
NSLC167	31_J25-TEMCx_pers_12	45,899,090	29,574,360	64.43	16,241,225	35.38	83,505	0.18
NSLC168	9_J25-SHCx_pers_13	41,372,191	28,115,668	67.96	13,180,614	31.86	75,909	0.18
NSLC169	10_J25-SHCx_pers_14	41,833,606	27,953,595	66.82	13,804,385	33.00	75,626	0.18
NSLC170	11_J25-SHCx_pers_15	34,566,118	22,965,998	66.44	11,528,614	33.35	71,506	0.21
NSLC171	14_J25-RFCx_pers_16	41,623,414	25,971,965	62.40	15,579,073	37.43	72,376	0.17
NSLC172	25_J25-RFCx_pers_17	41,156,409	25,567,972	62.12	15,523,901	37.72	64,536	0.16
NSLC173	27_J25-RFCx_pers_18	32,913,012	21,436,585	65.13	11,414,196	34.68	62,231	0.19

4 Normalization of the data

Read counts have then been normalized across libraries with the median-of-ratios method proposed by Anders and Huber [5].

To check if the normalization was correctly performed, Relative Log Expression (RLE) plots were drawn (Figure 1). This kind of plot is a useful diagnostic plot to visualize the differences between the distributions of read counts across samples. It shows the boxplots of the log-ratios of the gene-level read counts of each sample to those of a reference sample (defined as the median across the samples). Ideally, the distributions should be centered around the zero line and as tight as possible. Clear deviations indicate the need for normalization and/or the presence of outlying samples.

5 Clustering analysis

5.1 Variance stabilization

In RNA-Seq data, genes with larger average expression have on average larger observed variances across samples, that is, they vary in expression from sample to sample more than other genes with lower average expression.

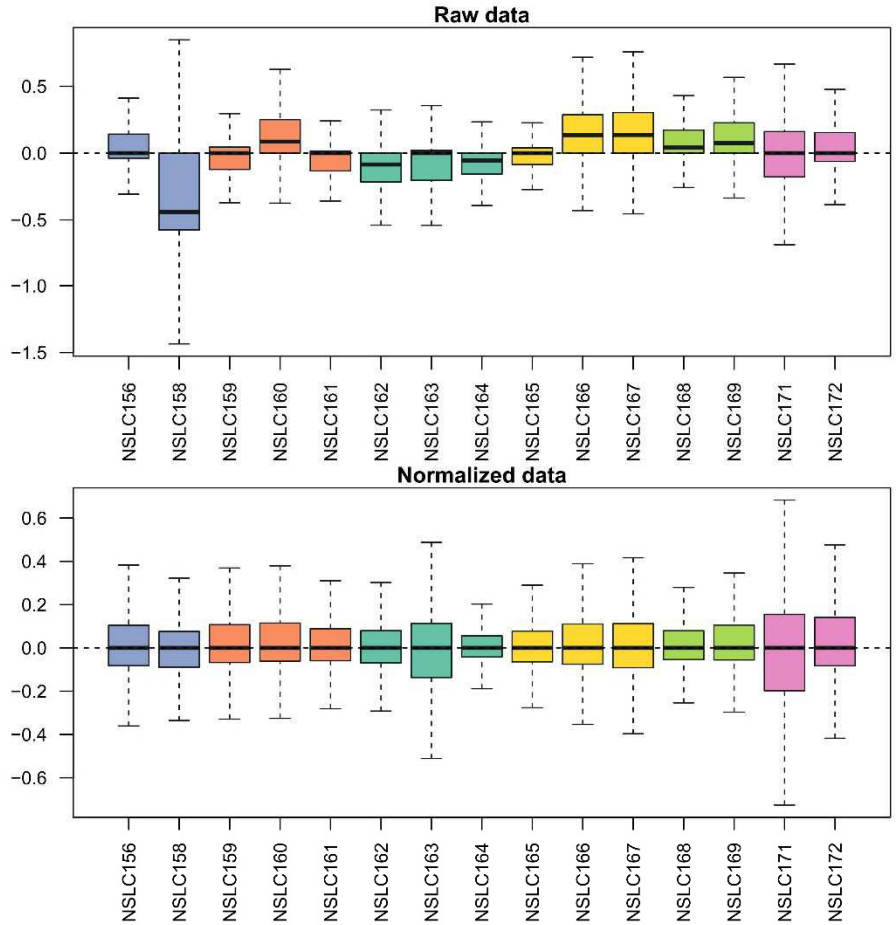


Figure 1: **Relative Log Expression of raw and normalized data.** The x-axis represents the samples that will be analyzed and the y-axis the relative log expression (RLE) values. The top graph represents the RLE values of the raw data set and the bottom graph the RLE values of the normalized data set. Each experimental condition is represented by a different color.

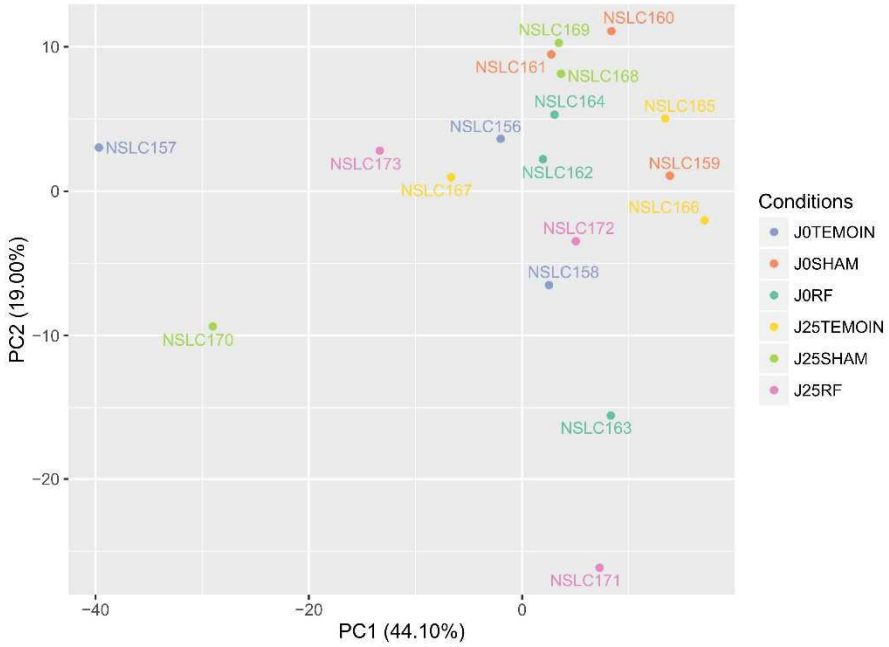


Figure 2: **General principal component analysis.** This PCA contains all of the samples. Each condition is represented by a different color.

The Principal Component Analysis (PCA) method uses the variance to explain the data and may be overly influenced by these genes. To avoid that, variance should be stabilized.

5.2 Principal Component Analysis and Heatmap

Figure 2 and Figure 3 provide a Principal Component Analysis (PCA) based on their normalized and stabilized gene expression level of all samples. Thereafter, NSLC157, NSLC170 and NSLC173 have been removed from the analysis because these samples behave differently of the other of their group and have a RIN lower or equal than 8.

Figure 4, figure 5 and figure 6 represent another samples clustering visualization.

6 Statistical analysis

Comparisons of interest have been performed using the statistical method proposed by Anders and Huber [6]. The Wald test was used to estimate the p-values and they were adjusted for multiple testing with the Benjamini and Hochberg method [7].

A summary of the differentially expressed genes, for each comparison, is available in Table 4. The analysis has been carried out without NSCL157, NSCL170 and NSCL173. A specific design has been used to perform these comparisons (a design comprising only the samples to be compared).

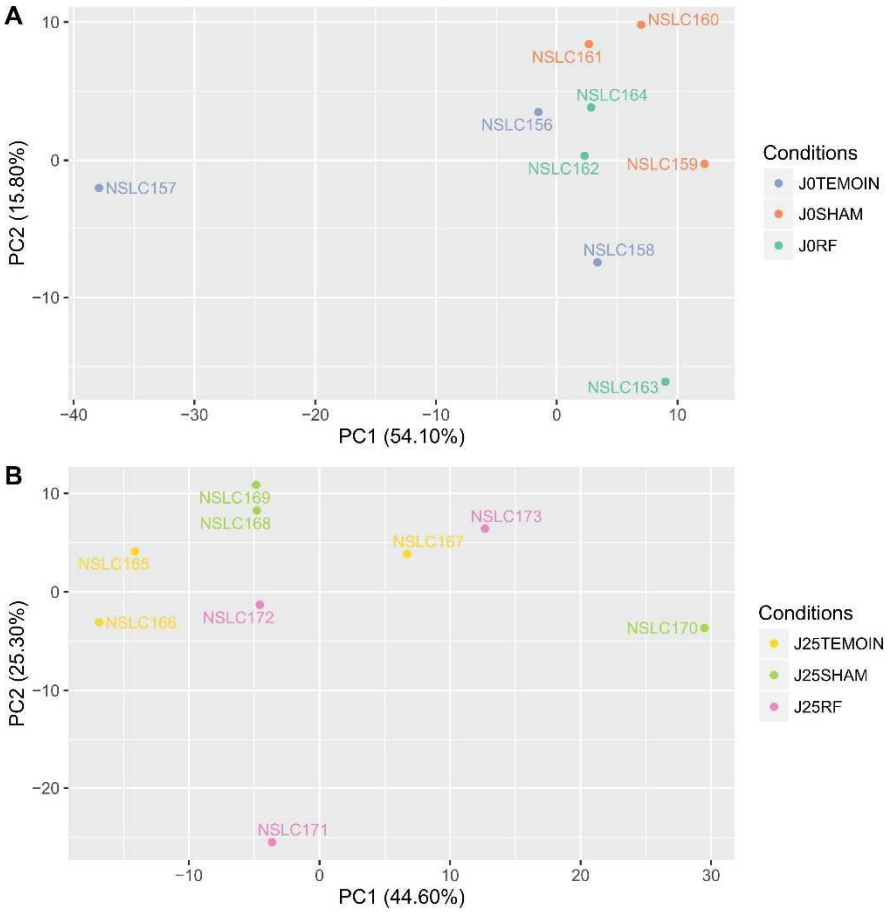


Figure 3: **Principal component analysis for each condition.**

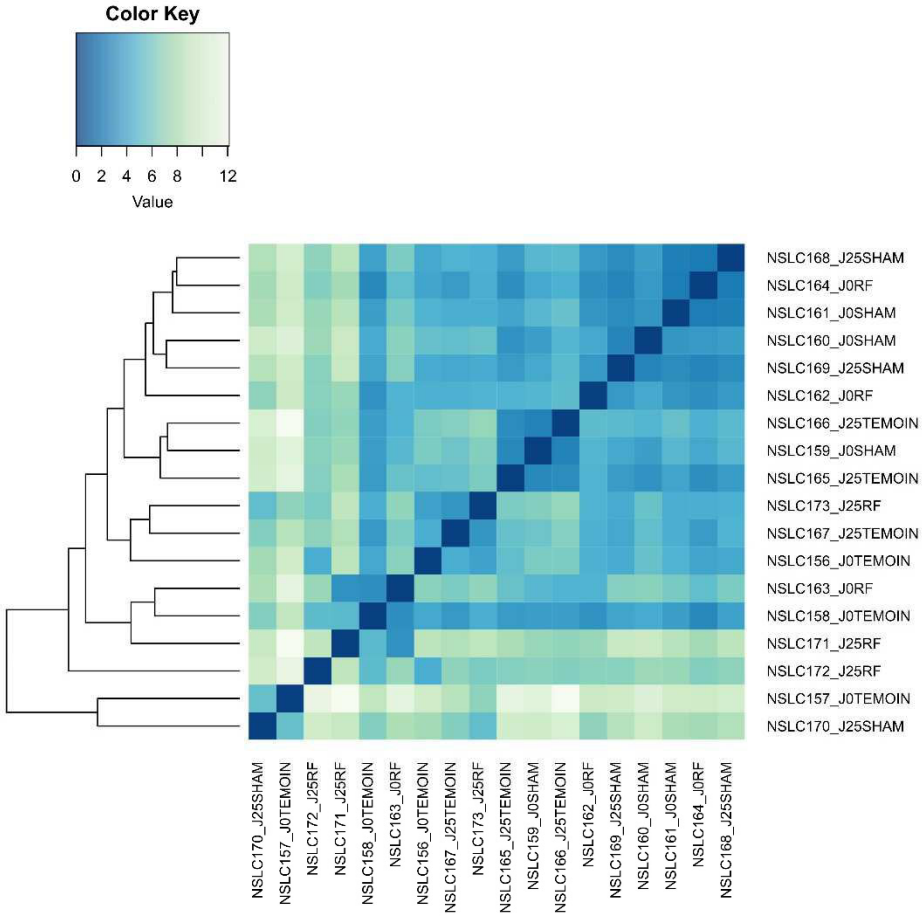


Figure 4: **Sample-to-sample distances.** Hierarchical clustering was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

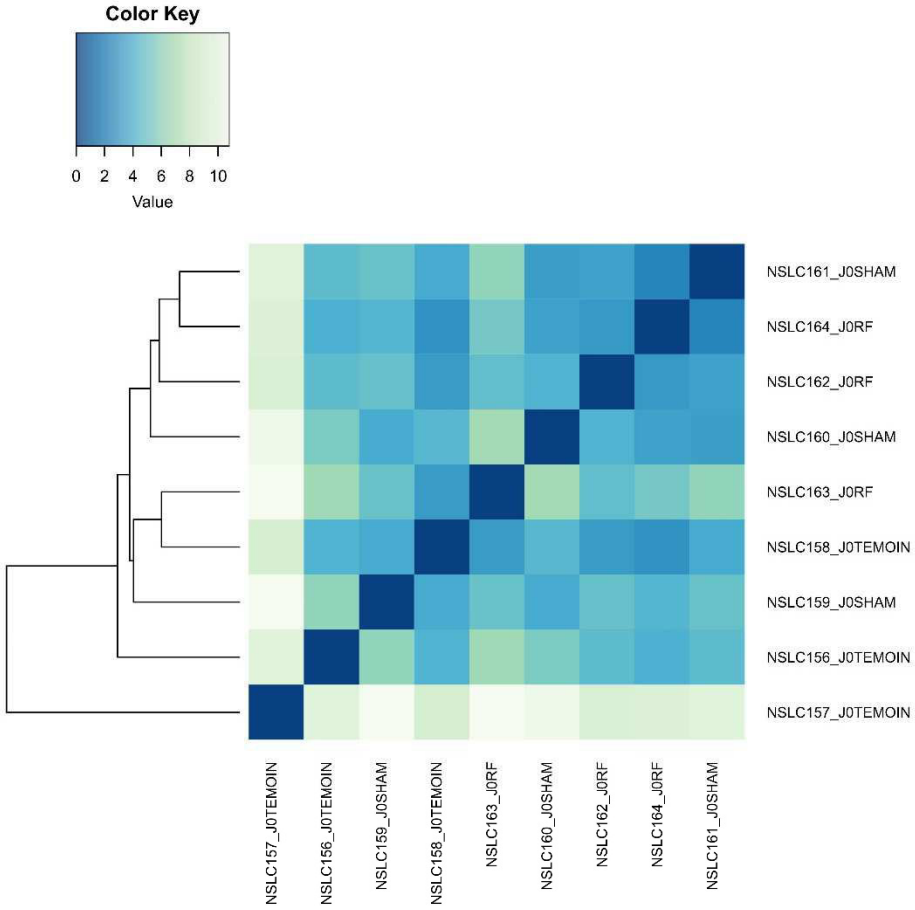


Figure 5: **Sample-to-sample distances for J0 group.** Hierarchical clustering was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

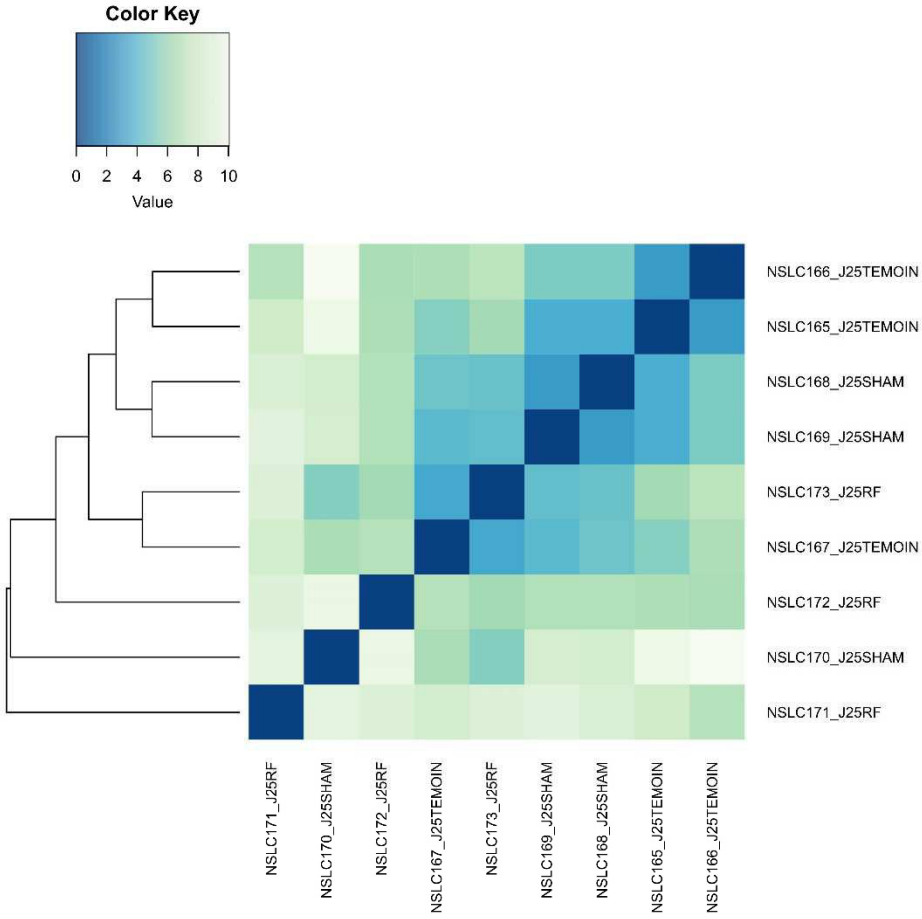


Figure 6: **Sample-to-sample distances for J25 group.** Hierarchical clustering was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

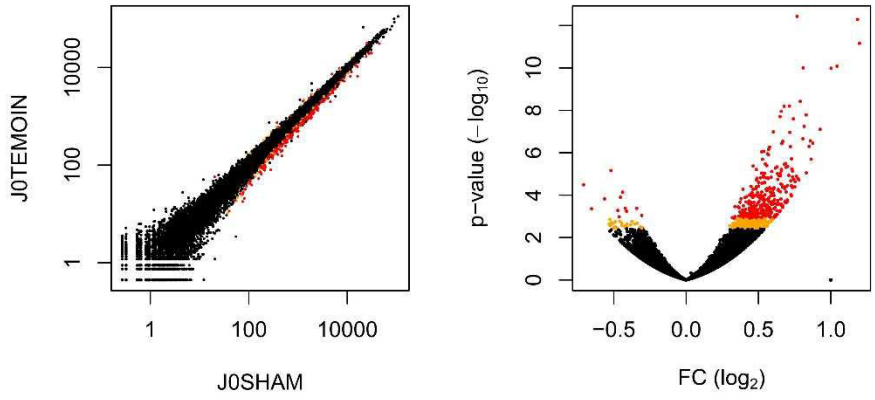


Figure 7: **J0SHAM vs J0TEMOIN: Statistical results.** The graph on the left represents a scatterplot of the normalized gene expression. For a given gene, its value is obtained by mean on all samples belonging to the same condition. The graph on the right represents a volcano plot. The x-axis represents the $\log_2$ Fold Change values and the y-axis the p-values (in $-\log_{10}$). Red points show values with an adjusted p-value < 0.05 and orange points show values with an adjusted p-value < 0.1.

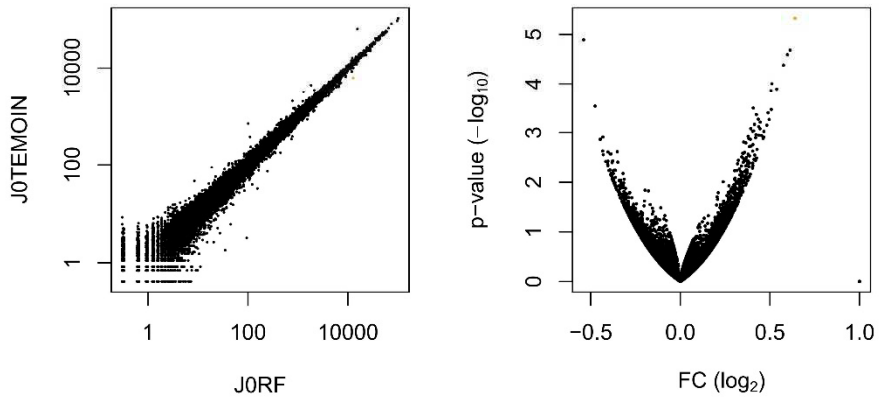


Figure 8: **J0RF vs J0TEMOIN: Statistical results.**

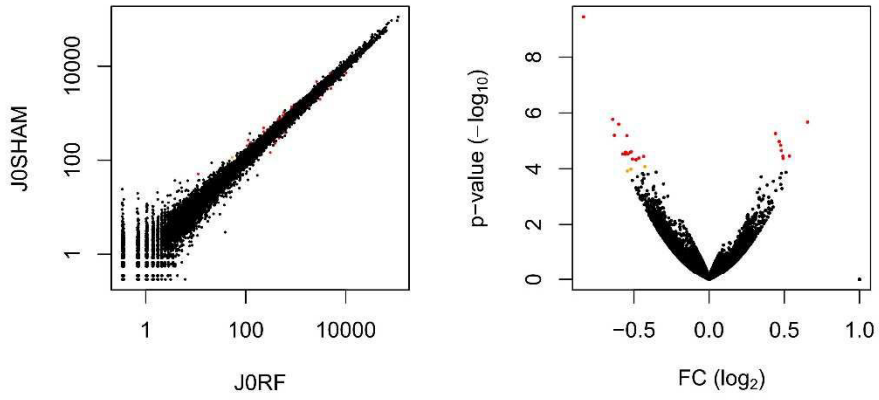


Figure 9: **J0RF vs J0SHAM: Statistical results.**

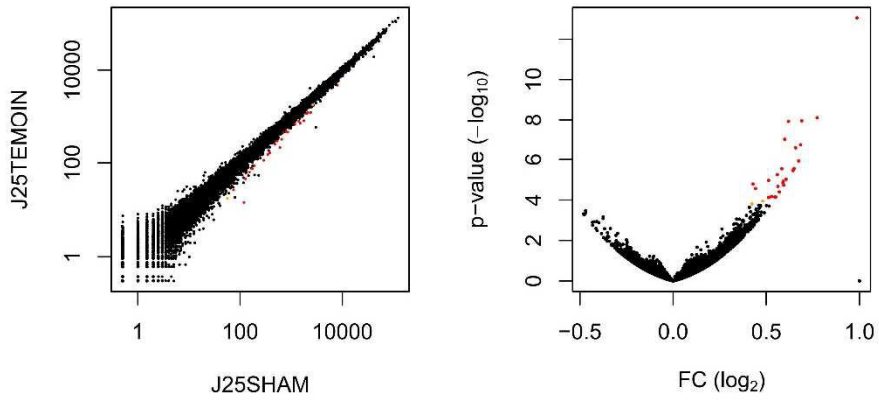


Figure 10: **J25SHAM vs J25TEMOIN: Statistical results.**

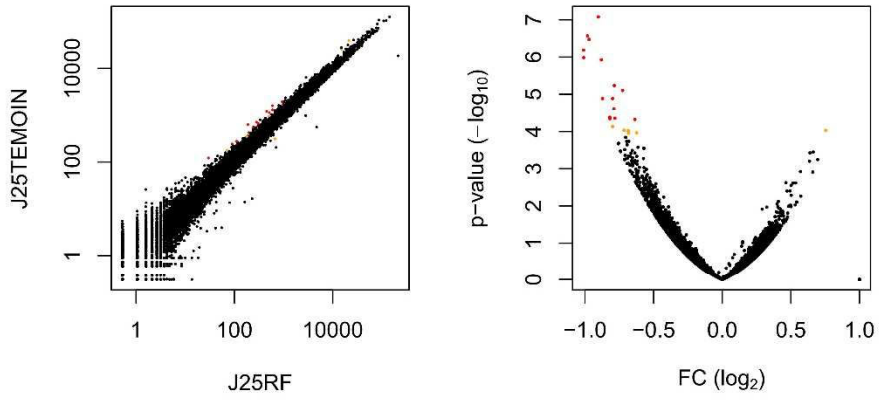


Figure 11: **J25RF vs J25TEMOIN: Statistical results.**

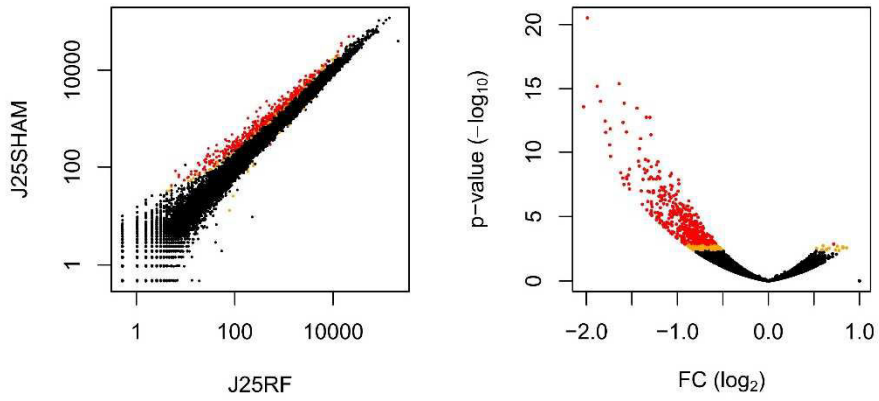


Figure 12: **J25RF vs J25SHAM: Statistical results.**

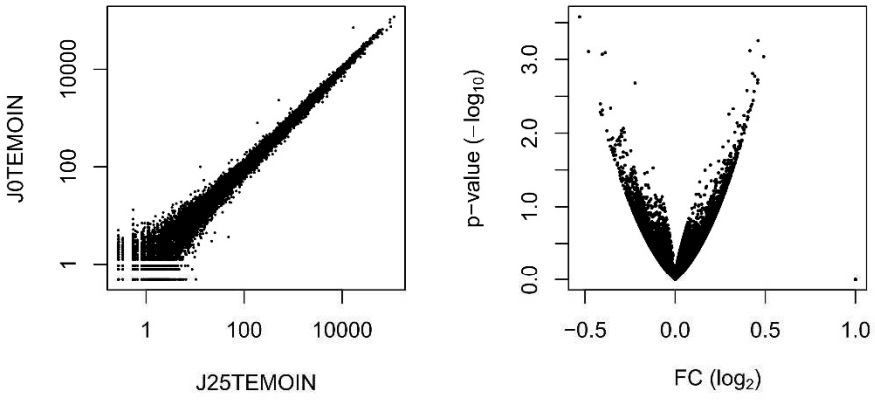


Figure 13: **J25TEMOIN vs J0TEMOIN: Statistical results.**

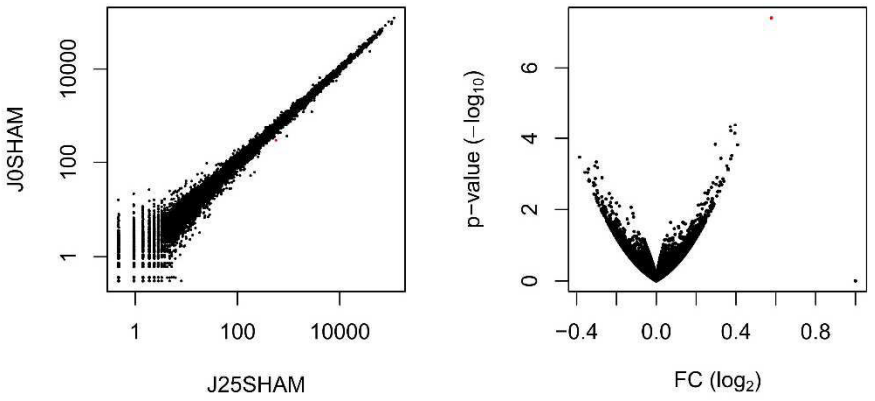


Figure 14: **J25SHAM vs J0SHAM: Statistical results.**

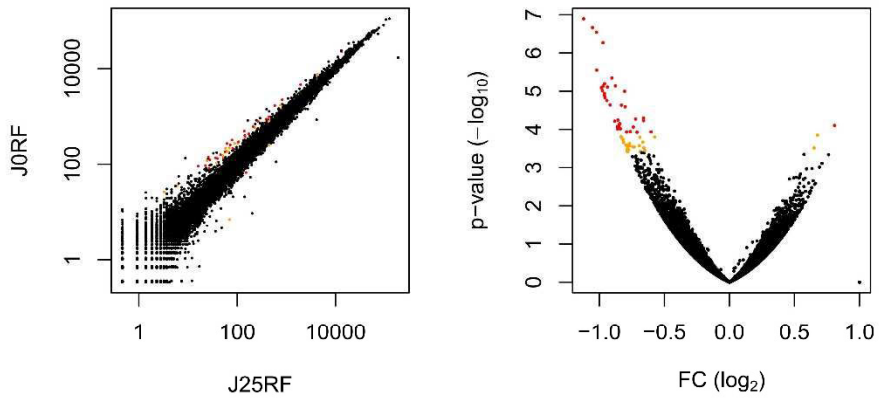


Figure 15: **J25RF vs J0RF: Statistical results.**

Table 4: **Summary of the comparison results.** These genes correspond to genes with p-value adjusted for multiple testing < 0.05.

Comparison	Number of over-expressed genes	Number of under-expressed genes	Total
J0SHAM vs J0TEMOIN	322	12	334
J0RF vs J0TEMOIN	0	0	0
J0RF vs J0SHAM	8	15	23
J25SHAM vs J25TEMOIN	26	0	26
J25RF vs J25TEMOIN	0	15	15
J25RF vs J25SHAM	1	443	444
J25TEMOIN vs J0TEMOIN	0	0	0
J25SHAM vs J0SHAM	1	0	1
J25RF vs J0RF	1	36	37

7 Venn diagrams

These Venn diagrams compare the significant genes in common for the same comparison between the two projects. Only comparisons where at least one gene is in common are represented.

8 Delivery files

Alignment files

An alignment file, in bam format, is avaible for each sample, with its index file (bai format). These files can be viewed in any genome browser, like IGV [1] (Integrative Genomics Viewer).

[1] `http://software.broadinstitute.org/software/igv/`

Excel file

An excel file provides raw read counts and normalized read counts for each gene together with the p-value and log2 fold-change for the requested comparisons. Genes with a null raw read count for each sample were removed. Below is a description of each column:

Ensembl gene id The Ensembl ID of the gene.

Raw read counts The quantity of reads that have been mapped to the gene.

Normalized The normalized read counts. You can use these values to compare expression between samples.

Normalized and divided by gene length in kb The normalized read counts that have been divided by the gene length. The gene length has been estimated as the median of all transcripts. You can used these counts to compare expression between genes of a sample.

Gene name The common gene name.

Description The description of the gene.

Chromosome name The name of the chromosome where the gene is.

Start position The start coordinate of the gene.

End position The end coordinate of the gene.

Gene biotype The biotype of the gene as defined by Ensembl.

GO:biological process The Gene Ontology terms associated to the biological process domain. A biological process term describes a series of events accomplished by one or more organized assemblies of molecular functions. A biological process is not equivalent to a pathway.

GO:molecular function The Gene Ontology terms associated to the molecular function domain. Molecular function terms describes activities that occur at the molecular level. They represent activities rather than the entities that perform the actions, and do not specify where, when, or in what context the action takes place.

GO:cellular component The Gene Ontology terms associated to the cellular component domain. These terms describe a component of a cell that is part of a larger object, such as an anatomical structure or a gene product group.

log2 The estimation of the fold change value (in log_2) indicating how much the differential expression of a gene is important between two conditions. The higher the absolute value is, the more differential the expression level is.

P-value The p-value associated to the fold change. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

Adjusted p-value The corrected p-value associated to the fold change when the multiple testing has been taken into account. This value is never lower than the p-value. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

9 Version of used packages

References

[1] Trapnell C, Pachter L, Salzberg L. *Tophat: discovering splice junctions with rna-seq.* Bioinformatics, 25:1105-1111, 2009.

[2] Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.* Genome Biology, 14:R36, 2013.

[3] Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome.* Genome Biology, 10:R25, 2009.

[4] `http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html`

[5] Anders S, Huber W. *Differential expression analysis for sequence count data.* Genome Biology, 11:R106, 2010.

[6] Love M, Huber W, Anders S. *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.* Genome Biology, 15:550, 2014.

[7] Benjamini Y, Hochberg Y. *Controlling the false discovery rate: a pratical and powerful approach to multiple testing.* Journaa of the Royal Statistical Society, 57:289-300, 1995.

Références bibliographiques

Aboitiz, Francisco, Daniver Morales, et Juan Montiel. 2003. The Evolutionary Origin of the Mammalian Isocortex: Towards an Integrated Developmental and Functional Approach. *Behavioral and Brain Sciences* 26 (05).

Adamsky, Adar, et Inbal Goshen. 2018. Astrocytes in Memory Function: Pioneering Findings and Future Directions. *Neuroscience* 370 (février): 14-26.

Akbarnejad, Zeinab, Khadijeh Esmaeilpour, Mohammad Shabani, Majid Asadi-Shekaari, Monavvar Saeedi Goraghani, et Meysam Ahmadi-Zeidabadi. 2018. Spatial Memory Recovery in Alzheimer's Rat Model by Electromagnetic Field Exposure. *The International Journal of Neuroscience* 128 (8): 691-96.

Alberini, C. M. 2009. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiological Reviews* 89 (1): 121-45.

Alberini, Cristina M., Emmanuel Cruz, Giannina Descalzi, Benjamin Bessières, et Virginia Gao. 2018. Astrocyte Glycogen and Lactate: New Insights into Learning and Memory Mechanisms. *Glia* 66 (6): 1244-62.

Alberini, Cristina M., et Eric R. Kandel. 2015. The Regulation of Transcription in Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (1): a021741.

Aldad, Tamir S., Geliang Gan, Xiao-Bing Gao, et Hugh S. Taylor. 2012. Fetal Radiofrequency Radiation Exposure From 800-1900 Mhz-Rated Cellular Telephones Affects Neurodevelopment and Behavior in Mice. *Scientific Reports* 2 (1).

Ali, Mohamad, Thibault Cholvin, Marc Antoine Muller, Brigitte Cosquer, Christian Kelche, Jean-Christophe Cassel, et Anne Pereira de Vasconcelos. 2017. Environmental enrichment enhances systems-level consolidation of a spatial memory after lesions of the ventral midline thalamus. *Neurobiology of Learning and Memory* 141 (mai): 108-23.

Ammari, Mohamed, Christelle Gamez, Anthony Lecomte, Mohsen Sakly, Hafedh Abdelmelek, et René De Seze. 2010. GFAP Expression in the Rat Brain Following Sub-Chronic Exposure to a 900 MHz Electromagnetic Field Signal. *International Journal of Radiation Biology* 86 (5): 367-75.

Ammari, Mohamed, Aurèlie Jacquet, Anthony Lecomte, Mohsen Sakly, Hafedh Abdelmelek, et René de Seze. 2008. Effect of head-only sub-chronic and chronic exposure to 900-MHz GSM electromagnetic fields on spatial memory in rats. *Brain Injury* 22 (13-14): 1021-29.

Anders, Simon, et Wolfgang Huber. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11 (10): R106.

ANSES. 2013. Radiofréquences et santé.

Antoine, Besnard, Laroche Serge, et Caboche Jocelyne. 2014. Comparative Dynamics of MAPK/ERK Signalling Components and Immediate Early Genes in the Hippocampus and Amygdala Following Contextual Fear Conditioning and Retrieval. *Brain Structure and Function* 219 (1): 415-30.

ARCEP. 2018. Les SERVICES de communications électroniques en France - 1e trimestre 2018 - Observatoire des marchés des communications électroniques (5 juillet 2018), 49.

Arendash, Gary W., Takashi Mori, Maggie Dorsey, Rich Gonzalez, Naoki Tajiri, et Cesar Borlongan. 2012. Electromagnetic Treatment to Old Alzheimer's Mice Reverses β-Amyloid Deposition, Modifies Cerebral Blood Flow, and Provides Selected Cognitive Benefit. Édité par Efthimios M. C. Skoulakis. *PLoS ONE* 7 (4): e35751.

Arendash, Gary W., Juan Sanchez-Ramos, Takashi Mori, Malgorzata Mamcarz, Xiaoyang Lin, Melissa Runfeldt, Li Wang, Guixin Zhang, Vasyl Sava, Jun Tan, et Chuanhai Cao. 2010. Electromagnetic Field Treatment Protects Against and Reverses Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease Mice. Édité par Mark A. Lovell. *Journal of Alzheimer's Disease* 19 (1): 191-210.

Atkins, Coleen M., Joel C. Selcher, Joseph J. Petraitis, James M. Trzaskos, et J. David Sweatt. 1998. The MAPK Cascade Is Required for Mammalian Associative Learning. *Nature Neuroscience* 1 (7): 602-9.

Atkinson, R. C., et R. M. Shiffrin. 1968. Human Memory: A Proposed System and its Control Processes. In *Psychology of Learning and Motivation*, édité par Kenneth W. Spence et Janet Taylor Spence, 2:89-195. Academic Press.

Azmitia, Efrain C. 2007. Cajal and Brain Plasticity: Insights Relevant to Emerging Concepts of Mind. *Brain Research Reviews* 55 (2): 395-405.

Bading, Hilmar. 2013. Nuclear Calcium Signalling in the Regulation of Brain Function. *Nature Reviews. Neuroscience* 14 (9): 593-608.

Banaceur, Sana, Sihem Banasr, Mohsen Sakly, et Hafedh Abdelmelek. 2013. Whole Body Exposure to 2.4GHz WIFI Signals: Effects on Cognitive Impairment in Adult

Triple Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *Behavioural Brain Research* 240 (mars): 197-201.

Barthélémy, Amélie, Amandine Mouchard, Marc Bouji, Kelly Blazy, Renaud Puigsegur, et Anne-Sophie Villégier. 2016. Glial Markers and Emotional Memory in Rats Following Acute Cerebral Radiofrequency Exposures. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (24): 25343-55.

Bekinschtein, Pedro, Martin Cammarota, et Jorge H. Medina. 2014. BDNF and Memory Processing. *Neuropharmacology* 76 Pt C (janvier): 677-83.

Benito, Eva, et Angel Barco. 2010. CREB's Control of Intrinsic and Synaptic Plasticity: Implications for CREB-Dependent Memory Models. *Trends in Neurosciences* 33 (5): 230-40.

Benito, Eva, Hendrik Urbanke, Binu Ramachandran, Jonas Barth, Rashi Halder, Ankit Awasthi, Gaurav Jain, Vincenzo Capece, Susanne Burkhardt, Magdalena Navarro-Sala, Sankari Nagarajan, Anna-Lena Schütz, Steven A. Johnsen, Stefan Bonn, Reinhardt Lührmann, Camin Dean, et André Fischer. 2015. HDAC Inhibitor–Dependent Transcriptome and Memory Reinstatement in Cognitive Decline Models. *The Journal of Clinical Investigation* 125 (9): 3572-84.

Benito, Eva, Luis M. Valor, Maria Jimenez-Minchan, Wolfgang Huber, et Angel Barco. 2011. CAMP Response Element-Binding Protein Is a Primary Hub of Activity-Driven Neuronal Gene Expression. *Journal of Neuroscience* 31 (50): 18237-50.

Berson, Amit, Raffaella Nativio, Shelley L. Berger, et Nancy M. Bonini. 2018. Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends in Neurosciences* 41 (9): 587-98.

Besnard, Antoine, Beatriz Galan-Rodriguez, Peter Vanhoutte, et Jocelyne Caboche. 2011. Elk-1 a Transcription Factor with Multiple Facets in the Brain. *Frontiers in Neuroscience* 5 (mars).

Bird, Adrian. 2007. Perceptions of Epigenetics. *Nature* 447 (7143): 396-98.

Bliss, T. V. P., et T. Lømo. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232 (2): 331-56.

Blum, Robert, et Arthur Konnerth. 2005. Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System: Mechanisms and Functions. *Physiology (Bethesda, Md.)* 20 (février): 70-78.

Blum, S., A. N. Moore, F. Adams, et P. K. Dash. 1999. A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in the CA1/CA2 Subfield of the Dorsal Hippocampus Is Essential for Long-Term Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (9): 3535-44.

Borbély, A. A., R. Huber, T. Graf, B. Fuchs, E. Gallmann, et P. Achermann. 1999. Pulsed High-Frequency Electromagnetic Field Affects Human Sleep and Sleep Electroencephalogram. *Neuroscience Letters* 275 (3): 207-10.

Bouji, Marc, Anthony Lecomte, Christelle Gamez, Kelly Blazy, et Anne-Sophie Villégier. 2016. Neurobiological Effects of Repeated Radiofrequency Exposures in Male Senescent Rats. *Biogerontology* 17 (5-6): 841-57.

Bouji, Marc, Anthony Lecomte, Yannick Hode, René de Seze, et Anne-Sophie Villégier. 2012. Effects of 900MHz Radiofrequency on Corticosterone, Emotional Memory and Neuroinflammation in Middle-Aged Rats. *Experimental Gerontology* 47 (6): 444-51.

Bousiges, Olivier, Romain Neidl, Monique Majchrzak, Marc-Antoine Muller, Alexandra Barbelivien, Anne Pereira de Vasconcelos, Anne Schneider, Jean-Philippe Loeffler, Jean-Christophe Cassel, et Anne-Laurence Boutillier. 2013. Detection of Histone Acetylation Levels in the Dorsal Hippocampus Reveals Early Tagging on Specific Residues of H2B and H4 Histones in Response to Learning. *PLoS ONE* 8 (3).

Bousiges, Olivier, Anne Pereira de Vasconcelos, Romain Neidl, Brigitte Cosquer, Karine Herbeaux, Irina Panteleeva, Jean-Philippe Loeffler, Jean-Christophe Cassel, et Anne-Laurence Boutillier. 2010. Spatial Memory Consolidation Is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferase (Histone Acetyltransferase) Expression Levels and H2B/H4 Acetylation-Dependent Transcriptional Events in the Rat Hippocampus. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (13): 2521-37.

Bramham, Clive R., et Elhoucine Messaoudi. 2005. BDNF Function in Adult Synaptic Plasticity: The Synaptic Consolidation Hypothesis. *Progress in Neurobiology* 76 (2): 99-125.

Bratch, Alexander, Spencer Kann, Joshua A. Cain, Jie-En Wu, Nilda Rivera-Reyes, Stefan Dalecki, Diana Arman, Austin Dunn, Shiloh Cooper, Hannah E. Corbin, Amanda R. Doyle, Matthew J. Pizzo, Alexandra E. Smith, et Jonathon D. Crystal. 2016. Working Memory Systems in the Rat. *Current Biology: CB* 26 (3): 351-55.

Burgess, Neil. 2006. Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends in Cognitive Sciences* 10 (12): 551-57.

Burgess, Neil, Eleanor A Maguire, et John O'Keefe. 2002. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. *Neuron* 35 (4): 625-41.

Caeser, Manfred, et Ad Aertsen. 1991. Morphological Organization of Rat Hippocampal Slice Cultures. *Journal of Comparative Neurology* 307 (1): 87-106.

Capstick, Myles H., Sven Kuehn, Veronica Berdinas-Torres, Yijian Gong, Perry F. Wilson, John M. Ladbury, Galen Koepke, David L. McCormick, James Gauger, Ronald L. Melnick, et Niels Kuster. 2017. A Radio Frequency Radiation Exposure System for Rodents Based on Reverberation Chambers. *IEEE Transactions on Electromagnetic Compatibility* 59 (4): 1041-52.

Caputi, Francesca Felicia, Sanzio Candeletti, et Patrizia Romualdi. 2017. Epigenetic Approaches in Neuroblastoma Disease Pathogenesis. In *Neuroblastoma - Current State and Recent Updates*, édité par Chandrika Gowda. InTech.

Carballo-Quintás, M., I. Martínez-Silva, C. Cadarso-Suárez, M. Álvarez-Figueiras, F.J. Ares-Pena, et E. López-Martín. 2011. A Study of Neurotoxic Biomarkers, c-Fos and GFAP after Acute Exposure to GSM Radiation at 900MHz in the Picrotoxin Model of Rat Brains. *NeuroToxicology* 32 (4): 478-94.

Casadesus, G., B. Shukitt-Hale, et J. A. Joseph. 2001. Automated Measurement of Age-Related Changes in the Locomotor Response to Environmental Novelty and Home-Cage Activity. *Mechanisms of Ageing and Development* 122 (15): 1887-97.

Cassel, Jean-Christophe, Brigitte Cosquer, Rodrigue Galani, et Niels Kuster. 2004. Whole-Body Exposure to 2.45 GHz Electromagnetic Fields Does Not Alter Radial-Maze Performance in Rats. *Behavioural Brain Research* 155 (1): 37-43.

Cassel, Jean-Christophe, Anne Pereira de Vasconcelos, Michaël Loureiro, Thibault Cholvin, John C. Dalrymple-Alford, et Robert P. Vertes. 2013. The Reuniens and Rhomboid Nuclei: Neuroanatomy, Electrophysiological Characteristics and Behavioral Implications. *Progress in Neurobiology* 111 (décembre): 34-52.

Chase, William G., et Herbert A. Simon. 1973. Perception in Chess. *Cognitive Psychology* 4 (1): 55-81.

Chatterjee, Snehajyoti, Raphaelle Cassel, Anne Schneider-Anthony, Karine Merienne, Brigitte Cosquer, Laura Tzeplaeff, Sarmistha Halder Sinha, Manoj Kumar, Piyush Chaturbedy, Muthusamy Eswaramoorthy, Stéphanie Le Gras, Céline Keime, Olivier Bousiges, Patrick Dutar, Petnoi Petsophonsakul, Claire Rampon, Jean-Christophe Cassel, Luc Buée, et al. 2018. Reinstating Plasticity and Memory in a Tauopathy Mouse Model with an Acetyltransferase Activator. *EMBO Molecular Medicine*, octobre, e8587.

Cholvin, Thibault, Michaël Loureiro, Raphaelle Cassel, Brigitte Cosquer, Karin Herbeaux, Anne Pereira de Vasconcelos, et Jean-Christophe Cassel. 2016. Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex Each Contribute to the Retrieval of a Recent Spatial Memory in Rats. *Brain Structure & Function* 221 (1): 91-102.

Chrivia, J. C., R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy, et R. H. Goodman. 1993. Phosphorylated CREB Binds Specifically to the Nuclear Protein CBP. *Nature* 365 (6449): 855-59.

Clegg, J., A. C. Marvin, J. F. Dawson, et S. J. Porter. 2005. Optimization of stirrer designs in a reverberation chamber. *IEEE Transactions on Electromagnetic Compatibility* 47 (4): 824-32.

Clopath, Claudia. 2012. Synaptic Consolidation: An Approach to Long-Term Learning. *Cognitive Neurodynamics* 6 (3): 251-57.

Cobb, B. L., J. R. Jauchem, P. A. Mason, M. P. Dooley, S. A. Miller, J. M. Ziriax, et M. R. Murphy. 2000. Neural and Behavioral Teratological Evaluation of Rats Exposed to Ultra-Wideband Electromagnetic Fields. *Bioelectromagnetics* 21 (7): 524-37.

Cobb, Brenda L., James R. Jauchem, et Eleanor R. Adair. 2004. Radial Arm Maze Performance of Rats Following Repeated Low Level Microwave Radiation Exposure. *Bioelectromagnetics* 25 (1): 49-57.

Cosquer, Brigitte, Rodrigue Galani, Niels Kuster, et Jean-Christophe Cassel. 2005. Whole-Body Exposure to 2.45 GHz Electromagnetic Fields Does Not Alter Anxiety Responses in Rats: A plus-Maze Study Including Test Validation. *Behavioural Brain Research* 156 (1): 65-74.

Cosquer, Brigitte, Niels Kuster, et Jean-Christophe Cassel. 2005. Whole-Body Exposure to 2.45 GHz Electromagnetic Fields Does Not Alter 12-Arm Radial-Maze with Reduced Access to Spatial Cues in Rats. *Behavioural Brain Research* 161 (2): 331-34.

Cosquer, Brigitte, Anne Pereira de Vasconcelos, Jürg Fröhlich, et Jean-Christophe Cassel. 2005. Blood–Brain Barrier and Electromagnetic Fields: Effects of Scopolamine Methylbromide on Working Memory after Whole-Body Exposure to 2.45GHz Microwaves in Rats. *Behavioural Brain Research* 161 (2): 229-37.

Croft, R. J., D. L. Hamblin, J. Spong, A. W. Wood, R. J. McKenzie, et C. Stough. 2008. The Effect of Mobile Phone Electromagnetic Fields on the Alpha Rhythm of Human Electroencephalogram. *Bioelectromagnetics* 29 (1): 1-10.

Croft, R. J., S. Leung, R. J. McKenzie, S. P. Loughran, S. Iskra, D. L. Hamblin, et N. R. Cooper. 2010. Effects of 2G and 3G Mobile Phones on Human Alpha Rhythms: Resting EEG in Adolescents, Young Adults, and the Elderly. *Bioelectromagnetics* 31 (6): 434-44.

Croft, Rodney J., Jody S. Chandler, Adrian P. Burgess, Robert J. Barry, John D. Williams, et Adam R. Clarke. 2002. Acute Mobile Phone Operation Affects Neural Function in Humans. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 113 (10): 1623-32.

Cunha, Carla, Riccardo Brambilla, et Kerrie L. Thomas. 2010. A Simple Role for BDNF in Learning and Memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience* 3 (février).

Dalley, Jeffrey W., Rudolf N. Cardinal, et Trevor W. Robbins. 2004. Prefrontal Executive and Cognitive Functions in Rodents: Neural and Neurochemical Substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28 (7): 771-84.

Danzer, Steve C., Kristy R. C. Crooks, Donald C. Lo, et James O. McNamara. 2002. Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Formation of Basal Dendrites and Axonal Branching in Dentate Granule Cells in Hippocampal Explant Cultures. *Journal of Neuroscience* 22 (22): 9754-63.

Davis, S., P. Vanhoutte, C. Pages, J. Caboche, et S. Laroche. 2000. The MAPK/ERK Cascade Targets Both Elk-1 and CAMP Response Element-Binding Protein to Control Long-Term Potentiation-Dependent Gene Expression in the Dentate Gyrus in Vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (12): 4563-72.

De Souza, Rebecca A. G., Natalia Kosior, Sarah B. Thomson, Anthony Mathelier, Allen W. Zhang, Kristina Bečanović, Wyeth W. Wasserman, et Blair R. Leavitt. 2018. Computational Analysis of Transcriptional Regulation Sites at the HTT Gene Locus. *Journal of Huntington's Disease* 7 (3): 223-37.

Deans, Carrie, et Keith A. Maggert. 2015. What Do You Mean, « Epigenetic »? *Genetics* 199 (4): 887-96.

Del Vecchio, Giovanna, Alessandro Giuliani, Mercedes Fernandez, Pietro Mesirca, Ferdinando Bersani, Rosanna Pinto, Lucia Ardoino, Giorgio A. Lovisolo, Luciana Giardino, et Laura Calzà. 2009. Continuous Exposure to 900MHz GSM-Modulated EMF Alters Morphological Maturation of Neural Cells. *Neuroscience Letters* 455 (3): 173-77.

Deshmukh, Pravin Suryakantrao, Namita Nasare, Kanu Megha, Basu Dev Banerjee, Rafat Sultana Ahmed, Digvijay Singh, Mahesh Pandurang Abegaonkar, Ashok

Kumar Tripathi, et Pramod Kumari Mediratta. 2015. Cognitive Impairment and Neurogenotoxic Effects in Rats Exposed to Low-Intensity Microwave Radiation. *International Journal of Toxicology* 34 (3): 284-90.

Dewsbury, Donald A. 1997. In celebration of the centennial of Ivan P. Pavlov's (1897/1902) The Work of the Digestive Glands. *American Psychologist* 52 (9): 933-35.

Dubreuil, Diane, Thérèse Jay, et Jean-Marc Edeline. 2002. Does Head-Only Exposure to GSM-900 Electromagnetic Fields Affect the Performance of Rats in Spatial Learning Tasks? *Behavioural Brain Research* 129 (1-2): 203-10.

Dubreuil, Diane, Thérèse Jay, et Jean-Marc Edeline. 2003. Head-Only Exposure to GSM 900-MHz Electromagnetic Fields Does Not Alter Rat's Memory in Spatial and Non-Spatial Tasks. *Behavioural Brain Research* 145 (1-2): 51-61.

Dudai, Yadin. 2004. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable Is the Engram? *Annual Review of Psychology* 55 (1): 51-86.

English, J. D., et J. D. Sweatt. 1997. A Requirement for the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Hippocampal Long Term Potentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (31): 19103-6.

Fajemiroye, James Oluwagbamigbe, Keasling Adam, Zjawiony Jordan K, Costa Elson Alves, et Adeleke Adesiyan Aderoju. 2018. Evaluation of Anxiolytic and Antidepressant-like Activity of Aqueous Leaf Extract of Nymphaea Lotus Linn. in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 17 (2): 613-26.

Falcioni, L., L. Bua, E. Tibaldi, M. Lauriola, L. De Angelis, F. Gnudi, D. Mandrioli, M. Manservigi, F. Manservisi, I. Manzoli, I. Menghetti, R. Montella, S. Panzacchi, D. Sgargi, V. Strollo, A. Vornoli, et F. Belpoggi. 2018. Report of Final Results Regarding Brain and Heart Tumors in Sprague-Dawley Rats Exposed from Prenatal Life until Natural Death to Mobile Phone Radiofrequency Field Representative of a 1.8 GHz GSM Base Station Environmental Emission. *Environmental Research* 165 (août): 496-503.

Fanselow, Michael S., et Hong-Wei Dong. 2010. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65 (1): 7-19.

Finnie, J. W., P. C. Blumbergs, J. Manavis, T. D. Utteridge, V. Gebski, J. G. Swift, B. Vernon-Roberts, et T. R. Kuchel. 2001. Effect of Global System for Mobile Communication (Gsm)-like Radiofrequency Fields on Vascular Permeability in Mouse Brain. *Pathology* 33 (3): 338-40.

Finnie, John W. 2005. Expression of the Immediate Early Gene, c-Fos, in Mouse Brain after Acute Global System for Mobile Communication Microwave Exposure. *Pathology* 37 (3): 231-33.

Finnie, John W., Zhao Cai, Peter C. Blumbergs, Jim Manavis, et Timothy R. Kuchel. 2006. Expression of the Immediate Early Gene, c-Fos, in Fetal Brain after Whole of Gestation Exposure of Pregnant Mice to Global System for Mobile Communication Microwaves. *Pathology* 38 (4): 333-35.

Finnie, John W., Zhao Cai, Peter C. Blumbergs, Jim Manavis, et Timothy R. Kuchel. 2007. Stress Response in Mouse Brain after Long-Term (2 Year) Exposure to Mobile Telephone Radiofrequency Fields Using the Immediate Early Gene, c-Fos. *Pathology* 39 (2): 271-73.

Finnie, John W., Glyn Chidlow, Peter C. Blumbergs, Jim Manavis, et Zhao Cai. 2009. Heat Shock Protein Induction in Fetal Mouse Brain as a Measure of Stress after Whole of Gestation Exposure to Mobile Telephony Radiofrequency Fields. *Pathology* 41 (3): 276-79.

Fragopoulou, Adamantia F., Alexandros Polyzos, Maria-Despoina Papadopoulou, Anna Sansone, Areti K. Manta, Evangelos Balafas, Nikolaos Kostomitsopoulos, Aikaterini Skouroliakou, Chryssostomos Chatgilialoglu, Alexandros Georgakilas, Dimitrios J. Stravopodis, Carla Ferreri, Dimitris Thanos, et Lukas H. Margaritis. 2018. Hippocampal Lipidome and Transcriptome Profile Alterations Triggered by Acute Exposure of Mice to GSM 1800 MHz Mobile Phone Radiation: An Exploratory Study. *Brain and Behavior* 8 (6): e01001.

Fragopoulou, Adamantia F., Athina Samara, Marianna H. Antonelou, Anta Xanthopoulou, Aggeliki Papadopoulou, Konstantinos Vougas, Eugenia Koutsogiannopoulou, Ema Anastasiadou, Dimitrios J. Stravopodis, George Th. Tsangaris, et Lukas H. Margaritis. 2012. Brain Proteome Response Following Whole Body Exposure of Mice to Mobile Phone or Wireless DECT Base Radiation. *Electromagnetic Biology and Medicine* 31 (4): 250-74.

Fragopoulou, A.F., P. Miltiadous, A. Stamatakis, F. Stylianopoulou, S.L. Koussoulakos, et L.H. Margaritis. 2010. Whole Body Exposure with GSM 900MHz Affects Spatial Memory in Mice. *Pathophysiology* 17 (3): 179-87.

Francelle, Laetitia, Caroline Lotz, Tiago Outeiro, Emmanuel Brouillet, et Karine Merienne. 2017. Contribution of Neuroepigenetics to Huntington's Disease. *Frontiers in Human Neuroscience* 11: 17.

Frankland, Paul W., et Bruno Bontempi. 2005. The Organization of Recent and Remote Memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6 (2): 119-30.

Freudenthal, Ramiro, Arturo Romano, et Aryeh Routtenberg. 2004. Transcription Factor NF-KappaB Activation after in Vivo Perforant Path LTP in Mouse Hippocampus. *Hippocampus* 14 (6): 677-83.

Fritze, K., C. Sommer, B. Schmitz, G. Mies, K.-A. Hossmann, M. Kiessling, et C. Wiessner. 1997. Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat. *Acta Neuropathologica* 94 (5): 465-70.

Fritze, K., C Wiessner, N Kuster, C Sommer, P Gass, D M Hermann, M Kiessling, et K-A Hossmann. 1997. EFFECT OF GLOBAL SYSTEM FOR MOBILE COMMUNICATION MICROWAVE EXPOSURE ON THE GENOMIC RESPONSE OF THE RAT BRAIN. *Neuroscience* 81 (3): 627-39.

Fuchs, Fanny, Brigitte Cosquer, Lorène Penazzi, Chantal Mathis, Christian Kelche, Monique Majchrzak, et Alexandra Barbelivien. 2016. Exposure to an Enriched Environment up to Middle Age Allows Preservation of Spatial Memory Capabilities in Old Age. *Behavioural Brain Research* 299 (février): 1-5.

Ghatei, Najmeh, Ariane Sadr Nabavi, Mohammad Hossein Bahreyni Toosi, Hosein Azimian, Mansour Homayoun, Reza Ghasemnezhad Targhi, et Hossein Haghir. 2017. Evaluation of Bax, Bcl-2, P21 and P53 Genes Expression Variations on Cerebellum of BALB/c Mice before and after Birth under Mobile Phone Radiation Exposure. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 20 (9): 1037-43.

Giovannini, Maria Grazia. 2011. The Role of the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway in Memory Encoding. *Reviews in the Neurosciences* 17 (6): 619–634.

Gisquet-Verrier, P., et B. Delatour. 2006. The Role of the Rat Prelimbic/Infralimbic Cortex in Working Memory: Not Involved in the Short-Term Maintenance but in Monitoring and Processing Functions. *Neuroscience* 141 (2): 585-96.

Gisquet-Verrier, Pascale. 2006. Bases structurales et anatomiques de la mémoire 18: 9.

Godefroy, O., M. Jeannerod, P. Allain, et D. Le Gall. 2008. Lobe frontal, fonctions exécutives et controle cognitif. *Revue Neurologique*, Les trente ans de la Société de Neuropsychologie de Langue Française, 164 (mai): S119-27.

Gökçek-Saraç, Ç, Ş Özen, et N. Derin. 2017. Effects of 2G mobile phone exposure on both behavioural performance and levels of enzyme from NMDA-dependent pathway. In *2017 Progress In Electromagnetics Research Symposium - Spring (PIERS)*, 1739-42.

Gräff, Johannes, et Isabelle M. Mansuy. 2008. Epigenetic Codes in Cognition and Behaviour. *Behavioural Brain Research* 192 (1): 70-87.

Gräff, Johannes, et Li-Huei Tsai. 2013. Histone Acetylation: Molecular Mnemonics on the Chromatin. *Nature Reviews. Neuroscience* 14 (2): 97-111.

Grafström, Gustav, Henrietta Nittby, Arne Brun, Lars Malmgren, Bertil R.R. Persson, Leif G. Salford, et Jacob Eberhardt. 2008. Histopathological Examinations of Rat Brains after Long-Term Exposure to GSM-900 Mobile Phone Radiation. *Brain Research Bulletin* 77 (5): 257-63.

Gupta, Swati, Se Y. Kim, Sonja Artis, David L. Molfese, Armin Schumacher, J. David Sweatt, Richard E. Paylor, et Farah D. Lubin. 2010. Histone Methylation Regulates Memory Formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (10): 3589-99.

Haarala, Christian, Monica Bergman, Matti Laine, Antti Revonsuo, Mika Koivisto, et Heikki Hämäläinen. 2005. Electromagnetic Field Emitted by 902 MHz Mobile Phones Shows No Effects on Children's Cognitive Function. *Bioelectromagnetics* Suppl 7: S144-150.

Haarala, Christian, Linda Björnberg, Maria Ek, Matti Laine, Antti Revonsuo, Mika Koivisto, et Heikki Hämäläinen. 2003. Effect of a 902 MHz Electromagnetic Field Emitted by Mobile Phones on Human Cognitive Function: A Replication Study. *Bioelectromagnetics* 24 (4): 283-88.

Haarala, Christian, Fiia Takio, Taija Rintee, Matti Laine, Mika Koivisto, Antti Revonsuo, et Heikki Hämäläinen. 2007. Pulsed and Continuous Wave Mobile Phone Exposure over Left versus Right Hemisphere: Effects on Human Cognitive Function. *Bioelectromagnetics* 28 (4): 289-95.

Hafting, Torkel, Marianne Fyhn, Sturla Molden, May-Britt Moser, et Edvard I. Moser. 2005. Microstructure of a Spatial Map in the Entorhinal Cortex. *Nature* 436 (7052): 801-6.

Haghani, M., M. Shabani, et K. Moazzami. 2013. Maternal Mobile Phone Exposure Adversely Affects the Electrophysiological Properties of Purkinje Neurons in Rat Offspring. *Neuroscience* 250 (octobre): 588-98.

Halder, Rashi, Magali Hennion, Ramon O. Vidal, Orr Shomroni, Raza-Ur Rahman, Ashish Rajput, Tonatiuh Pena Centeno, Frauke van Bebber, Vincenzo Capece, Julio C. Garcia Vizcaino, Anna-Lena Schuetz, Susanne Burkhardt, Eva Benito, Magdalena Navarro Sala, Sanaz Bahari Javan, Christian Haass, Bettina Schmid, Andre Fischer, et al. 2016. DNA Methylation Changes in Plasticity Genes

Accompany the Formation and Maintenance of Memory. *Nature Neuroscience* 19 (1): 102-10.

Hampsey, Michael. 1998. Molecular Genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional Machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (2): 465-503.

Hansen, Kasper B., Feng Yi, Riley E. Perszyk, Hiro Furukawa, Lonnie P. Wollmuth, Alasdair J. Gibb, et Stephen F. Traynelis. 2018. Structure, Function, and Allosteric Modulation of NMDA Receptors. *The Journal of General Physiology* 150 (8): 1081-1105.

Hao, Dongmei, Lei Yang, Su Chen, Jun Tong, Yonghao Tian, Benhang Su, Shuicai Wu, et Yanjun Zeng. 2013. Effects of Long-Term Electromagnetic Field Exposure on Spatial Learning and Memory in Rats. *Neurological Sciences* 34 (2): 157-64.

Hassanshahi, Amin, Seyed Ali Shafeie, Iman Fatemi, Elham Hassanshahi, Mohammad Allahtavakoli, Mohammad Shabani, Ali Roohbakhsh, et Ali Shamsizadeh. 2017. The Effect of Wi-Fi Electromagnetic Waves in Unimodal and Multimodal Object Recognition Tasks in Male Rats. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 38 (6): 1069-76.

Hebb, Donald Olding. 1949. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Wiley.

Hebert, April E., et Pramod K. Dash. 2002. Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity in the Entorhinal Cortex Is Necessary for Long-Term Spatial Memory. *Learning & Memory* 9 (4): 156-66.

Henke, Katharina. 2010. A Model for Memory Systems Based on Processing Modes Rather than Consciousness. *Nature Reviews Neuroscience* 11 (7): 523-32.

Heyward, Frankie D., et J. David Sweatt. 2015. DNA Methylation in Memory Formation , DNA Methylation in Memory Formation: Emerging Insights , Emerging Insights. *The Neuroscientist* 21 (5): 475-89.

Hol, Elly M., et Milos Pekny. 2015. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and the Astrocyte Intermediate Filament System in Diseases of the Central Nervous System. *Current Opinion in Cell Biology* 32 (février): 121-30.

Holstege, F C, P C van der Vliet, et H T Timmers. 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *The EMBO Journal* 15 (7): 1666-77.

Hoover, Walter B., et Robert P. Vertes. 2007. Anatomical Analysis of Afferent Projections to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. *Brain Structure & Function* 212 (2): 149-79.

Huber, R., T. Graf, K. A. Cote, L. Wittmann, E. Gallmann, D. Matter, J. Schuderer, N. Kuster, A. A. Borbély, et P. Achermann. 2000. Exposure to Pulsed High-Frequency Electromagnetic Field during Waking Affects Human Sleep EEG. *Neuroreport* 11 (15): 3321-25.

Huber, R., V. Treyer, A. A. Borbély, J. Schuderer, J. M. Gottselig, H.-P. Landolt, E. Werth, T. Berthold, N. Kuster, A. Buck, et P. Achermann. 2002. Electromagnetic Fields, Such as Those from Mobile Phones, Alter Regional Cerebral Blood Flow and Sleep and Waking EEG. *Journal of Sleep Research* 11 (4): 289-95.

Hunter, Chris J., Judit Remenyi, Sonia A. Correa, Lucia Privitera, Kathleen M. S. E. Reyskens, Kirsty J. Martin, Rachel Toth, Bruno G. Frenguelli, et J. Simon C. Arthur. 2017. MSK1 Regulates Transcriptional Induction of Arc/Arg3.1 in Response to Neurotrophins. *FEBS Open Bio* 7 (6): 821-34.

Ikinci, Ayse, Ersan Odaci, Mehmet Yildirim, Haydar Kaya, Metehan Akça, Hatice Hanci, Ali Aslan, Osman Fikret Sönmez, et Orhan Bas. 2013. The effects of prenatal exposure to a 900 megahertz electromagnetic field on hippocampus morphology and learning behavior in rat pups. *NeuroQuantology* 11 (4).

Isbell, D. 1960. Log periodic dipole arrays. *IRE Transactions on Antennas and Propagation* 8 (3): 260-67.

Israel, M., V. Zaryabova, et M. Ivanova. 2013. Electromagnetic Field Occupational Exposure: Non-Thermal vs. Thermal Effects. *Electromagnetic Biology and Medicine* 32 (2): 145-54.

Ito, M., et M. Kano. 1982. Long-Lasting Depression of Parallel Fiber-Purkinje Cell Transmission Induced by Conjunctive Stimulation of Parallel Fibers and Climbing Fibers in the Cerebellar Cortex. *Neuroscience Letters* 33 (3): 253-58.

James, William. 1890. *The Principles of Psychology*. New York : Holt.

Jankowski, Maciej M, Md Nurul Islam, Nicholas F Wright, Seralynne D Vann, Jonathan T Erichsen, John P Aggleton, et Shane M O'Mara. 2014. Nucleus reuniens of the thalamus contains head direction cells. *eLife* 3 (juillet).

Jankowski, Maciej M., et Shane M. O'Mara. 2015. Dynamics of place, boundary and object encoding in rat anterior claustrum. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9 (octobre).

Jiang, Y, M Yan, et J D Gralla. 1996. A three-step pathway of transcription initiation leading to promoter clearance at an activation RNA polymerase II promoter. *Molecular and Cellular Biology* 16 (4): 1614-21.

Jin, Yeung-Bae, Hae-June Lee, Jae Seon Lee, Jeong-Ki Pack, Nam Kim, et Yun-Sil Lee. 2011. One-Year, Simultaneous Combined Exposure of CDMA and WCDMA Radiofrequency Electromagnetic Fields to Rats. *International Journal of Radiation Biology* 87 (4): 416-23.

Joo, Jae-Yeol, Katie Schaukowitch, Lukas Farbiak, Gokhul Kilaru, et Tae-Kyung Kim. 2016. Stimulus-Specific Combinatorial Functionality of Neuronal c-Fos Enhancers. *Nature Neuroscience* 19 (1): 75-83.

Jorge-Mora, T., M. J. Misa-Agustiño, J. A. Rodríguez-González, F. J. Jorge-Barreiro, F. J. Ares-Pena, et E. López-Martín. 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. *Neurochemical Research* 36 (12): 2322-32.

Jost, Carolina R., Catharina E. E. M. Van Der Zee, Henricus J. A. In 't Zandt, Frank Oerlemans, Michel Verheij, Femke Streijger, Jack Fransen, Arend Heerschap, Alexander R. Cools, et Bé Wieringa. 2002. Creatine Kinase B-Driven Energy Transfer in the Brain Is Important for Habituation and Spatial Learning Behaviour, Mossy Fibre Field Size and Determination of Seizure Susceptibility. *The European Journal of Neuroscience* 15 (10): 1692-1706.

Kaltschmidt, Barbara, et Christian Kaltschmidt. 2015. NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (novembre).

Kaltschmidt, Barbara, Delphine Ndiaye, Martin Korte, Stéphanie Pothion, Laurence Arbibe, Maria Prüllage, Julia Pfeiffer, Antje Lindecke, Volker Staiger, Alain Israël, Christian Kaltschmidt, et Sylvie Mémet. 2006. NF-KappaB Regulates Spatial Memory Formation and Synaptic Plasticity through Protein Kinase A/CREB Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 26 (8): 2936-46.

Kandel, E. R. 2001. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue between Genes and Synapses. *Science (New York, N.Y.)* 294 (5544): 1030-38.

Karlić, Rosa, Ho-Ryun Chung, Julia Lasserre, Kristian Vlahovicek, et Martin Vingron. 2010. Histone Modification Levels Are Predictive for Gene Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (7): 2926-31.

Kassubek, Rebecca, Martin Gorges, Michael Schocke, Viktoria A. M. Hagenston, André Huss, Albert C. Ludolph, Jan Kassubek, et Hayrettin Tumani. 2017. GFAP in Early Multiple Sclerosis: A Biomarker for Inflammation. *Neuroscience Letters* 657 (septembre): 166-70.

Kelleher, Raymond J., Arvind Govindarajan, et Susumu Tonegawa. 2004. Translational Regulatory Mechanisms in Persistent Forms of Synaptic Plasticity. *Neuron* 44 (1): 59-73.

Kerimoglu, Cemil, Roberto C. Agis-Balboa, Andrea Kranz, Roman Stilling, Sanaz Bahari-Javan, Eva Benito-Garagorri, Rashi Halder, Susanne Burkhardt, Adrian Francis Stewart, et Andre Fischer. 2013. Histone-Methyltransferase MLL2 (KMT2B) Is Required for Memory Formation in Mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (8): 3452-64.

Kessels, Helmut W., et Roberto Malinow. 2009. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* 61 (3): 340-50.

Kim, Daehwan, Geo Pertea, Cole Trapnell, Harold Pimentel, Ryan Kelley, et Steven L. Salzberg. 2013. TopHat2: Accurate Alignment of Transcriptomes in the Presence of Insertions, Deletions and Gene Fusions. *Genome Biology* 14 (4): R36.

Kim, Ju Hwan, Da-Hyeon Yu, Hyo-Jeong Kim, Yang Hoon Huh, Seong-Wan Cho, Jin-Koo Lee, Hyung-Gun Kim, et Hak Rim Kim. 2018. Exposure to 835 MHz Radiofrequency Electromagnetic Field Induces Autophagy in Hippocampus but Not in Brain Stem of Mice. *Toxicology and Industrial Health* 34 (1): 23-35.

Kim, Ronald, Kati L. Healey, Marian T. Sepulveda-Orengo, et Kathryn J. Reissner. 2018. Astroglial Correlates of Neuropsychiatric Disease: From Astrocytopathy to Astrogliosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 87 (Pt A): 126-46.

Klose, Melanie, Karen Grote, Oliver Spathmann, Joachim Streckert, Markus Clemens, Volkert W. Hansen, et Alexander Lerchl. 2014. Effects of Early-Onset Radiofrequency Electromagnetic Field Exposure (GSM 900 MHz) on Behavior and Memory in Rats. *Radiation Research* 182 (4): 435-47.

Koivisto, M., A. Revonsuo, C. Krause, C. Haarala, L. Sillanmäki, M. Laine, et H. Hämäläinen. 2000. Effects of 902 MHz Electromagnetic Field Emitted by Cellular Telephones on Response Times in Humans. *Neuroreport* 11 (2): 413-15.

Kumar, Manoj, Surya P. Singh, et Chandra M. Chaturvedi. 2016. Chronic Nonmodulated Microwave Radiations in Mice Produce Anxiety-like and Depression-like Behaviours and Calcium- and NO-Related Biochemical Changes in the Brain. *Experimental Neurobiology* 25 (6): 318-27.

Kumlin, Timo, Hennariikka Iivonen, Pasi Miettinen, Antti Juvonen, Thomas van Groen, Lauri Puranen, Risto Pitkäaho, Jukka Juutilainen, et Heikki Tanila. 2007. Mobile Phone Radiation and the Developing Brain: Behavioral and Morphological Effects in Juvenile Rats. *Radiation Research* 168 (4): 471-79.

Kwak, Hojoong, et John T. Lis. 2013. Control of Transcriptional Elongation. *Annual review of genetics* 47: 483-508.

Kwok, R. P., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bächinger, R. G. Brennan, S. G. Roberts, M. R. Green, et R. H. Goodman. 1994. Nuclear Protein CBP Is a Coactivator for the Transcription Factor CREB. *Nature* 370 (6486): 223-26.

Lai, H., A. Horita, et A. W. Guy. 1994. Microwave Irradiation Affects Radial-Arm Maze Performance in the Rat. *Bioelectromagnetics* 15 (2): 95-104.

Lameth, Julie, Annie Gervais, Catherine Colin, Philippe Lévêque, Thérèse M. Jay, Jean-Marc Edeline, et Michel Mallat. 2017. Acute Neuroinflammation Promotes Cell Responses to 1800 MHz GSM Electromagnetic Fields in the Rat Cerebral Cortex. *Neurotoxicity Research* 32 (3): 444-59.

Laval, L., Ph. Leveque, et B. Jecko. 2000. A New in Vitro Exposure Device for the Mobile Frequency of 900 MHz. *Bioelectromagnetics* 21 (4): 255-63.

Lavaur, Jérémie, Frédéric Bernard, Pierre Trifilieff, Vincent Pascoli, Vincent Kappes, Christiane Pagès, Peter Vanhoutte, et Jocelyne Caboche. 2007. A TAT-DEF-Elk-1 Peptide Regulates the Cytonuclear Trafficking of Elk-1 and Controls Cytoskeleton Dynamics. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (52): 14448-58.

Lee, Hae-June, Yeung Bae Jin, Tae-Hong Kim, Jeong-Ki Pack, Nam Kim, Hyung-Do Choi, Jae-Seon Lee, et Yun-Sil Lee. 2012. The Effects of Simultaneous Combined Exposure to CDMA and WCDMA Electromagnetic Fields on Rat Testicular Function. *Bioelectromagnetics* 33 (4): 356-64.

Lee, Hae-June, Jeong-Ki Pack, Tae-Hong Kim, Nam Kim, Soo-Yong Choi, Jae-Seon Lee, Sung-Ho Kim, et Yun-Sil Lee. 2010. The Lack of Histological Changes of CDMA Cellular Phone-Based Radio Frequency on Rat Testis. *Bioelectromagnetics* 31 (7): 528-34.

Lesburguères, Edith, Oliviero L. Gobbo, Stéphanie Alaux-Cantin, Anne Hambucken, Pierre Trifilieff, et Bruno Bontempi. 2011. Early Tagging of Cortical Networks Is Required for the Formation of Enduring Associative Memory. *Science (New York, N.Y.)* 331 (6019): 924-28.

Lessmann, Volkmar, et Tanja Brigadski. 2009. Mechanisms, Locations, and Kinetics of Synaptic BDNF Secretion: An Update. *Neuroscience Research* 65 (1): 11-22.

Leung, S., R. J. Croft, R. J. McKenzie, S. Iskra, B. Silber, N. R. Cooper, B. O'Neill, V. Cropley, A. Diaz-Trujillo, D. Hamblin, et D. Simpson. 2011. Effects of 2G and 3G Mobile Phones on Performance and Electrophysiology in Adolescents, Young Adults and Older Adults. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 122 (11): 2203-16.

Lewis, D. J. 1979. Psychobiology of Active and Inactive Memory. *Psychological Bulletin* 86 (5): 1054-83.

Li, Hai-Juan, Rui-Yun Peng, Chang-Zhen Wang, Si-Mo Qiao, Zou Yong, Ya-Bing Gao, Xin-Ping Xu, Shao-Xia Wang, Ji Dong, Hong-Yan Zuo, Zhao Li, Hong-Mei Zhou, Li-Feng Wang, et Xiang-Jun Hu. 2015. Alterations of Cognitive Function and 5-HT System in Rats after Long Term Microwave Exposure. *Physiology & Behavior* 140 (mars): 236-46.

Li, Xiang, Paul Marshall, Laura Leighton, Esmi Zajackowski, Timothy Bredy, et Wei Wei. 2018. The DNA Repair Associated Protein Gadd45g Regulates the Temporal Coding of Immediate Early Gene Expression and Is Required for the Consolidation of Associative Fear Memory. *BioRxiv*, février, 265355.

Lilienbaum, Alain, et Alain Israël. 2003. From Calcium to NF-Kappa B Signaling Pathways in Neurons. *Molecular and Cellular Biology* 23 (8): 2680-98.

Lindecke, Antje, Martin Korte, Marta Zagrebelsky, Volker Horejschi, Margitta Elvers, Darius Widera, Maria Pruellage, Julia Pfeiffer, Barbara Kaltschmidt, et Christian Kaltschmidt. 2006. Long-Term Depression Activates Transcription of Immediate Early Transcription Factor Genes: Involvement of Serum Response Factor/Elk-1. *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE* 24 (2).

Liu, Xiao, Hongyan Zuo, Dewen Wang, Ruiyun Peng, Tao Song, Shuiming Wang, Xinping Xu, Yabing Gao, Yang Li, Shaoxia Wang, Lifeng Wang, et Li Zhao.

2015. Improvement of Spatial Memory Disorder and Hippocampal Damage by Exposure to Electromagnetic Fields in an Alzheimer's Disease Rat Model. Édité par Alexandra Kavushansky. *PLOS ONE* 10 (5): e0126963.

Lonze, Bonnie E., et David D. Ginty. 2002. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35 (4): 605-23.

Lopez, Joëlle, Karin Herbeaux, Brigitte Cosquer, Michel Engeln, Christophe Muller, Christine Lazarus, Christian Kelche, Bruno Bontempi, Jean-Christophe Cassel, et Anne Pereira de Vasconcelos. 2012. Context-Dependent Modulation of Hippocampal and Cortical Recruitment during Remote Spatial Memory Retrieval. *Hippocampus* 22 (4): 827-41.

Lopez, Joëlle, Anne Pereira de Vasconcelos, et Jean-Christophe Cassel. 2008. Environmental Cue Saliency Influences the Vividness of a Remote Spatial Memory in Rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 90 (1): 285-89.

Lopez-Atalaya, Jose P., et Angel Barco. 2014. Can Changes in Histone Acetylation Contribute to Memory Formation? *Trends in Genetics: TIG* 30 (12): 529-39.

López-Martín, E., J. Bregains, J. L. Relova-Quinteiro, C. Cadarso-Suárez, F. J. Jorge-Barreiro, et F. J. Ares-Pena. 2009. The Action of Pulse-Modulated GSM Radiation Increases Regional Changes in Brain Activity and c-Fos Expression in Cortical and Subcortical Areas in a Rat Model of Picrotoxin-Induced Seizure Proneness. *Journal of Neuroscience Research* 87 (6): 1484-99.

Loughran, S. P., D. C. Benz, M. R. Schmid, M. Murbach, N. Kuster, et P. Achermann. 2013. No Increased Sensitivity in Brain Activity of Adolescents Exposed to Mobile Phone-like Emissions. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 124 (7): 1303-8.

Loughran, Sarah P., Raymond J. McKenzie, Melinda L. Jackson, Mark E. Howard, et Rodney J. Croft. 2012. Individual Differences in the Effects of Mobile Phone Exposure on Human Sleep: Rethinking the Problem. *Bioelectromagnetics* 33 (1): 86-93.

Loughran, Sarah P., Andrew W. Wood, Julie M. Barton, Rodney J. Croft, Bruce Thompson, et Con Stough. 2005. The Effect of Electromagnetic Fields Emitted by Mobile Phones on Human Sleep. *Neuroreport* 16 (17): 1973-76.

Loureiro, Michaël, Thibault Cholvin, Joëlle Lopez, Nicolas Merienne, Asma Latreche, Brigitte Cosquer, Karine Geiger, Christian Kelche, Jean-Christophe Cassel, et Anne Pereira de Vasconcelos. 2012. The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *The*

Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 32 (29): 9947-59.

Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biology* 15 (12): 550.

Lu, Yonghui, Shangcheng Xu, Mindi He, Chunhai Chen, Lei Zhang, Chuan Liu, Fang Chu, Zhengping Yu, Zhou Zhou, et Min Zhong. 2012. Glucose Administration Attenuates Spatial Memory Deficits Induced by Chronic Low-Power-Density Microwave Exposure. *Physiology & Behavior* 106 (5): 631-37.

Lundblad, J. R., R. P. Kwok, M. E. Laurance, M. L. Harter, et R. H. Goodman. 1995. Adenoviral E1A-Associated Protein P300 as a Functional Homologue of the Transcriptional Co-Activator CBP. *Nature* 374 (6517): 85-88.

Lüscher, Christian, et Robert C. Malenka. 2012. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (6).

Lustenberger, Caroline, Manuel Murbach, Roland Dürr, Marc Ralph Schmid, Niels Kuster, Peter Achermann, et Reto Huber. 2013. Stimulation of the Brain with Radiofrequency Electromagnetic Field Pulses Affects Sleep-Dependent Performance Improvement. *Brain Stimulation* 6 (5): 805-11.

Lustenberger, Caroline, Manuel Murbach, Laura Tüshaus, Flavia Wehrle, Niels Kuster, Peter Achermann, et Reto Huber. 2015. Inter-Individual and Intra-Individual Variation of the Effects of Pulsed RF EMF Exposure on the Human Sleep EEG. *Bioelectromagnetics* 36 (3): 169-77.

Lynch, M A. 2004. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev* 84: 50.

Lyons, Michelle R., et Anne E. West. 2011. Mechanisms of Specificity in Neuronal Activity-Regulated Gene Transcription. *Progress in Neurobiology* 94 (3): 259-95.

Maaroufi, Karima, Laurence Had-Aissouni, Christophe Melon, Mohsen Sakly, Hafedh Abdelmelek, Bruno Poucet, et Etienne Save. 2014. Spatial Learning, Monoamines and Oxidative Stress in Rats Exposed to 900MHz Electromagnetic Field in Combination with Iron Overload. *Behavioural Brain Research* 258 (janvier): 80-89.

Maguire, Eleanor A., et Christopher D. Frith. 2003. Lateral Asymmetry in the Hippocampal Response to the Remoteness of Autobiographical Memories. *Journal of Neuroscience* 23 (12): 5302-7.

Maguire, Eleanor A, et Christopher D Frith. 2004. The brain network associated with acquiring semantic knowledge. *NeuroImage* 22 (1): 171-78.

Malleret, Gaël, Juan M. Alarcon, Guillaume Martel, Shuichi Takizawa, Svetlana Vronskaya, Deqi Yin, Irene Z. Chen, Eric R. Kandel, et Gleb P. Shumyatsky. 2010. Bidirectional Regulation of Hippocampal Long-Term Synaptic Plasticity and Its Influence on Opposing Forms of Memory. *Journal of Neuroscience* 30 (10): 3813-25.

Marr, D. 1970. A Theory for Cerebral Neocortex. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 176 (1043): 161-234.

Marr, D. 1971. Simple Memory: A Theory for Archicortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 262 (841): 23-81.

Mausset, A. L., R. de Seze, F. Montpeyroux, et A. Privat. 2001. Effects of Radiofrequency Exposure on the GABAergic System in the Rat Cerebellum: Clues from Semi-Quantitative Immunohistochemistry. *Brain Research* 912 (1): 33-46.

Mausset-Bonnefont, Anne-Laure, Hélène Hirbec, Xavier Bonnefont, Alain Privat, Jacques Vignon, et René de Sèze. 2004. Acute Exposure to GSM 900-MHz Electromagnetic Fields Induces Glial Reactivity and Biochemical Modifications in the Rat Brain. *Neurobiology of Disease* 17 (3): 445-54.

Maxwell, James Clerk. 1865. VIII. A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 155 (janvier): 459-512.

McCain, Jack. 2013. The MAPK (ERK) Pathway. *Pharmacy and Therapeutics* 38 (2): 96-108.

McNamee, J. P., et V. Chauhan. 2009. Radiofrequency Radiation and Gene/Protein Expression: A Review. *Radiation Research* 172 (3): 265-87.

McNamee, James P., Pascale V. Bellier, Anne T. M. Konkle, Reuben Thomas, Siriwat Wasoontarajaroen, Eric Lemay, et Greg B. Gajda. 2016. Analysis of Gene Expression in Mouse Brain Regions after Exposure to 1.9 GHz Radiofrequency Fields. *International Journal of Radiation Biology* 92 (6): 338-50.

Meffert, Mollie K., et David Baltimore. 2005. Physiological Functions for Brain NF-KappaB. *Trends in Neurosciences* 28 (1): 37-43.

Meffert, Mollie K., Jolene M. Chang, Brian J. Wiltgen, Michael S. Fanselow, et David Baltimore. 2003. NF-Kappa B Functions in Synaptic Signaling and Behavior. *Nature Neuroscience* 6 (10): 1072-78.

Messaoudi, Hafawa, et Taoufik Aguili. 2018. Modulation of the Antenna-Head Interaction inside a Closed Environment Using MOM-GEC Method 33 (4): 7.

Miller, Courtney A., Susan L. Campbell, et J. David Sweatt. 2008. DNA Methylation and Histone Acetylation Work in Concert to Regulate Memory Formation and Synaptic Plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory* 89 (4): 599-603.

Miller, Courtney A., et J. David Sweatt. 2007. Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron* 53 (6): 857-69.

Miller, G. A. 1956. The Magical Number Seven plus or Minus Two: Some Limits on Our Capacity for Processing Information. *Psychological Review* 63 (2): 81-97.

Minatohara, Keiichiro, Mika Akiyoshi, et Hiroyuki Okuno. 2016. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (janvier).

Moreira, Pedro Silva, Pedro R. Almeida, Hugo Leite-Almeida, Nuno Sousa, et Patrício Costa. 2016. Impact of Chronic Stress Protocols in Learning and Memory in Rodents: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 11 (9): e0163245.

Morris, Richard. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11 (1): 47-60.

Moser, Edvard I., Emilio Kropff, et May-Britt Moser. 2008. Place Cells, Grid Cells, and the Brain's Spatial Representation System. *Annual Review of Neuroscience* 31: 69-89.

Muller, Robert. 1996. A Quarter of a Century of Place Cells. *Neuron* 17 (5): 813-22.

Nabavi, Sadegh, Rocky Fox, Christophe D. Proulx, John Y. Lin, Roger Y. Tsien, et Roberto Malinow. 2014. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511 (7509): 348-52.

Nadel, L., A. Hupbach, R. Gomez, et K. Newman-Smith. 2012. Memory Formation, Consolidation and Transformation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36 (7): 1640-45.

Nadel, Lynn, et Oliver Hardt. 2011. Update on Memory Systems and Processes. *Neuropsychopharmacology* 36 (1): 251-73.

Nadel, Lynn, et Morris Moscovitch. 1997. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology* 7 (2): 217-27.

Narayanan, Sareesh Naduvil, Raju Suresh Kumar, Kalesh M. Karun, Satheesha B. Nayak, et P. Gopalakrishna Bhat. 2015. Possible Cause for Altered Spatial Cognition of Prepubescent Rats Exposed to Chronic Radiofrequency Electromagnetic Radiation. *Metabolic Brain Disease* 30 (5): 1193-1206.

Narayanan, Sareesh Naduvil, Raju Suresh Kumar, Jaijesh Paval, Vivekananda Kedage, M. Shankaranarayana Bhat, Satheesha Nayak, et P. Gopalakrishna Bhat. 2013. Analysis of Emotionality and Locomotion in Radio-Frequency Electromagnetic Radiation Exposed Rats. *Neurological Sciences* 34 (7): 1117-24.

Narayanan, Sareesh Naduvil, Raju Suresh Kumar, Bhagath Kumar Potu, Satheesha Nayak, et Maneesh Mailankot. 2009. Spatial Memory Perfomance of Wistar Rats Exposed to Mobile Phone. *Clinics* 64 (3).

Narayanan, Sareesh Naduvil, Nirupam Mohapatra, Pamala John, Nalini K, Raju Suresh Kumar, Satheesha B. Nayak, et P. Gopalakrishna Bhat. 2018. Radiofrequency Electromagnetic Radiation Exposure Effects on Amygdala Morphology, Place Preference Behavior and Brain Caspase-3 Activity in Rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 58 (mars): 220-29.

Nisbet, H. Ozlem, Aysegul Akar, Cevat Nisbet, M. Yavuz Gulbahar, Ahmet Ozak, Cenk Yardimci, et Selcuk Comlekci. 2016. Effects of Electromagnetic Field (1.8/0.9 GHz) Exposure on Growth Plate in Growing Rats. *Research in Veterinary Science* 104 (février): 24-29.

Nittby, Henrietta, Arne Brun, Jacob Eberhardt, Lars Malmgren, Bertil R. R. Persson, et Leif G. Salford. 2009. Increased Blood-Brain Barrier Permeability in Mammalian Brain 7 Days after Exposure to the Radiation from a GSM-900 Mobile Phone. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* 16 (2-3): 103-12.

Nittby, Henrietta, Arne Brun, Susanne Strömblad, Mehri Kaviani Moghadam, Wenjun Sun, Lars Malmgren, Jacob Eberhardt, Bertil R. Persson, et Leif G. Salford. 2011. Nonthermal GSM RF and ELF EMF Effects upon Rat BBB Permeability. *The Environmentalist* 31 (2): 140-48.

Ohtani, Shin, Akira Ushiyama, Machiko Maeda, Kenji Hattori, Naoki Kunugita, Jianqing Wang, et Kazuyuki Ishii. 2016. Exposure Time-Dependent Thermal

Effects of Radiofrequency Electromagnetic Field Exposure on the Whole Body of Rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 41 (5): 655-66.

O'Keefe, J., et J. Dostrovsky. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34 (1): 171-75.

O'Keefe, John, et Lynn Nadel. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford : New York: Clarendon Press ; Oxford University Press.

Olton, D. S. 1979. Mazes, Maps, and Memory. *The American Psychologist* 34 (7): 583-96.

Orphanides, George, et Danny Reinberg. 2002. A Unified Theory of Gene Expression. *Cell* 108 (4): 439-51.

Paffi, A., F. Apollonio, M. G. Puxeddu, M. Parazzini, G. d'Inzeo, P. Ravazzani, et M. Liberti. 2013. A Numerical Study to Compare Stimulations by Intraoperative Microelectrodes and Chronic Macroelectrodes in the DBS Technique. *BioMed Research International* 2013.

Pang, Petti T., et Bai Lu. 2004. Regulation of Late-Phase LTP and Long-Term Memory in Normal and Aging Hippocampus: Role of Secreted Proteins TPA and BDNF. *Ageing Research Reviews* 3 (4): 407-30.

Paparini, A., P. Rossi, G. Gianfranceschi, V. Brugaletta, R. Falsaperla, P. De Luca, et V. Romano Spica. 2008. No Evidence of Major Transcriptional Changes in the Brain of Mice Exposed to 1800 MHz GSM Signal. *Bioelectromagnetics* 29 (4): 312-23.

Peebles, Carol L., Jong Yoo, Myo T. Thwin, Jorge J. Palop, Jeffrey L. Noebels, et Steven Finkbeiner. 2010. Arc Regulates Spine Morphology and Maintains Network Stability in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (42): 18173-78.

Pelletier, Amandine, Stéphane Delanaud, Pauline Décima, Gyorgy Thuroczy, René de Seze, Matteo Cerri, Véronique Bach, Jean-Pierre Libert, et Nathalie Loos. 2013. Effects of Chronic Exposure to Radiofrequency Electromagnetic Fields on Energy Balance in Developing Rats. *Environmental Science and Pollution Research International* 20 (5): 2735-46.

Penke, Zsuzsa, Carine Chagneau, et Serge Laroche. 2011. Contribution of Egr1/Zif268 to Activity-Dependent Arc/Arg3.1 Transcription in the Dentate Gyrus and Area CA1 of the Hippocampus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5: 48.

Penke, Zsuzsa, Elise Morice, Alexandra Veyrac, Alexandra Gros, Carine Chagneau, Pascale LeBlanc, Nathalie Samson, Karsten Baumgärtel, Isabelle M. Mansuy, Sabrina Davis, et Serge Laroche. 2014. Zif268/Egr1 Gain of Function Facilitates Hippocampal Synaptic Plasticity and Long-Term Spatial Recognition Memory. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369 (1633): 20130159.

Persson, Bertil R.R., Jacob Eberhardt, Lars Malmgren, Mikael B Persson, Arne Brun, et Leif G Salford. 2005. Effects of Microwaves from GSM Mobile Phones on the Blood-Brain Barrier and Neurons in Rat Brain. *PIERS Online* 1 (6): 638-41.

Petitdant, Nicolas, Anthony Lecomte, Franck Robidel, Christelle Gamez, Kelly Blazy, et Anne-Sophie Villégier. 2016. Cerebral Radiofrequency Exposures during Adolescence: Impact on Astrocytes and Brain Functions in Healthy and Pathologic Rat Models: Adolescent GSM Exposure in Fragile Organisms. *Bioelectromagnetics* 37 (5): 338-50.

Petitdant, Nicolas, Anthony Lecomte, Franck Robidel, Christelle Gamez, Kelly Blazy, et Anne-Sophie Villégier. 2018. Alteration of Adaptive Behaviors of Progeny after Maternal Mobile Phone Exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, février.

Poulletier de Gannes, Florence, Hiroshi Masuda, Bernard Billaudel, Emmanuelle Poque-Haro, Annabelle Hurtier, Philippe Lévêque, Gilles Ruffié, Murielle Taxile, Bernard Veyret, et Isabelle Lagroye. 2017. Effects of GSM and UMTS Mobile Telephony Signals on Neuron Degeneration and Blood-Brain Barrier Permeation in the Rat Brain. *Scientific Reports* 7 (1): 15496.

Preece, A. W., S. Goodfellow, M. G. Wright, S. R. Butler, E. J. Dunn, Y. Johnson, T. C. Manktelow, et K. Wesnes. 2005. Effect of 902 MHz Mobile Phone Transmission on Cognitive Function in Children. *Bioelectromagnetics* Suppl 7: S138-143.

Prochnow, Nora, Tina Gebing, Kerstin Ladage, Dorothee Krause-Finkeldey, Abdessamad El Ouardi, Andreas Bitz, Joachim Streckert, Volkert Hansen, et Rolf Dermietzel. 2011. Electromagnetic Field Effect or Simply Stress? Effects of UMTS Exposure on Hippocampal Longterm Plasticity in the Context of Procedure Related Hormone Release. Édité par Sven G. Meuth. *PLoS ONE* 6 (5): e19437.

Qiao, Simo, Ruiyun Peng, Haitao Yan, Yabing Gao, Changzhen Wang, Shuiming Wang, Yong Zou, Xinping Xu, Li Zhao, Ji Dong, Zhentao Su, Xinxin Feng, Lifeng Wang, et Xiangjun Hu. 2014. Reduction of Phosphorylated Synapsin I (Ser-553) Leads to Spatial Memory Impairment by Attenuating GABA Release after Microwave Exposure in Wistar Rats. *PloS One* 9 (4): e95503.

Razavinasab, Moazamehosadat, Kasra Moazzami, et Mohammad Shabani. 2014. Maternal Mobile Phone Exposure Alters Intrinsic Electrophysiological Properties of CA1 Pyramidal Neurons in Rat Offspring. *Toxicology and Industrial Health* 32 (6): 968-79.

Regel, Sabine J., Julie M. Gottselig, Jürgen Schuderer, Gilberte Tinguely, Julia V. Rétey, Niels Kuster, Hans-Peter Landolt, et Peter Achermann. 2007. Pulsed Radio Frequency Radiation Affects Cognitive Performance and the Waking Electroencephalogram. *Neuroreport* 18 (8): 803-7.

Regel, Sabine J., Gilberte Tinguely, Jürgen Schuderer, Martin Adam, Niels Kuster, Hans-Peter Landolt, et Peter Achermann. 2007. Pulsed Radio-Frequency Electromagnetic Fields: Dose-Dependent Effects on Sleep, the Sleep EEG and Cognitive Performance. *Journal of Sleep Research* 16 (3): 253-58.

Reiser, H., W. Dimpfel, et F. Schober. 1995. The Influence of Electromagnetic Fields on Human Brain Activity. *European Journal of Medical Research* 1 (1): 27-32.

Richard, Patricia, et James L. Manley. 2009. Transcription Termination by Nuclear RNA Polymerases. *Genes & Development* 23 (11): 1247-69.

Roeder, R. G. 1996. The Role of General Initiation Factors in Transcription by RNA Polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences* 21 (9): 327-35.

Roggeveen, Suzanne, Jim van Os, Wolfgang Viechtbauer, et Richel Lousberg. 2015. EEG Changes Due to Experimentally Induced 3G Mobile Phone Radiation. *PloS One* 10 (6): e0129496.

Rongen, Eric van, Rodney Croft, Jukka Juutilainen, Isabelle Lagroye, Junji Miyakoshi, Richard Saunders, René de Seze, Thomas Tenforde, Luc Verschaeve, Bernard Veyret, et Zhengping Xu. 2009. Effects of Radiofrequency Electromagnetic Fields on the Human Nervous System. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 12 (8): 572-97.

Röschke, J., et K. Mann. 1997. No Short-Term Effects of Digital Mobile Radio Telephone on the Awake Human Electroencephalogram. *Bioelectromagnetics* 18 (2): 172-76.

Rose, J. E., et C. N. Woolsey. 1948. The Orbitofrontal Cortex and Its Connections with the Mediodorsal Nucleus in Rabbit, Sheep and Cat. *Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 27 (1 vol.): 210-32.

Rosenthal, Susan L., Kathleen D. Schmid, et Maureen M. Black. 1989. Stress and Coping in a NICU. *Research in Nursing & Health* 12 (4): 257-65.

Sahoo, Sidhartha Sankar, Malaya Kumar Hota, et Kalyan Kumar Barik. 2014. 5G network a new look into the future: Beyond all generation networks. *American Journal of Systems and Software* 2 (4): 108–112.

Sakamoto, Masayuki, Ryoichiro Kageyama, et Itaru Imayoshi. 2014. The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neuroscience* 8 (mai).

Salford, L. G., A. Brun, K. Sturesson, J. L. Eberhardt, et B. R. Persson. 1994. Permeability of the Blood-Brain Barrier Induced by 915 MHz Electromagnetic Radiation, Continuous Wave and Modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microscopy Research and Technique* 27 (6): 535-42.

Salles, Angeles, Maria del C. Krawczyk, Mariano Blake, Arturo Romano, Mariano M. Boccia, et Ramiro Freudenthal. 2017. Requirement of NF-kappa B Activation in Different Mice Brain Areas during Long-Term Memory Consolidation in Two Contextual One-Trial Tasks with Opposing Valences. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (avril).

Sargolini, Francesca, Marianne Fyhn, Torkel Hafting, Bruce L. McNaughton, Menno P. Witter, May-Britt Moser, et Edvard I. Moser. 2006. Conjunctive Representation of Position, Direction, and Velocity in Entorhinal Cortex. *Science (New York, N.Y.)* 312 (5774): 758-62.

Schmid, Marc R., Manuel Murbach, Caroline Lustenberger, Micheline Maire, Niels Kuster, Peter Achermann, et Sarah P. Loughran. 2012. Sleep EEG Alterations: Effects of Pulsed Magnetic Fields versus Pulse-Modulated Radio Frequency Electromagnetic Fields. *Journal of Sleep Research* 21 (6): 620-29.

Scoville, WIilliam Beecher, et Brenda Milner. 1957. Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions, 11.

Sekeres, Melanie J., Gordon Winocur, et Morris Moscovitch. 2018. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. *Neuroscience Letters*, New Perspectives on the Hippocampus and Memory, 680 (juillet): 39-53.

Selcher, Joel C., Edwin J. Weeber, Jill Christian, Tanya Nekrasova, Gary E. Landreth, et J. David Sweatt. 2003. A Role for ERK MAP Kinase in Physiologic Temporal Integration in Hippocampal Area CA1. *Learning & Memory* 10 (1): 26-39.

Semon, Richard Wolfgang. 1921. *The Mneme*. London : Allen & Unwin.

Shahin, Saba, Somanshu Banerjee, Surya Pal Singh, et Chandra Mohini Chaturvedi. 2015. 2.45 GHz Microwave Radiation Impairs Learning and Spatial Memory via Oxidative/Nitrosative Stress Induced P53-Dependent/Independent Hippocampal Apoptosis: Molecular Basis and Underlying Mechanism. *Toxicological Sciences* 148 (2): 380-99.

Shahin, Saba, Somanshu Banerjee, Vivek Swarup, Surya Pal Singh, et Chandra Mohini Chaturvedi. 2018. From the Cover: 2.45-GHz Microwave Radiation Impairs Hippocampal Learning and Spatial Memory: Involvement of Local Stress Mechanism-Induced Suppression of IGluR/ERK/CREB Signaling. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 161 (2): 349-74.

Sheng, Morgan, et Michael E. Greenberg. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4 (4): 477-85.

Shirai, Tomoyuki, Norio Imai, Jianqing Wang, Satoru Takahashi, Mayumi Kawabe, Kanako Wake, Hiroki Kawai, So-Ichi Watanabe, Fumio Furukawa, et Osamu Fujiwara. 2014. Multigenerational Effects of Whole Body Exposure to 2.14 GHz W-CDMA Cellular Phone Signals on Brain Function in Rats. *Bioelectromagnetics* 35 (7): 497-511.

Sienkiewicz, Z. J., R. P. Blackwell, R. G. Haylock, R. D. Saunders, et B. L. Cobb. 2000. Low-Level Exposure to Pulsed 900 MHz Microwave Radiation Does Not Cause Deficits in the Performance of a Spatial Learning Task in Mice. *Bioelectromagnetics* 21 (3): 151-58.

Simunic, Dina, Paul Wach, Werner Renhart, et Rudolf Stollberger. 1996. Spatial distribution of high-frequency electromagnetic energy in human head during MRI: numerical results and measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 43 (1): 88.

Smart, Trevor G., et Pierre Paoletti. 2012. Synaptic Neurotransmitter-Gated Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, janvier, a009662.

Smith, Mary Lou, et Brenda Milner. 1981. The role of the right hippocampus in the recall of spatial location. *Neuropsychologia* 19 (6): 781-93.

Smrt, Richard D., et Xinyu Zhao. 2010. Epigenetic Regulation of Neuronal Dendrite and Dendritic Spine Development. *Frontiers in Biology* 5 (4): 304-23.

Snow, Wanda M., Chris Cadonic, Claudia Cortes-Perez, Subir K. Roy Chowdhury, Jelena Djordjevic, Ella Thomson, Michael J. Bernstein, Miyoung Suh, Paul Fernyhough, et Benedict C. Albensi. 2018. Chronic Dietary Creatine Enhances Hippocampal-Dependent Spatial Memory, Bioenergetics, and Levels of Plasticity-

Related Proteins Associated with NF-KB. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 25 (2): 54-66.

Solstad, Trygve, Charlotte N. Boccara, Emilio Kropff, May-Britt Moser, et Edvard I. Moser. 2008. Representation of Geometric Borders in the Entorhinal Cortex. *Science (New York, N.Y.)* 322 (5909): 1865-68.

Son, Yeonghoon, Ye Ji Jeong, Jong Hwa Kwon, Hyung-Do Choi, Jeong-Ki Pack, Nam Kim, Yun-Sil Lee, et Hae-June Lee. 2015. The Effect of Sub-Chronic Whole-Body Exposure to a 1,950 MHz Electromagnetic Field on the Hippocampus in the Mouse Brain. *Journal of Electromagnetic Engineering and Science* 15 (3): 151-57.

Son, Yeonghoon, Ye Ji Jeong, Jong Hwa Kwon, Hyung-Do Choi, Jeong-Ki Pack, Nam Kim, Yun-Sil Lee, et Hae-June Lee. 2016. 1950 MHz Radiofrequency Electromagnetic Fields Do Not Aggravate Memory Deficits in 5xFAD Mice: RF Does Not Induce Memory Impairment. *Bioelectromagnetics* 37 (6): 391-99.

Son, Yeonghoon, Jin Su Kim, Ye Ji Jeong, Youn Kyoung Jeong, Jong Hwa Kwon, Hyung-Do Choi, Jeong-Ki Pack, Nam Kim, Yun-Sil Lee, et Hae-June Lee. 2018. Long-Term RF Exposure on Behavior and Cerebral Glucose Metabolism in 5xFAD Mice. *Neuroscience Letters* 666 (février): 64-69.

Squire, Larry R. 1992. Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans, 37.

Squire, Larry R. 2009. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron* 61 (1): 6-9.

Sultan, Faraz A., Jing Wang, Jennifer Tront, Dan A. Liebermann, et J. David Sweatt. 2012. Genetic Deletion of Gadd45b, a Regulator of Active DNA Demethylation, Enhances Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience* 32 (48): 17059-66.

Swaminathan, Amrutha, Manoj Kumar, Sarmistha Halder Sinha, Anne Schneider-Anthony, Anne-Laurence Boutillier, et Tapas K Kundu. 2014. Modulation of Neurogenesis by Targeting Epigenetic Enzymes Using Small Molecules: An Overview. *ACS Chemical Neuroscience* 5 (12): 1164-77.

Tan, Shengzhi, Hui Wang, Xinping Xu, Li Zhao, Jing Zhang, Ji Dong, Binwei Yao, Haoyu Wang, Hongmei Zhou, Yabing Gao, et Ruiyun Peng. 2017. Study on Dose-Dependent, Frequency-Dependent, and Accumulative Effects of 1.5 GHz and 2.856 GHz Microwave on Cognitive Functions in Wistar Rats. *Scientific Reports* 7 (1): 10781.

Tang, Jun, Yuan Zhang, Liming Yang, Qianwei Chen, Liang Tan, Shilun Zuo, Hua Feng, Zhi Chen, et Gang Zhu. 2015. Exposure to 900MHz Electromagnetic Fields Activates the Mkp-1/ERK Pathway and Causes Blood-Brain Barrier Damage and Cognitive Impairment in Rats. *Brain Research* 1601 (mars): 92-101.

Taube, J. S., et R. U. Muller. 1998. Comparisons of Head Direction Cell Activity in the Postsubiculum and Anterior Thalamus of Freely Moving Rats. *Hippocampus* 8 (2): 87-108.

Taube, J. S., R. U. Muller, et J. B. Ranck. 1990. Head-Direction Cells Recorded from the Postsubiculum in Freely Moving Rats. I. Description and Quantitative Analysis. *Journal of Neuroscience* 10 (2): 420-35.

Terro, Faraj, Amandine Magnaudeix, Marion Crochetet, Ludovic Martin, Sylvie Bourthoumieu, Cornelia-M. Wilson, Catherine Yardin, et Philippe Leveque. 2012. GSM-900MHz at Low Dose Temperature-Dependently Downregulates α-Synuclein in Cultured Cerebral Cells Independently of Chaperone-Mediated-Autophagy. *Toxicology* 292 (2-3): 136-44.

Thiels, Edda, Beatriz I. Kanterewicz, Eric D. Norman, James M. Trzaskos, et Eric Klann. 2002. Long-Term Depression in the Adult Hippocampus in Vivo Involves Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Phosphorylation of Elk-1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (6): 2054-62.

Thomas, Gareth M., et Richard L. Huganir. 2004. MAPK Cascade Signalling and Synaptic Plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience* 5 (3): 173-83.

Traynelis, Stephen F., Lonnie P. Wollmuth, Chris J. McBain, Frank S. Menniti, Katie M. Vance, Kevin K. Ogden, Kasper B. Hansen, Hongjie Yuan, Scott J. Myers, et Ray Dingledine. 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* 62 (3): 405-96.

Trifilieff, Pierre, Ludovic Calandreau, Cyril Herry, Nicole Mons, et Jacques Micheau. 2007. Biphasic ERK1/2 activation in both the hippocampus and amygdala may reveal a system consolidation of contextual fear memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 88 (4): 424-34.

Trifilieff, Pierre, Cyril Herry, Peter Vanhoutte, Jocelyne Caboche, Aline Desmedt, Gernot Riedel, Nicole Mons, et Jacques Micheau. 2006. Foreground Contextual Fear Memory Consolidation Requires Two Independent Phases of Hippocampal ERK/CREB Activation. *Learning & Memory* 13 (3): 349-58.

Tsurita, G., H. Nagawa, S. Ueno, S. Watanabe, et M. Taki. 2000. Biological and Morphological Effects on the Brain after Exposure of Rats to a 1439 MHz TDMA Field. *Bioelectromagnetics* 21 (5): 364-71.

Tulving, Endel. 1985. How many memory systems are there? *American psychologist* 40 (4): 385.

Tulving, Endel, et Martin Lepage. 2000. Where in the brain is the awareness of one's past? In *Memory, brain, and belief*, 208-28. Cambridge, MA, US: Harvard University Press.

Tulving, Endel, et Hans J. Markowitsch. 1998. Episodic and Declarative Memory: Role of the Hippocampus. *Hippocampus* 8 (3): 198-204.

Ushiyama, Akira, Shin Ohtani, Machiko Maeda, Kenji Hattori, Naoki Kunugita, Jianqing Wang, et Kazuyuki Ishii. 2014. Effects of the exposure of 2.14GHz W-CDMA radiofrequency electromagnetic fields to rats on body temperature increase and heat shock proteins expression. In *2014 XXXIth URSI General Assembly and Scientific Symposium (URSI GASS)*, 1-3. Beijing, China: IEEE.

Vecchio, Fabrizio, Claudio Babiloni, Florinda Ferreri, Paola Buffo, Giuseppe Cibelli, Giuseppe Curcio, Sven van Dijkman, Jean-Marc Melgari, Federica Giambattistelli, et Paolo Maria Rossini. 2010. Mobile Phone Emission Modulates Inter-Hemispheric Functional Coupling of EEG Alpha Rhythms in Elderly Compared to Young Subjects. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 121 (2): 163-71.

Vecchio, Fabrizio, Claudio Babiloni, Florinda Ferreri, Giuseppe Curcio, Rita Fini, Claudio Del Percio, et Paolo Maria Rossini. 2007. Mobile Phone Emission Modulates Interhemispheric Functional Coupling of EEG Alpha Rhythms. *European Journal of Neuroscience* 25 (6): 1908-13.

Verrender, Adam, Sarah P. Loughran, Anna Dalecki, Ray McKenzie, et Rodney J. Croft. 2016. Pulse Modulated Radiofrequency Exposure Influences Cognitive Performance. *International Journal of Radiation Biology* 92 (10): 603-10.

Vertes, Robert P. 2002. Analysis of Projections from the Medial Prefrontal Cortex to the Thalamus in the Rat, with Emphasis on Nucleus Reuniens. *The Journal of Comparative Neurology* 442 (2): 163-87.

Vertes, Robert P. 2004. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse (New York, N.Y.)* 51 (1): 32-58.

Vertes, Robert P. 2006. Interactions among the Medial Prefrontal Cortex, Hippocampus and Midline Thalamus in Emotional and Cognitive Processing in the Rat. *Neuroscience* 142 (1): 1-20.

Vigil, Fabio Antonio, Keiko Mizuno, Walter Lucchesi, Victoria Valls-Comamala, et Karl Peter Giese. 2017. Prevention of Long-Term Memory Loss after Retrieval by an Endogenous CaMKII Inhibitor. *Scientific Reports* 7 (1): 4040.

Vigil, Fabio, Keiko Mizuno, Walter Lucchesi, Victòria Valls-Comamala, et Giese Peter. 2014. The roles of endogenous CaMKII inhibitors in learning and memory. *Frontiers in Systems Neuroscience* 8 (mars).

Vorobyov, V., V. Pesić, B. Janać, et Z. Prolić. 2004. Repeated Exposure to Low-Level Extremely Low Frequency-Modulated Microwaves Affects Baseline and Scopolamine-Modified Electroencephalograms in Freely Moving Rats. *International Journal of Radiation Biology* 80 (9): 691-98.

Vorobyov, V. V., A. A. Galchenko, N. I. Kukushkin, et I. G. Akoev. 1997. Effects of Weak Microwave Fields Amplitude Modulated at ELF on EEG of Symmetric Brain Areas in Rats. *Bioelectromagnetics* 18 (4): 293-98.

Vorobyov, Vasily, Branka Janać, Vesna Pesić, et Zlatko Prolić. 2010. Repeated Exposure to Low-Level Extremely Low Frequency-Modulated Microwaves Affects Cortex-Hypothalamus Interplay in Freely Moving Rats: EEG Study. *International Journal of Radiation Biology* 86 (5): 376-83.

Wagner, P., J. Röschke, K. Mann, J. Fell, W. Hiller, C. Frank, et M. Grözinger. 2000. Human Sleep EEG under the Influence of Pulsed Radio Frequency Electromagnetic Fields. Results from Polysomnographies Using Submaximal High Power Flux Densities. *Neuropsychobiology* 42 (4): 207-12.

Wagner, P., J. Röschke, K. Mann, W. Hiller, et C. Frank. 1998. Human Sleep under the Influence of Pulsed Radiofrequency Electromagnetic Fields: A Polysomnographic Study Using Standardized Conditions. *Bioelectromagnetics* 19 (3): 199-202.

Walf, Alicia A, et Cheryl A Frye. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols* 2 (2): 322-28.

Wang, B., et H. Lai. 2000. Acute Exposure to Pulsed 2450-MHz Microwaves Affects Water-Maze Performance of Rats. *Bioelectromagnetics* 21 (1): 52-56.

Wang, Hui, Ruiyun Peng, Hongmei Zhou, Shuiming Wang, Yabing Gao, Lifeng Wang, Zheng Yong, Hongyan Zuo, Li Zhao, Ji Dong, Xinping Xu, et Zhentao Su. 2013.

Impairment of Long-Term Potentiation Induction Is Essential for the Disruption of Spatial Memory after Microwave Exposure. *International Journal of Radiation Biology* 89 (12): 1100-1107.

Wang, Kai, Jun-Mei Lu, Zhen-He Xing, Qian-Ru Zhao, Lin-Qi Hu, Lei Xue, Jie Zhang, et Yan-Ai Mei. 2017. Effect of 1.8 GHz radiofrequency electromagnetic radiation on novel object associative recognition memory in mice. *Scientific Reports* 7 (mars): 44521.

Wang, Qiang, Zhao-jin Cao, et Xue-tao Bai. 2005. [Effect of 900Mhz electromagnetic fields on energy metabolism in postnatal rat cerebral cortical neurons]. *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research* 34 (2): 155-58.

Watilliaux, Aurélie, Jean-Marc Edeline, Philippe Lévêque, Thérèse M. Jay, et Michel Mallat. 2010. Effect of Exposure to 1,800 MHz Electromagnetic Fields on Heat Shock Proteins and Glial Cells in the Brain of Developing Rats. *Neurotoxicity Research* 20 (2): 109-19.

Williams, W. M., S. T. Lu, M. Del Cerro, et S. M. Michaelson. 1984. Effect of 2450 MHz Microwave Energy on the Blood-Brain Barrier to Hydrophilic Molecules. D. Brain Temperature and Blood-Brain Barrier Permeability to Hydrophilic Tracers. *Brain Research* 319 (2): 191-212.

Winocur, Gordon, Morris Moscovitch, R. Shayna Rosenbaum, et Melanie Sekeres. 2010. A Study of Remote Spatial Memory in Aged Rats. *Neurobiology of Aging* 31 (1): 143-50.

Wolffe, A. P., et M. A. Matzke. 1999. Epigenetics: Regulation through Repression. *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439): 481-86.

Xu, Shujun, Wei Ning, Zhengping Xu, Suya Zhou, Huai Chiang, et Jianhong Luo. 2006. Chronic Exposure to GSM 1800-MHz Microwaves Reduces Excitatory Synaptic Activity in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuroscience Letters* 398 (3): 253-57.

Yadamani, Samira, Ali Neamati, Masoud Homayouni-Tabrizi, S. Ali Beyramabadi, Soheyla Yadamani, Azar Gharib, Ali Morsali, et Maryam Khashi. 2018. Treatment of the Breast Cancer by Using Low Frequency Electromagnetic Fields and Mn(II) Complex of a Schiff Base Derived from the Pyridoxal. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 41 (octobre): 107-12.

Yamaguchi, Hironori, Giichirou Tsurita, Shoogo Ueno, Soichi Watanabe, Kanako Wake, Masao Taki, et Hirokazu Nagawa. 2003. 1439 MHz Pulsed TDMA Fields Affect Performance of Rats in a T-Maze Task Only When Body Temperature Is Elevated. *Bioelectromagnetics* 24 (4): 223-30.

Yilmaz, Fahri, Suleyman Dasdag, M. Zulkuf Akdag, et Nihal Kilinc. 2008. Whole-Body Exposure of Radiation Emitted from 900 MHz Mobile Phones Does Not Seem to Affect the Levels of Anti-Apoptotic Bcl-2 Protein. *Electromagnetic Biology and Medicine* 27 (1): 65-72.

Zhang, Jun-Ping, Ke-Ying Zhang, Ling Guo, Qi-Liang Chen, Peng Gao, Tian Wang, Jing Li, Guo-Zhen Guo, et Gui-Rong Ding. 2017. Effects of 1.8 GHz Radiofrequency Fields on the Emotional Behavior and Spatial Memory of Adolescent Mice. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (11).

Zhang, Yameng, Yan Zhang, Hejuan Yu, Yamin Yang, Weitao Li, et Zhiyu Qian. 2017. Theta-Gamma Coupling in Hippocampus during Working Memory Deficits Induced by Low Frequency Electromagnetic Field Exposure. *Physiology & Behavior* 179 (octobre): 135-42.

Zhang, Yanchun, Zhihui Li, Yan Gao, et Chenggang Zhang. 2015. Effects of Fetal Microwave Radiation Exposure on Offspring Behavior in Mice. *Journal of Radiation Research* 56 (2): 261-68.

Zhao, Ya Li, Ying Xian Li, Hong Bo Ma, Dong Li, Hai Liang Li, Rui Jiang, Guang Han Kan, Zhen Zhong Yang, et Zeng Xin Huang. 2015. The Screening of Genes Sensitive to Long-Term, Low-Level Microwave Exposure and Bioinformatic Analysis of Potential Correlations to Learning and Memory. *Biomedical and Environmental Sciences: BES* 28 (8): 558-70.

Université de Strasbourg

Aurélie BONELLI-SALVADORI

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Sensibilité aux ondes électromagnétiques (4G) du cerveau de rat à différents âges: impact sur la persistance d'un souvenir spatial et sur l'expression des gènes

Résumé

Avec l'avènement de la téléphonie et des réseaux mobiles, l'impact des radiofréquences (RF) sur la santé humaine est plus que jamais un sujet d'actualité. Les résultats des recherches Homme et animal restent controversés et ne permettent pas de conclusion définitive sur l'existence ou non d'effets des RF, notamment sur le cerveau.
Ainsi, nos résultats montrent que chez le rat, jeune, adulte et âgé, une exposition de 3 mois à un signal LTE 4G (900 MHz, 61V/m, DAS = 0,33 W/kg) n'a aucun effet sur l'apprentissage et la mémoire spatiale récente et ancienne, ni sur l'anxiété ou la locomotion. L'expression des gènes a été étudiée par séquençage haut débit des ARNm, en conditions "Basal" et "Apprentissage" dans l'hippocampe dorsal et le cortex préfrontal médian. Nos résultats montrent que des gènes appartenant à des regroupements fonctionnels spécifiques sont modulés en réponse à l'exposition aux RF dans l'hippocampe dorsal en condition "Basal" et dans le cortex préfrontal médian, pendant et suite à un apprentissage spatial. Cependant, il est important de noter que ces modulations génétiques n'impactent pas le rappel d'un souvenir récent ou ancien. En perspective, il sera important de connaître les possibles répercussions que ces régulations peuvent avoir à plus long terme sur le fonctionnement cérébral.

Mots clés : Radiofréquences, Rat, Mémoire spatiale à long terme, Expression des gènes, Gènes précoces, Hippocampe, Cortex préfrontal médian.

Summary

The increasing development of mobile phone technology and networks raises the question of the impact of electromagnetic fields in the radiofrequency range (RF) on human health and well-being. However, data from humans and animal scientific research remain controversial and do not allow to conclude about potential harmful effects of RF, particularly on the brain. Thus, our results showed that, in young, adult and aged rats, a chronic exposure (3 months) to a 4G LTE signal (900 MHz, SAR = 0.33 W/kg, 61V/m) had no impact on spatial learning and long-term memory, nor on anxiety and locomotion. Gene expression was studied using high throughput RNA sequencing in the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, both in "Basal" and "Learning" conditions. Our results show that some genes belonging to specific functional groups were modulated by RF in the dorsal hippocampus in "Basal" condition and, in the median prefrontal cortex during and after spatial learning. However, it is to note that these gene expression modulations have no impact on recent or remote memory. In perspective, it will be important to explore the potential effects of such changes in brain functioning.

Keywords: Radiofrequency, Rat, long-term spatial memory, Gene expression, immediate early genes, Hippocampus, Medial prefrontal cortex