



**HAL**  
open science

# Effets d'une exposition chronique aux ondes radiofréquences sur le système immunitaire et le sommeil, modèle de rat juvénile

Aymar Bosquillon de Jenlis

## ► To cite this version:

Aymar Bosquillon de Jenlis. Effets d'une exposition chronique aux ondes radiofréquences sur le système immunitaire et le sommeil, modèle de rat juvénile. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0012 . tel-03692096

**HAL Id: tel-03692096**

**<https://theses.hal.science/tel-03692096>**

Submitted on 9 Jun 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Thèse de Doctorat**  
*Mention Biologie-Santé*  
*Spécialité Physiologie intégrée*

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

**de l'Université de Picardie Jules Verne**

par

**Aymar BOSQUILLON de JENLIS**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Effets d'une exposition chronique aux ondes  
radiofréquences sur le système immunitaire et le sommeil,  
modèle de rat juvénile*

Soutenue le 1<sup>er</sup> octobre 2018 après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

<b>M. Didier MORIN</b>	<b>Professeur des Universités</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Yves LE DRÉAN</b>	<b>Maître de Conférences</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M<sup>me</sup> Karine SPIEGEL</b>	<b>Chargée de Recherche</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Jean-Michel MACRON</b>	<b>PU-PH</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>me</sup> Véronique BACH</b>	<b>Professeur des Universités</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M<sup>me</sup> Amandine PELLETIER</b>	<b>Maître de Conférences</b>	<b>Co-encadrant</b>



# REMERCIEMENTS

La finalisation de ce manuscrit indique la fin d'une expérience, la fin de trois années de travail sur un sujet passionnant. Je voudrais, avant de commencer, remercier les différents acteurs ayant contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

Je tiens dans un premier temps à remercier l'ensemble des membres du jury, Madame Karine Spiegel, Monsieur Didier Morin, Monsieur Yves Le Dréan et Monsieur Jean-Michel Macron qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Merci à eux d'avoir accepté d'être rapporteurs ou examinateurs de cette thèse.

Je remercie également le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour la bourse dont j'ai bénéficié et qui m'a permis de me lancer dans cette aventure amiénoise ainsi que de travailler dans la sérénité.

J'adresse toute ma gratitude à Véronique Bach pour m'avoir non seulement accueilli au sein du laboratoire PériTox mais également d'avoir accepté de m'encadrer. Je la remercie pour son enthousiasme scientifique, pour ses conseils, mais également pour sa disponibilité malgré ses nombreuses responsabilités.

Je remercie également Amandine Pelletier pour avoir proposé un sujet si intéressant et pour m'avoir encadré pendant ces trois ans. C'était une première expérience encadrant/encadré pour nous deux et celle-ci fut fort instructive.

Je remercie chaleureusement Flavia Del Vecchio, pour m'avoir guidé lors de mes premiers temps au laboratoire. « Grazie » pour tes conseils en expérimentation, en décodage... Merci pour nos soirées pizzas et nos longues conversations.

Merci à Louison Collet pour l'incroyable quantité de travail que nous avons réussi à abattre ensemble, et notamment les heures passées en cytométrie.

Merci à Stéphane Delanaud pour ses qualités en ... presque tout ce qui avait trait à la technique en fait ! Merci à notre « MacGyver » car on en aura vu des problèmes techniques. Merci également à Aurélie Corona qui a été ma « partner in crime », le temps passait ainsi plus vite lorsque nous chantions. Merci à Ludovic Didier pour ses conseils et son aide lors des expérimentations animales. Enfin merci à Christelle Gamez pour son aide lors de mes venues à l'INERIS.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire PériTox avec qui j'ai eu la chance d'interagir et de travailler et notamment les doctorants, dont Christelle, Dimitri, Stéphane et Fatima, mes colocataires de bureau, merci pour nos discussions scientifiques (ou non) et merci pour les fou-rires.

Merci aux nombreux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont contribué à l'analyse de certaines fonctions présentées ici.

A tous ces rats qui ont été utilisés pour le bien commun notamment « the escapee », « le klepto », « la vache », « le français et l'italien »...

Merci aux membres du département de SVT dans lequel j'ai pu enseigner pendant ces deux dernières années. Merci de m'avoir permis de transmettre et de m'avoir soutenu dans cette aventure.

Merci aux différents membres de la Commission Recherche de l'UPJV, ainsi que les membres du conseil de l'ED, conseils auxquels j'ai eu la chance d'appartenir. J'ai pu ainsi saisir les différents versants de la recherche et du fonctionnement de l'université.

Un grand merci aux anciens de l'EBI, Elise, Emeline, Maud, Pauline, merci pour vos soutiens scientifiques et personnels et ce malgré l'éloignement.

Merci à mes amis, amiénois, parisiens, français ou étrangers qui m'ont soutenu pendant ces trois années intenses.

Enfin je ne pourrai pas finir ces remerciements sans penser à mes frères, parents et grands-parents pour leur affection, leurs longs encouragements au téléphone et leur soutien infaillible même dans les périodes difficiles. Sans vous je n'aurai jamais pu arriver si loin. Jamais !

« Faire et défaire, c'est travailler »

## ABSTRACT

With the development of wireless technologies, electromagnetic fields became an important environmental constraint. However, some people attribute symptoms to electromagnetic fields exposure. The results of experimental studies remain controversial due to contradictory results. The aim of this work is to evaluate the effects of a co-exposure between electromagnetic fields and noise. The hypothesis is that co-exposure led to an exacerbation of the electromagnetic fields effects. This work focused on different physiological functions in a juvenile population: sleep, immune system, food intake, respiratory parameters and behavior. The results showed a higher anxious behavior, a decrease of locomotor parameters and an increase in the weight of the animals, associated with variations in the food intake pattern. Sleep is slightly altered in animals exposed to electromagnetic fields. The immune system of animals exposed to electromagnetic fields exhibits alterations in the adaptive immune system by a redistribution of lymphocyte subpopulations in favor of cell activation and humoral immunity, but without variation of the innate immune system. The alteration of immune system was observed during the co-exposure with a different way than noise exposure. This work was the first study to show a variation of immune parameters in juveniles chronically exposed to electromagnetic fields.

## RESUME

Avec le développement des nouvelles technologies, l'exposition aux champs électromagnétiques est de plus en plus importante. En marge de ce développement, nos sociétés ont vu émerger des personnes présentant des symptômes qu'ils attribuent à une exposition aux champs électromagnétiques. Les résultats des études expérimentales antérieures restant à controverse, l'objectif de ce travail est de voir si une exposition conjointe entre les champs électromagnétiques et le bruit conduit à une apparition ou une exacerbation des symptômes des champs électromagnétiques. Cette étude s'est portée sur différentes fonctions physiologiques chez une population juvénile : le sommeil, le système immunitaire, la prise alimentaire, la respiration et le comportement. Nos résultats montrent un comportement anxieux, une diminution de la locomotion ainsi qu'une augmentation du poids des animaux, associé à des variations dans le pattern alimentaire. Le sommeil et la respiration sont peu modifiés chez les animaux exposés aux champs électromagnétiques. Le système immunitaire des animaux exposés aux champs électromagnétiques présente des altérations au niveau du système immunitaire acquis avec une redistribution des sous-populations lymphocytaires en faveur d'une activation des cellules et de l'immunité humorale, mais sans variation du système immunitaire inné. L'altération de ce dernier système est observée lors de la co-exposition mais est différente de celle d'une exposition au bruit. Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence différents effets des CEM, notamment un comportement anxieux et des variations immunitaires.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- Article :
  - **Bosquillon de Jenlis A**, Del Vecchio F, Delanaud S, Gay J, Bach V, Pelletier A  
Impacts of chronic, high-level noise exposure on sleep and metabolic parameters: a juvenile rodent model  
(soumis à Environmental Health Perspectives)
- Communication orale :
  - **Bosquillon de Jenlis A.** & Collet L., Del Vecchio F., Delanaud S., Gubler B., Marolleau J-P., Bach V., Pelletier A  
Effets d'une perturbation du sommeil par une nuisance sonore sur le système immunitaire  
SFR Cap Santé – Reims – 31 mars 2017
  - Del Vecchio F., **Bosquillon de Jenlis A.**, Person C., de Seze R., Delanaud S., Bach V., Pelletier A  
Effects of low intensity radiofrequency electromagnetic fields on sleep: juvenile rat model  
International Pediatric Sleep Association – Tapei – 11-13 mars 2016.
  - Del Vecchio F., **Bosquillon de Jenlis A.**, Person C., de Seze R., Delanaud S., Bach V., Pelletier A  
Do rats avoid a radiofrequency electromagnetic fields exposed environment to sleep?  
European Sleep Research Society – Bâle – septembre 2018
  - Del Vecchio F., **Bosquillon de Jenlis A.**, Person C., de Seze R., Delanaud S., Bach V., Pelletier A  
Réponses physiologiques d'adaptation ou d'évitement du rat juvénile exposé aux ondes radiofréquences type antenne relais EVIREF  
ANSES 2017

- Poster :
  - **Bosquillon de Jenlis A.**, Del Vecchio F., Delanaud S., Ausseil J., Bach V., Pelletier A  
Effets d'une exposition chronique aux champs électromagnétiques et à une nuisance sonore sur l'homéostasie énergétique  
Journée amiénoise de la recherche en santé – Amiens – novembre 2017
  - **Bosquillon de Jenlis A.**, Del Vecchio F., Delanaud S., Bach V., Pelletier A  
Effects of chronic exposition to noise on homeostasis in juvenile rats  
International Pediatric Sleep Association – Paris – avril 2018
  - Del Vecchio F., **Bosquillon de Jenlis A.**, Person C., de Seze R., Delanaud S., Bach V., Pelletier A  
Behavioural effects of low intensity radiofrequency electromagnetic fields -  
European Sleep Research Society – Bologne – 13-16 septembre 2016
  - Martinez N., **Bosquillon de Jenlis A.**, Delanaud S., Bach V., Pelletier A  
Effets d'une exposition chronique aux ondes radiofréquences sur le comportement d'anxiété  
Journée amiénoise de la recherche en santé – Amiens – novembre 2017
  - Collet L, **Bosquillon de Jenlis A**, Naudot M, Bach V, Marolleau J-P, Pelletier A, Gubler B  
Effets d'une exposition chronique aux champs électromagnétiques à hautes fréquences sur l'homéostasie immunitaire et cellulaire  
Journée amiénoise de la recherche en santé - Amiens – novembre 2017

## ABREVIATIONS

Ac :	Anticorps
ACTH :	Hormone adénocorticotrope
ADN :	Acide Desoxyribo Nucléique
Ag :	Antigène
ANFR :	Agence Nationale de Fréquences
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AW :	Active Wake
BCP :	B-cell Receptor
CD :	Cluster de Différentiation
CEM :	Champs électromagnétiques
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CSH :	Cellule Souche Hématopoïétique
DAS :	Dose d'Absorption Spécifique (équivalent de SAR en anglais)
EBF/ELF :	Extrêmement Basses Fréquences
EEG :	Electroencéphalogramme
EHS :	Electrohypersensibilité
EMG :	Electromyogramme
EOG :	Electrooculogramme
GSH-Px :	Glutathione peroxidase
GSM :	Global System Mobile
HSP :	Heat Shock Protein
IEI-EMF :	Intolérance environnementale idiopathique avec attribution aux champs électromagnétiques
IgA :	Immunoglobuline A
IgG :	Immunoglobuline G
IgM :	Immunoglobuline M
LB :	Lymphocyte B

LT :	Lymphocyte T
MDA :	Malondialdéhyde
MPO :	Myéloperoxidase
NK :	Natural Killer
NREM :	Non Rapid Eye Movement
NO :	Monoxyde d'azote
PBMC:	Peripheral blood mononuclear cell
QW :	Quiet Wakefulness
REM :	Rapid Eye Movement
ROS :	Reactiv Oxygen Species
SMS :	Short Message Service
SOD :	Super Oxide Dismutase
SOL:	Sommeil à ondes lentes
SP :	Sommeil paradoxal
TLR :	Toll-like receptor
TCR :	T-cell Receptor
TDMA :	Time Division Multiple Access
TILT :	Toxicant Induced Loss of Tolerance
UMTS :	Universal Mobile Telecommunications System
VA :	Valeur déclenchant des actions
VLE :	Valeur Limite d'Exposition

# TABLES DES FIGURES ET DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Représentation d'une onde électromagnétique selon les équations de Maxwell (d'après Vanderstraeten, 2009) .....	22
Figure 2 Représentation des grandes utilisations des CEM selon le spectre fréquentiel (tiré de INRS, 2017) .....	24
Figure 3 Portée optimale d'une antenne relais (source INERIS) .....	27
Figure 4 Bandes de fréquences et téléphonie GSM (source Afsset 2009) .....	28
Figure 5 Représentation de la Yee-grid permettant le calcul du DAS (tiré de FDTD.com) .....	29
Figure 6 Valeurs déclenchant l'action (issues de l'article R. 4453-13) .....	31
Figure 7 Symptômes déclarés par 40 personnes souffrant d'EHS et classés seulement le nombre de déclaration (tiré de Dieudonné 2016) .....	34
Figure 8 Sources perçues des champs électromagnétiques par les personnes souffrant d'EHS (tiré de Dieudonné 2016) .....	34
Figure 9 Composants du système immunitaire inné (Kuby, 1997) .....	48
Figure 10 Lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise par les cellules dendritiques (Kuby, 1997) .....	49
Figure 11 Processus d'expression membranaire du complexe formé entre les CMH et l'antigène (Kuby, 1997) .....	50
Figure 12 Rôle du type de classe de CMH dans la reconnaissance par le Lymphocyte T (Kuby, 1997).....	51
Figure 14 Sélection positive et négative des thymocytes dans le thymus (Kuby 1997) .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 14 échelle sonore en dB(A) comportant des exemples de sources sonores (source Audilo.com) .....	69
Figure 15 : Modèle de rat (à gauche) ayant permis de calculer les différentes valeurs de DAS selon différentes vues (à droite) (issu du projet EVIREF, Laboratoire PériTox) .....	80
Figure 16 Schéma du déroulement des expérimentations .....	82
Figure 17 : Zones définies virtuellement sur Actitrack, Coins en bleu, Mur en vert, Périphérie centrale en rouge, Centre en gris .....	87

Tableau 1 Distinction fréquentielle des champs électromagnétiques et utilisation de ceux-ci .....	25
Tableau 2 Générations de téléphonie mobile .....	26
Tableau 3 Valeurs légales des limites d'expositions professionnelles aux champs électromagnétiques (issues de l'article R.4453-3) .....	31
Tableau 4 Prévalence de l'EHS dans le monde .....	33
Tableau 5 Caractéristiques des différents états de vigilance (Bjorvatn et al., 1998; Gaztelu et al., 1994; Green and Arduini, 1954) .....	41
Tableau 6 Tracés et caractéristiques de l'EEG, de l'EMG et de la puissance spectrale de l'EEG des états de veille du rat .....	43
Tableau 7 Neurotransmetteurs hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (adapté de Schwartz et al., 2000) .....	61
Tableau 8 : Valeurs de DAS en fonction de la position du rat et de la partie anatomie concernée (issu du projet EVIREF, Laboratoire PériTox) .....	80
Tableau 9: paramètres évalués par l'Open Field Test (moyenne±écart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : * $p<0.05$ , ** $0.5<p<0.01$ , *** $0.01<p<0.001$ .....	201
Tableau 10 : Paramètres fécaux (moyenne±écart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : ind $0.1<p<0.05$ , * $p<0.05$ , ** $0.5<p<0.01$ , *** $0.01<p<0.001$ .....	202
Tableau 11 : Perfusion unitaire (PU) (moyenne±écart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : * $p<0.05$ , ** $0.5<p<0.01$ , *** $0.01<p<0.001$ ; LE left ear/oreille gauche, RP right paw/patte froite .....	208
Tableau 12 Température (moyenne±écart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : * $p<0.05$ , ** $0.5<p<0.01$ , *** $0.01<p<0.001$ ; LE left ear/oreille gauche, RP right paw/patte froite .....	209

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	2
ABSTRACT .....	5
RESUME .....	6
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	7
ABREVIATIONS .....	9
TABLES DES FIGURES ET DE ILLUSTRATIONS .....	11
TABLE DES MATIERES.....	13
PREAMBULE .....	17
ETAT DE L'ART .....	21
1. LES CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES.....	22
1.1. Composante physique.....	22
1.1.1. Modèle ondulatoire.....	22
1.1.2. Modèle corpusculaire.....	23
1.2. Spectre électromagnétique .....	23
1.2.1. Champs magnétiques statiques.....	24
1.2.2. Champs électromagnétiques non-statiques .....	25
1.3. Ondes radiofréquences .....	25
1.4. Mode d'action des champs électromagnétiques sur un système biologique .....	28
1.5. Règlementations.....	29
1.6. Effets des champs électromagnétiques .....	32
1.6.1. Electro-hypersensibilité.....	32
1.6.1.1. Prévalence de l'électro-hypersensibilité .....	32
1.6.1.2. Symptômes de l'électro-hypersensibilité.....	33
1.6.1.3. Hypothèses formulées sur l'origine des symptômes décrits par les personnes souffrant d'électro-hypersensibilité .....	35
1.6.2. Champs électromagnétiques et Santé.....	37
2. LE SOMMEIL .....	40
2.1. Généralités .....	40
2.2. Stades de sommeil .....	40
2.3. Effets des champs électromagnétiques sur le sommeil .....	44
3. LE SYSTEME IMMUNITAIRE .....	46
3.1. Généralités .....	46
3.2. Réponses immunitaires.....	47
3.2.1. Immunité innée .....	47

3.2.2.	Immunité adaptative.....	48
3.2.2.1.	Cellule présentatrice de l'antigène .....	50
3.2.2.2.	Lymphocyte T .....	52
3.2.2.3.	Lymphocyte B.....	55
3.3.	<i>Effets des champs électromagnétiques sur le système immunitaire</i> .....	57
4.	LE METABOLISME.....	59
4.1.	<i>Le comportement alimentaire</i> .....	59
4.2.	<i>Effets des champs électromagnétiques sur le métabolisme</i> .....	61
5.	INTERACTION ENTRE LES DIFFERENTES FONCTIONS .....	62
5.1.	<i>Interaction entre le sommeil et le système immunitaire</i> .....	62
5.1.1.	Liens cellulaires et moléculaires entre le sommeil et le système immunitaire .....	62
5.1.2.	Système immunitaire lors d'une privation de sommeil.....	63
5.1.3.	Effet d'une infection sur le sommeil.....	64
5.2.	<i>Interaction entre le sommeil et le métabolisme</i> .....	65
5.3.	<i>Interaction entre le système immunitaire et le métabolisme</i> .....	66
6.	LES NUISANCES SONORES.....	68
6.1.	<i>Généralités</i> .....	68
6.2.	<i>Caractéristiques physiques</i> .....	68
6.3.	<i>Règlementations</i> .....	69
6.4.	<i>Effets du bruit sur la santé</i> .....	70
6.4.1.	Effets du bruit sur le sommeil .....	70
6.4.2.	Effets du bruit sur le système immunitaire .....	72
	<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>74</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>77</b>
1.	MODELE ANIMAL.....	78
1.1.	<i>Environnement</i> .....	78
1.2.	<i>Animaux</i> .....	78
2.	MODALITES D'EXPOSITION .....	79
2.1.	<i>Exposition aux champs électromagnétiques</i> .....	79
2.2.	<i>Exposition au bruit</i> .....	81
3.	PROTOCOLE GENERAL .....	81
4.	PARAMETRES ETUDIES .....	83
4.1.	<i>Paramètres hypniques</i> .....	83
4.2.	<i>Paramètres immunologiques</i> .....	84
4.3.	<i>Paramètres métaboliques</i> .....	85
4.3.1.	Prise Alimentaire et Prise Hydrique.....	85
4.3.2.	Poids corporel.....	85
4.3.3.	Poids des organes.....	85

4.4.	<i>Pléthysmographie</i> .....	86
4.5.	<i>Autres paramètre étudiés</i> .....	86
4.5.1.	Comportement .....	86
4.5.2.	Fèces .....	87
4.5.3.	Laser Doppler.....	87
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....		<b>89</b>
ETUDE 1 : IMPACTS D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE A UNE CONTRAINTE SONORE DE HAUTE INTENSITE SUR LE SOMMEIL, LE POIDS ET LA PRISE ALIMENTAIRE DE RATS JUVENILES .....		
		90
	<i>Résumé</i> .....	91
	<i>Article : Impacts of chronic, high-level noise exposure on sleep and metabolic parameters: a juvenile rodent model</i> .....	95
ETUDE 2 : IMPACTS D'UNE CO-EXPOSITION ENTRE LES CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES DE TYPE RADIO FREQUENCE ET UNE CONTRAINTES SONORE DE HAUTE INTENSITE SUR LE SOMMEIL, LA PRISE ALIMENTAIRE, LE POIDS ET LA RESPIRATION DE RATS JUVENILES.....		
		119
	<i>Résumé</i> .....	120
	<i>Article : Effects of a co-exposure between 900 MHz RF-EMF and high-level noise on juvenile rat sleep, weight, food intake and respiratory parameters</i> .....	125
ETUDE 3 : IMPACTS D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE AUX CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE RATS JUVENILES.....		
		151
	<i>Résumé</i> .....	152
	<i>Article</i> .....	155
ETUDE 4 : IMPACTS D'UNE CO-EXPOSITION ENTRE LES CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES DE TYPE RADIO FREQUENCE ET UNE CONTRAINTES SONORE DE HAUTE INTENSITE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE RATS JUVENILES .....		
		173
	<i>Résumé</i> .....	174
	<i>Article</i> .....	178
ETUDE 5 : IMPACTS D'UNE CO-EXPOSITION ENTRE LES CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES DE TYPE RADIO FREQUENCE ET UNE CONTRAINTES SONORE DE HAUTE INTENSITE SUR LE COMPORTEMENT ET LA MICROCIRCULATION CUTANEE.....		
		199
1.	COMPORTEMENT .....	200
1.1.	<i>Résultats</i> .....	200
1.2.	<i>Discussion</i> .....	203
2.	MICROCIRCULATION SOUS-CUTANEE .....	206
2.1.	<i>Résultats</i> .....	206
2.2.	<i>Discussion</i> .....	210
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....		<b>213</b>
<b>PERSPECTIVES</b> .....		<b>223</b>
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>225</b>

**BIBLIOGRAPHIE..... 227**

## PREAMBULE

**L**e magnétisme est un sujet de curiosité scientifique depuis l'Antiquité. A cette époque, deux phénomènes à distance observables soulevaient de nombreuses questions pour les érudits, philosophes et scientifiques, tels que Thalès de Milet ou Platon. Ces phénomènes étaient celui de l'attraction d'un morceau de fer par la « pierre d'aimant » et celui de l'attraction de la paille par un morceau d'ambre frotté. Ces réflexions à propos de ces deux phénomènes préfiguraient des siècles de recherches, dans une quête d'avancement technologique mais aussi de la compréhension des effets qui peuvent apparaître sur les organismes vivants.

Depuis l'utilisation du magnétisme terrestre à travers l'invention de la boussole, l'Homme n'a eu de cesse de développer des techniques et des technologies associant l'électricité et le magnétisme. Ainsi Mesmer, Ampère, Maxwell, Faraday et Einstein qui font partie des génies scientifiques de nos « civilisations modernes » se sont penchés sur ces questions. Riches de leurs découvertes et de leurs enseignements, l'électromagnétisme peut désormais être utilisé dans de nombreux domaines, allant de l'industrie lourde aux objets de la vie courante, en passant par le domaine médical.

En effet, l'électromagnétisme est une science se trouvant à l'intersection de nombreuses autres, de la physique, de la chimie par les potentiels internes aux molécules et atomes, de l'ingénierie par ses utilisations et de la biologie par ses interactions inconnues, avec la matière vivante. Un bon exemple de ces différents mondes cohabitant en même point est le travail de Jacques-Arsène d'Arsonval (XIX<sup>ème</sup> siècle), chirurgien biophysicien, inventeur du premier téléphone utilisé par les PTT et pionnier de l'électrophysiologie.

De nos jours, les champs électromagnétiques sont utilisés quotidiennement et notamment dans la téléphonie mobile. En France, au 31 décembre 2017, le nombre de cartes SIM était de 74,6 millions soit un taux de pénétration de la population de 111,7 % (ARCEP, 2018). Mais cette utilisation croissante entraîne également une augmentation des sources électromagnétiques. Pour leur permettre de communiquer l'une avec l'autre, 304 922 antennes (2G, 3G, 4G) dont 120 203 antennes délivrant une fréquence de 900 MHz (UMTS 900, GSM900) sont réparties créant un maillage du territoire (ANFR, 2017).

En parallèle du développement des moyens de communication, un phénomène appelé l'électro-hypersensibilité est également apparu. Une fraction de la population présente des

symptômes tels que des troubles du sommeil, des difficultés de concentration, des atteintes dermatiques ou des palpitations cardiaques, symptômes qui sont attribués à une exposition aux champs électromagnétiques par ceux qui en souffrent. Ces symptômes ont également été rapportés par des riverains des antennes relais, exposés aux champs électromagnétiques de type radiofréquence (Santini et al., 2002). Face à l'ampleur grandissante de ce phénomène au cours des dernières décennies, de nombreuses associations ont été créées et les pouvoirs publics ont missionné les équipes de recherche de déterminer si les symptômes sont avérés d'une part et de trouver un lien physiologique entre une exposition aux champs électromagnétiques et les symptômes observés d'autre part.

Diverses études épidémiologiques ou réalisées en laboratoire se sont focalisées sur le sommeil ou les paramètres immunitaires et à leurs éventuelles modifications lors d'une exposition aux champs électromagnétiques. Toutefois, bien que l'interaction entre les deux fonctions soit bien connue par ailleurs, les effets conjoints de ces deux paramètres lors d'une exposition n'ont pas été étudiés.

Les résultats des expériences menées en laboratoire sont soumis à controverse. Elle provient de la non-reproductibilité de certains résultats obtenus et de difficultés méthodologiques. Au vu de cette controverse et de résultats obtenus par notre laboratoire alliant une exposition chronique aux champs électromagnétiques avec une contrainte thermique, l'hypothèse d'une co-exposition a émergé. En effet, afin d'expliquer la variabilité ou dans certains cas la « non-significativité » de certains effets suite à une exposition aux champs électromagnétiques, nous avons émis l'hypothèse que les effets dus aux champs électromagnétiques pourraient être révélés voire exacerbés lors d'une co-exposition à une seconde contrainte environnementale. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une contrainte environnementale connue et étudiée depuis longtemps : la nuisance sonore. En effet, un tiers de la population française déclare souffrir de troubles du sommeil et selon l'OMS 40 % d'entre eux l'attribuent au bruit. Il s'agit donc au même titre que les champs électromagnétiques d'une contrainte ubiquitaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une exposition aux champs électromagnétiques et au bruit. Le protocole réalisé nous permettra de distinguer les effets d'une exposition seule aux CEM ou au bruit, des effets liés à la co-exposition. Selon notre hypothèse, les effets lors d'une co-exposition devraient être supérieurs à ceux d'une

exposition simple et exacerbés les effets observés chez les animaux exposés seulement aux champs électromagnétiques.

Une des spécificités de ce travail repose sur la durée et sur la fenêtre d'exposition des animaux. En effet, au regard de la littérature, peu d'études se sont portées sur une exposition chronique, les auteurs préférant pour des raisons méthodologiques une exposition plus courte, quitte à augmenter l'intensité de celle-ci. Dans le cadre de ce travail, et afin d'être au plus proche d'une exposition quotidienne telle qu'elle pourrait être subie par la population, nous avons choisi une exposition chronique de cinq semaines. Ces cinq semaines, additionnées aux trois semaines avant le sevrage, correspondent à la durée de développement et de maturation d'un modèle animal : le rat. En effet, notre étude s'est portée sur une population juvénile. En plus d'une faible représentativité de cette population dans les études menées aussi bien sur les effets du bruit que des champs électromagnétiques, cette population est dite « vulnérable ». Cette vulnérabilité vient en outre du fait que les fonctions physiologiques, et notamment le système nerveux central de l'individu, sont en maturation. Dans le cas d'une exposition aux champs électromagnétiques, la vulnérabilité de la population juvénile vient également du fait que les ondes présentent une plus grande pénétration. Ainsi la modélisation de la Dose d'Absorption Spécifique (DAS), chez des enfants exposés, a montré une valeur supérieure pour des tissus spécifiques tels que le cerveau par rapport aux adultes pour une même fréquence et intensité d'exposition (Wiert et al., 2011).

L'objectif de ce travail est donc d'évaluer les effets d'une exposition chronique aux champs électromagnétiques de type radiofréquence et/ou à une nuisance sonore de haute intensité sur le système immunitaire et le sommeil d'une population juvénile, en utilisant le rat pour modèle.

Dans un premier temps, ce document donnera les éléments descriptifs et bibliographiques nécessaires à la compréhension du travail expérimental. Ce dernier portera sur l'étude des différents paramètres hypniques, métaboliques et immunologiques lors des différentes expositions. Dans un second temps, la partie expérimentale sera divisée en sous-parties, présentant tout d'abord la validation de l'exposition chronique au bruit et les effets spécifiques du bruit puis l'étude des effets d'une exposition aux champs électromagnétiques et à la co-exposition sur les paramètres hypniques et métaboliques, et enfin sur les paramètres immunologiques.

## ÉTAT DE L'ART

# 1. Les Champs électromagnétiques

## 1.1. Composante physique

### 1.1.1. Modèle ondulatoire

Un champ électromagnétique (CEM) est la combinaison de deux charges en mouvement l'une par rapport à l'autre. Ces deux charges sont de nature différentes, l'une électrique, l'autre magnétique, et apparaissent lorsque la charge électrique est en mouvement dans le conducteur. La modélisation et la caractérisation de ces forces ont été faites à partir des équations de Maxwell qui indiquent qu'une onde électromagnétique plane est un phénomène ondulatoire qui associe un champ électrique sinusoïdal  $\vec{E}$  (exprimé en  $V.m^{-1}$ ) et un champ magnétique  $\vec{B}$  (exprimé en  $A.m^{-1}$ ). Les deux champs sont en permanence disposés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre et ont la caractéristique d'avoir une longueur d'onde identique (Figure 1). Le champ magnétique est plus souvent défini par la densité de flux magnétique ou induction magnétique  $\vec{B}$  (communément appelé champ magnétique et exprimée en teslas (T)) plutôt que par son intensité  $\vec{H}$ . De part sa nature physique, le champ électromagnétique est une caractéristique vectorielle déterminée par un sens, une norme et une direction (Bonn and Rochon, 1992).

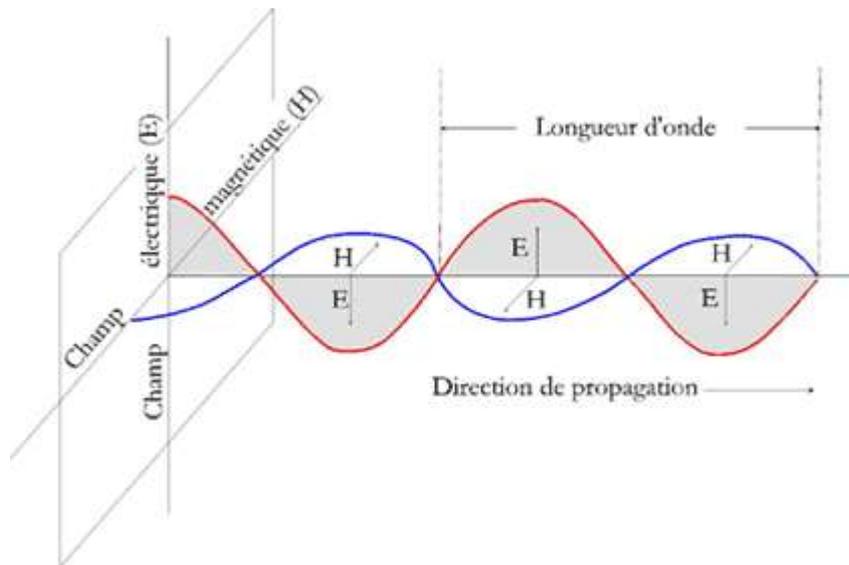


Figure 1 : Représentation d'une onde électromagnétique selon les équations de Maxwell (d'après Vanderstraeten, 2009)

Dans le vide, un champ électromagnétique présente une célérité (vitesse de propagation) qui est égale à la vitesse de la lumière soit  $3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ . Dans les autres cas, la célérité est décrite par la formule suivante  $v = f * \lambda$  et est dépendante de différents paramètres

physiques, notamment la permittivité ( $\epsilon$ ) et la perméabilité ( $\mu$ ), la perméabilité étant le lien entre l'induction magnétique et l'intensité magnétique  $\vec{B} = \mu * \vec{H}$ .

Les champs électromagnétiques sont caractérisés par :

- L'intensité (en  $V.m^{-1}$  ou  $A/m^2$ ) ;
- La longueur d'onde (en nm) ;
- La polarisation (en A/m) ;
- L'induction magnétique (en T) ;
- La fréquence (en Hz).

### 1.1.2. Modèle corpusculaire

D'un point de vue physique, certaines interactions entre les ondes électromagnétiques et la matière ne sont pas entièrement explicables par le modèle ondulatoire précédemment cité. Pour cela, un second modèle vient épauler les théories de Maxwell. Ce second modèle, théorisé par Einstein en 1905, considère une onde électromagnétique comme un flux de photons se déplaçant dans l'espace selon les considérations de Planck. Planck décrit alors une onde électromagnétique comme étant un flux discontinu de photons dont l'énergie suit la formule suivante :

$$E = h * f = \frac{hc}{\lambda} \text{ avec } h = 6.62 * 10^{-34} J.s^{-1} \text{ et } c = 3 * 10^8 m.s^{-1}$$

Ces deux modèles sont adaptés à n'importe quelle onde électromagnétique, mais l'utilisation de l'un ou de l'autre dépend du domaine d'application. Dans le cas de l'étude des champs électromagnétiques et de leur interaction avec la matière vivante, c'est le modèle ondulatoire qui est habituellement utilisé.

## 1.2. Spectre électromagnétique

Les champs électromagnétiques sont également appelés radiations. Ces radiations sont divisées entre les radiations non-ionisantes et les radiations ionisantes. Ces dernières, telles que les rayons X ou Gammas ( $\gamma$ ), ont suffisamment d'énergie pour libérer et diffuser des électrons dans leur environnement, caractéristique dont les radiations non-ionisantes sont dépourvues.

Le spectre électromagnétique décrit l'ensemble des bandes d'ondes électromagnétiques ordonnées généralement par la fréquence ou par la longueur d'onde, ces deux éléments étant inversement proportionnels l'un à l'autre. D'un point de vue théorique, le spectre électromagnétique s'étend de 0 Hz à l'infini.

$$\lambda = \frac{c}{f} \text{ avec } c = 3 * 10^8 \text{ m. s}^{-1}$$

Les champs électromagnétiques peuvent être d'origine naturelle (comme le magnétisme terrestre utilisé dans la détermination du Nord et du Sud) ou d'origine artificielle, générés par l'activité humaine (radiographie des os, courant des appareils électriques, transmission d'informations...). Les domaines d'application des champs électromagnétiques sont fonction des bandes de fréquences et leurs utilisations par les sociétés modernes sont de deux ordres : le transport d'informations (radio, télévision, radar...) et le transfert d'énergie (industrie, imagerie médicale ...) (Figure 2).

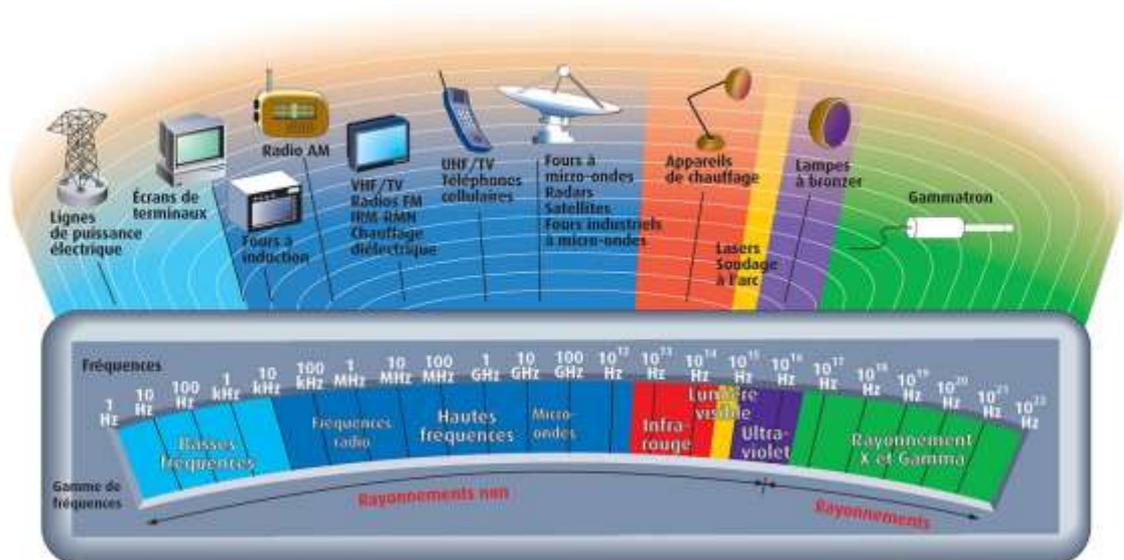


Figure 2 : Représentation des grandes utilisations des CEM selon le spectre fréquentiel (tiré de INRS, 2017)

### 1.2.1. Champs magnétiques statiques

Les champs magnétiques statiques, tels que le champ magnétique terrestre, ont une intensité et une direction constantes. Ils agissent sur les objets métalliques ou aimantés. Les dispositifs médicaux tels que l'IRM ou les dispositifs industriels tels que les appareils d'électrolyse sont des sources artificielles de champs magnétiques statiques.

### 1.2.2. Champs électromagnétiques non-statiques

Habituellement, les champs électromagnétiques sont distingués selon la bande de fréquence à laquelle ils appartiennent. Cette distinction fréquentielle permet également de faire la distinction entre les différentes utilisations de ces fréquences (Tableau 1 .

<b>Nom</b>	<b>Fréquence</b>	<b>Utilisations</b>
<i>Extrêmement Basses Fréquences</i>	0 - 300 Hz	Réseau électrique
<i>Ultra Basses Fréquences</i>	300 Hz – 3 kHz	Chauffage induction
<i>Très Basses Fréquences</i>	3 kHz – 30 kHz	Radiocommunications
<i>Basses Fréquences</i>	30 kHz – 300 kHz	Radiodiffusion maritime et aéronautique
<i>Moyennes fréquences</i>	300 kHz – 3 MHz	Radiodiffusion Radiolocalisation
<i>Hautes Fréquences</i>	3 MHz – 30 MHz	Radiodiffusion
<i>Très Hautes Fréquences</i>	30 – 300 MHz	Télévision Recherche spatiale
<i>Ultra Hautes Fréquences</i>	300 MHz – 3 GHz	Télévision Radar
<i>Super Hautes Fréquences</i>	3 GHz – 30 GHz	Radar Radioastronomie
<i>Extrêmement Hautes Fréquences</i>	30 GHz – 300 GHz	Radioastronomie Imagerie médicale

Tableau 1 : Distinction fréquentielle des champs électromagnétiques et utilisation de ceux-ci

### 1.3. Ondes radiofréquences

Les ondes radiofréquences ont vu leur développement s'accroître avec la démocratisation des moyens de communication. Les ondes radiofréquences ont une fréquence comprise entre 10 MHz et 300 GHz et proviennent uniquement de sources artificielles. La vitesse de ces ondes est égale à la vitesse de la lumière mais leur puissance décroît avec le carré de la distance parcourue.

Elles ont la majorité de leurs utilités dans le transport d'informations, que ce soit dans un sens (d'un émetteur vers un récepteur comme la radio ou la télévision...) ou dans les deux

sens (avec un échange réciproque d'informations comme pour la téléphonie fixe sans fil, la téléphonie portable, le Bluetooth, le Wi-Fi...)

La téléphonie mobile est fractionnée en « technologies de génération » allant actuellement de la 1G à la 5G. Les utilisations de ces générations de téléphonie sont les suivantes :

<i>Génération</i>	<i>Utilisation</i>	<i>Acronyme</i>
1G	Première génération de téléphonie analogique sans fil	
2G	Téléphonie vocale et SMS	Global System for Mobile Communication (GSM)
3G	Téléphonie et accès internet	Universal Mobile Telecommunication System (UMTS)
4G	Téléphonie et accès internet	Long Term Evolution Advanced (LTE)
5G	Téléphonie et accès internet	International Mobile Telecommunications-Advanced (IMT)

Tableau 2 : Générations de téléphonie mobile

La différence entre les trois dernières générations repose sur l'augmentation progressive du débit de transfert de données, de 1,9 Mbit.s<sup>-1</sup> pour la 2G, 1 Gbits.s<sup>-1</sup> pour la 4G et jusqu'à 5 Gbits.s<sup>-1</sup> pour la 5G.

Le système de fonctionnement de la téléphonie mobile repose sur l'utilisation d'un quadrillage de l'espace appelé « nid-d'abeille ». Au centre de chaque cellule se trouve une station de base composée de plusieurs antennes relais, qui émet vers les téléphones des utilisateurs et qui reçoit les signaux transmis par ceux-ci. Au 1<sup>er</sup> mai 2018, en France 40 558 sites étaient autorisés par l'ANFR pour être des supports d'antennes de technologie 4G (et générations précédentes). Chaque station de base est constituée d'un nombre variable d'antennes-relais en fonction des réseaux (GSM ou UMTS) et la puissance de ces antennes est dépendante de la zone à couvrir. Le mode de diffusion de ces antennes se fait dans un faisceau principal. Afin que l'exposition soit optimale, l'antenne est généralement placée en hauteur, telle que sur le toit des immeubles, mais cette exposition est très faible, voire quasi nulle directement sous l'antenne. On considère que la portée optimale d'une antenne est de 200 m (Figure 3).

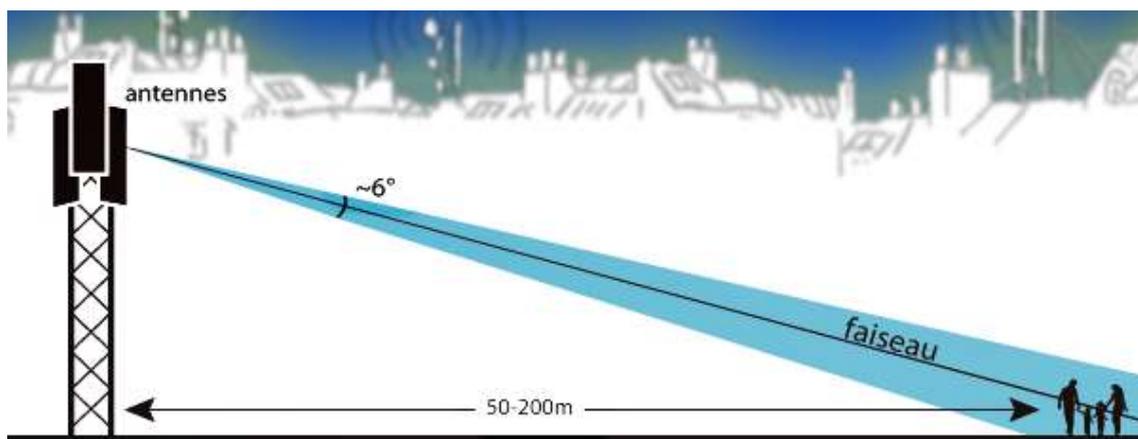


Figure 3 : Portée optimale d'une antenne relais (source INERIS)

Chaque téléphone portable est considéré comme étant un émetteur radio pouvant émettre entre 800 et 2 690 MHz. Pour cela, il utilise différents systèmes dont le système GSM qui permet les appels et l'envoi de SMS et le système UMTS qui permet les connexions internet.

Le système GSM est composé de deux bandes de fréquences, la première autour de 900 MHz (GSM 900) et la seconde autour de 1800 MHz (GSM 1800). Chaque bande comporte un ensemble de bandes plus étroites dites « canaux de trafic » d'une largeur de 200 kHz. Au début d'une communication, une fréquence est attribuée à cette communication entre le téléphone et la station de base. Si le téléphone est en mouvement et traverse différentes cellules, la fréquence de communication peut varier en faisant des « sauts de fréquence ». Pour une optimisation de la bande fréquentielle et une utilisation par plusieurs utilisateurs en simultané, chaque canal présente un séquençage temporel appelé Time Division Multiple Acces (TDMA). Lorsqu'un téléphone est lié avec une station de base dans le cadre d'une communication, il émet une impulsion d'une durée de 576  $\mu$ s toute les 4,6 ms (soit une fréquence de 217 impulsions par seconde, 217 Hz, Figure 4). Ce modèle de communication par impulsion permet l'utilisation simultanée d'un même canal par huit utilisateurs (Afsset, 2009).

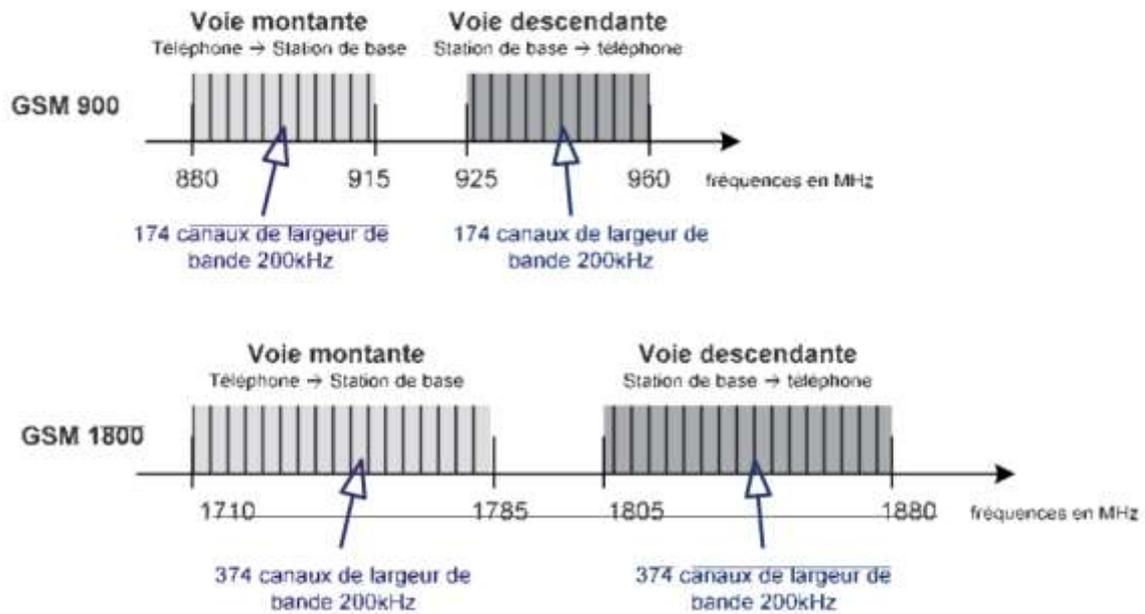


Figure 4 : Bandes de fréquences et téléphonie GSM (source Afsset 2009)

Quant au système UMTS, il fonctionne sur le principe de partage de bandes de puissance entre les utilisateurs. Les bandes utilisables, situées autour de 2100 MHz, ont une largeur de 5 Hz et la répartition entre les utilisateurs se fait selon la technique d'étalement du spectre CDAM (accès multiple par répartition du code).

#### 1.4. Mode d'action des champs électromagnétiques sur un système biologique

L'interaction entre un rayonnement électromagnétique et la matière peut se traduire de deux manières. La première est la diffusion élastique (dite diffusion de Rayleigh), qui se fait sans transfert d'énergie ni variation dans les caractéristiques de l'onde. La longueur d'onde ne varie pas en traversant le milieu et aucun électron n'est libéré ou acquis par les atomes. La seconde, dite diffusion inélastique, entraîne un transfert d'énergie vers la matière qui la réfléchit ou l'absorbe ce qui peut entraîner une variation dans les caractéristiques physiques de l'onde telle qu'une diminution de la fréquence.

Les ondes radiofréquences présentent sur les systèmes biologiques deux types d'effets : les effets thermiques et les effets non-thermiques. Les effets non-thermiques sur les systèmes biologiques seront développés dans la suite de ce document. Les effets thermiques sont dûs à l'effet Joule qui se manifeste lors du passage d'une charge électrique dans un matériau non-neutre pouvant transmettre une charge par agitation des molécules d'eau. Il s'agit du principe

de fonctionnement du micro-onde. Cet effet thermique peut avoir lieu quelque soit la longueur d'onde du rayonnement. Cet effet thermique est cependant dépendant de la quantité d'énergie absorbée par unité de masse matière (J/kg). Cette valeur conduit au calcul du débit d'absorption spécifique (DAS). Pour les ondes radiofréquences, un effet thermique délétère sur l'organisme est observé à partir de 4 W/kg (INRS, 2018).

Le DAS quantifie le niveau d'exposition aux ondes radiofréquences par unité de masse et est exprimé en W/kg. Sa relation avec le tissu donné se fait selon la formule suivante :

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

avec  $\sigma$  la conductivité du tissu, E la force du champ électrique et  $\rho$  la densité

de masse. Le DAS n'est pas une valeur mesurable, mais est obtenu par simulation numérique à la suite de mesures expérimentales en utilisant notamment la méthode Finite Difference Time Domain (FDTD) utilisant une Yee-grid. En utilisant les équations de Maxwell, cette grille consiste à déterminer les composants du champ à chaque endroit de la grille et d'en suivre l'évolution au cours du temps (Figure 5) (Yee, 1966).

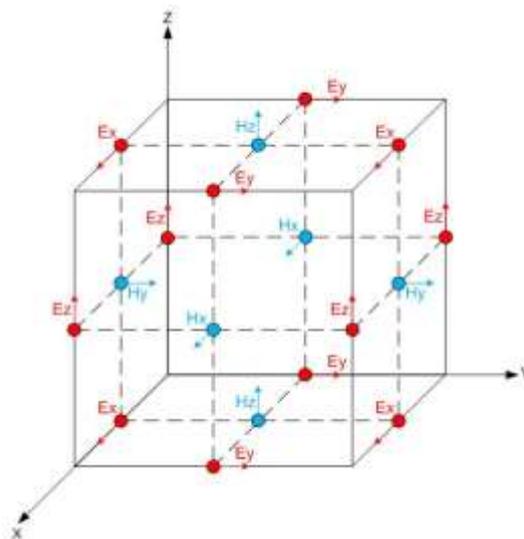


Figure 5 : Représentation de la Yee-grid permettant le calcul du DAS (tiré de FDTD.com)

### 1.5. Règlements

La réglementation européenne en matière de champs électromagnétiques porte sur deux populations, les particuliers et les professionnels. Elle comporte tout d'abord les textes relatifs à la protection des particuliers, sur les fréquences émises par les appareils se situant à

proximité de l'oreille humaine ou les limites d'exposition des stations de bases<sup>1</sup>. Les valeurs d'exposition dans un environnement de travail sont propres à chaque pays.

En 2015, la Loi française n° 2015-136, dite loi Abeille, relative à la transparence des expositions aux ondes radiofréquences, a statué sur différents points :

- La transparence de la part des collectivités qui doivent désormais informer la population de l'installation des antennes relais et proposer une concertation avant toute mise en place ;
- La limitation de l'exposition de zones accueillant des jeunes enfants (crèche, garderie...) en enlevant les bornes Wi-Fi ;
- La publication annuelle des zones où l'exposition est sensiblement plus importante que dans le reste du territoire, les mesures et la publication étant garantie par l'ANFR.

Toutefois, la loi Abeille n'exige pas de la part des opérateurs de téléphone une diminution des niveaux d'exposition, le texte indiquant uniquement que cette diminution était incitée.

En France, dans un milieu professionnel, un cadre réglementaire applicable aux risques d'exposition aux champs électromagnétiques a été fixé. Il fait notamment état des valeurs limites qui ne doivent pas être dépassées, des méthodes de prévention et des formations qui doivent être mises en place quand l'exposition survient dans un contexte professionnel. Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2017, les risques d'exposition aux CEM doivent être inscrits dans le Document Unique.

Le Code du Travail, dans lequel sont insérés les Articles R. 4453-1 à R. 4453-34, distingue deux types de valeurs seuils : la Valeur d'Exposition professionnelle (VLE) et la Valeur déclenchant des Actions (VA). Les VLE sont des valeurs réglementées par l'article R.4453-3 et définissent les VLE relatives « aux effets sur la santé » qui sont les valeurs au-dessus desquelles « les travailleurs sont susceptibles de subir des effets nocifs pour la santé (échauffement thermique ou stimulation des tissus nerveux et musculaires) » et les VLE relatives aux « effets sensoriels » qui sont les valeurs au-dessus desquelles « les travailleurs sont susceptibles de présenter un trouble passager des perceptions sensorielles ainsi que des changements mineurs des fonctions cognitives. » (République Française, 2016)

---

<sup>1</sup> Article 3, paragraphe 1 point a de la directive 2014/53/UE

FREQUENCES (f) (1)	VALEURS LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE					
	Effets biophysiques directs	« Effets sensoriels »		« Effets sur la santé »		
		Exposition localisée de la tête	Exposition localisée des membres	Exposition ensemble du corps	Exposition localisée de la tête et du tronc	Exposition localisée des membres
0 Hz ≤ f < 1 Hz (2)	Effets non thermiques	2 T	8 T	8 T	-	-
1 Hz ≤ f < 10 Hz (3)		0,7 f V.m <sup>-1</sup>	-	1,1 V.m <sup>-1</sup>	-	-
10 Hz ≤ f < 25 Hz (3)		0,07 V.m <sup>-1</sup>	-		-	-
25 Hz ≤ f ≤ 400 Hz (3)		0,0028 f V.m <sup>-1</sup>	-		-	-
400 Hz < f < 3 kHz (3)		-	-		-	-
3 kHz ≤ f < 100 kHz (3)		-	-	3,8x10 <sup>-4</sup> f V.m <sup>-1</sup>	-	-
100 kHz ≤ f < 10 MHz (3) (4) (5)	Effets thermiques	-	-	3,3x10 <sup>-4</sup> f V.m <sup>-1</sup> (non thermique) 0,4 W.kg <sup>-1</sup> (thermique)	10 W.kg <sup>-1</sup>	20 W.kg <sup>-1</sup>
10 MHz ≤ f < 0,3 GHz (4)		-	-	0,4 W.kg <sup>-1</sup>		
0,3 GHz ≤ f < 6 GHz (4) (6)		10 mJ.kg <sup>-1</sup>	-	-	-	-
6 GHz ≤ f ≤ 300 GHz (7)		-	-	50 W.m <sup>-2</sup>	-	-

(1) La fréquence f est exprimée en hertz (Hz)  
(2) Dans la gamme de fréquences comprises entre 0 et 1 hertz, les valeurs limites d'exposition sont des valeurs d'induction magnétique externe exprimées en tesla  
(3) Dans la gamme de fréquences comprises entre 1 hertz et 10 mégahertz, les valeurs limites d'exposition sont des valeurs crête spatiale du champ électrique interne exprimées en volt par mètre  
(4) Dans la gamme de fréquences comprises entre 100 kilohertz et 6 gigahertz, les valeurs limites d'exposition relatives aux effets sur la santé représentent l'énergie moyenne sur l'ensemble ou une partie du corps (tête, tronc, membres) exprimée en termes de débit d'absorption spécifique en watt par kilogramme  
(5) Dans la gamme de fréquences comprises entre 100 kilohertz et 10 mégahertz, les effets thermiques et non thermiques agissant conjointement, les valeurs limites d'exposition pour les deux types d'effets doivent être considérées  
(6) Dans la gamme de fréquences comprises entre 0,3 et 6 gigahertz, la valeur limite d'exposition relative aux effets sensoriels représente l'énergie absorbée par unité de masse de tissus biologiques exprimée en termes d'absorption spécifique en joules par kilogramme  
(7) Dans la gamme de fréquences comprises entre 6 et 300 gigahertz, la valeur limite d'exposition relative aux effets sur la santé représente une densité de puissance exprimée en watt par mètre carré

Tableau 3 : Valeurs légales des limites d'expositions professionnelles aux champs électromagnétiques (issues de l'article R.4453-3)

Les VA, définies dans l'article R. 4453-13 et les articles suivants, sont les valeurs habituellement respectées dans un cadre professionnel car il s'agit des valeurs conditionnant les mises en place d'action de protection des personnels. Les VA sont plus restrictives que les VLE.

FREQUENCE (f) (1)	VALEURS DECLENCCHANT L'ACTION					
	Effets biophysiques directs	Pour l'exposition aux champs électriques	Pour l'exposition aux champs magnétiques		Pour les courants induits	
		VA (E <sub>lim</sub> ) (2) (3)	VA (B <sub>lim</sub> ) (4)		VA (I <sub>lim</sub> ) (5)	
		VA basse (6)	VA haute (6)	Exposition des membres à un champ magnétique localisé	Dans une extrémité quelconque	
1 Hz ≤ f < 8 Hz	Effets non thermiques	2x10 <sup>9</sup> V.m <sup>-1</sup>	2x10 <sup>2</sup> /f μT	3x10 <sup>3</sup> /f μT	9x10 <sup>3</sup> /f μT	
8 Hz ≤ f < 25 Hz			2,5x10 <sup>2</sup> /f μT			
25 Hz ≤ f < 50 Hz			1x10 <sup>3</sup> μT			
50 Hz ≤ f < 300 Hz		3x10 <sup>3</sup> /f μT				
300 Hz ≤ f < 1,64 kHz						
1,64 kHz ≤ f < 2,5 kHz						
2,5 kHz ≤ f < 3 kHz		6,1x10 <sup>3</sup> V.m <sup>-1</sup>	1x10 <sup>2</sup> μT	3x10 <sup>3</sup> μT		
3 kHz ≤ f < 100 kHz						
100 kHz ≤ f < 1 MHz (7)	Effets thermiques	6,1x10 <sup>3</sup> V.m <sup>-1</sup> (non thermique et thermique)	1x10 <sup>2</sup> μT (non thermique)	3x10 <sup>3</sup> μT		
1 MHz ≤ f < 10 MHz (7)		6,1x10 <sup>3</sup> V.m <sup>-1</sup> (non thermique) 6,1.10 <sup>3</sup> /f V.m <sup>-1</sup> (thermique)	2x10 <sup>3</sup> /f μT (thermique)			
10 MHz ≤ f < 110 MHz		61 V.m <sup>-1</sup>	0,2 μT			
110 MHz ≤ f < 400 MHz	-	-	-	-	100 mA	
400 MHz ≤ f < 2 GHz					3x10 <sup>3</sup> f <sup>0,5</sup> V.m <sup>-1</sup>	1x10 <sup>-1</sup> f <sup>0,5</sup> μT
2 GHz ≤ f < 300 GHz					1,4x10 <sup>3</sup> V.m <sup>-1</sup>	4,5x10 <sup>-3</sup> μT

(1) La fréquence f est exprimée en hertz (Hz)  
(2) Les valeurs déclenchant l'action pour une exposition aux champs électriques sont des valeurs d'intensité de champ électrique exprimées en volt par mètre.  
(3) Sur la gamme de fréquences comprises entre 1 et 400 hertz, pour une exposition à des champs électriques, la valeur déclenchant l'action permet de respecter les valeurs limites d'exposition relatives aux effets sensoriels et aux effets sur la santé mentionnées à l'article R. 4453-2  
(4) Les valeurs déclenchant l'action pour une exposition à des champs magnétiques sont des valeurs d'induction magnétique exprimées en microtesla  
(5) La valeur déclenchant l'action pour les courants induits est exprimée en milliampère  
(6) Sur la gamme de fréquences comprises entre 1 et 400 hertz, pour une exposition aux champs magnétiques, la valeur déclenchant l'action basse permet de respecter les valeurs limites d'exposition relatives aux effets sensoriels pour une exposition localisée de la tête tandis que la valeur déclenchant l'action haute permet de respecter les valeurs limites d'exposition relatives aux effets sur la santé mentionnées à l'article R. 4453-2  
(7) Dans la gamme de fréquences comprises entre 100 kilohertz et 10 mégahertz, les effets thermiques et non thermiques agissant conjointement pour les expositions à des champs électriques et à des champs magnétiques, les valeurs déclenchant l'action pour les deux types d'effets et les deux types de champs doivent être considérées

Figure 6 : Valeurs déclenchant l'action (issues de l'article R. 4453-13)

## 1.6. Effets des champs électromagnétiques

### 1.6.1. *Electro-hypersensibilité*

Depuis une trentaine d'années, une fraction de la population se plaint de divers troubles fonctionnels qu'elle attribue aux CEM (Knave et al., 1985). Ces troubles sont aussi divers que des perturbations du sommeil, des symptômes cutanés, des troubles de l'équilibre, des céphalées, mais aussi des symptômes cognitifs tels que les pertes de mémoire ou de la nervosité (Seitz et al., 2005).

L'hypersensibilité aux ondes électromagnétiques (ou électro-hypersensibilité) est une appellation qui a été fixée en 1997 par Bergqvist mais en raison de l'absence de diagnostic physiologique objectif possible, c'est le terme d'« intolérance environnementale idiopathique avec attribution aux champs électromagnétiques » (IEI-EMF) qui est communément utilisé (Mild, 2006). Selon la Commission Européenne le terme d'hypersensibilité aux champs électromagnétiques (EHS) est utilisé « pour désigner un phénomène où les individus ressentent des effets nocifs lorsqu'ils utilisent ou se trouvent à proximité d'appareils rayonnant un champ électrique, magnétique ou électromagnétique. L'emploi du terme « EHS », en lui-même, ne présuppose pas et n'indique en rien une cause pouvant expliquer les effets nocifs observés ».

L'EHS fait, selon l'ANSES, référence à « la perception par les sujets de symptômes fonctionnels divers non spécifiques (troubles du sommeil, maux de tête, symptômes cutanés, etc.) ; l'absence d'évidences clinique et biologique permettant d'expliquer ces symptômes et l'attribution, par les sujets eux-mêmes, de ces symptômes à une exposition à des champs électromagnétiques, eux-mêmes diversifiés. » (ANSES, 2018)

#### 1.6.1.1. *Prévalence de l'électro-hypersensibilité*

L'absence de définition précise de l'EHS et l'auto-déclaration par les personnes souffrant d'EHS limitent les études de prévalence. De fait, chaque étude est à même de donner une définition dans ses questionnaires, disparité relevée en 2012 par Baliatsas. Toutefois, différentes études ont été menées et donnent des prévalences allant de 1,5 à 13,3 % (Tableau 4).

<i>Pays</i>	<i>Prévalence</i>	<i>Référence</i>
<i>Autriche</i>	2 %	(Leitgeb, 1994)
	3,5 %	(Schröttner and Leitgeb, 2008)
<i>Californie</i>	3 %	(Levallois et al., 2002)
<i>Grande Bretagne</i>	4 %	(Eltiti et al., 2007)
<i>Suède</i>	1,5 %	(Hillert et al., 2002)
<i>Suisse</i>	5 %	(Schreier et al., 2006)
<i>Taiwan</i>	13.3 %	(Meg Tseng et al., 2011)
	4.6 %	(Huang et al., 2018)

Tableau 4 : Prévalence de l'EHS dans le monde

En France, bien qu'aucune étude de prévalence n'ait été faite à ce jour, 1 533 personnes sont enregistrées auprès de l'association « une Terre pour les EHS ».

#### 1.6.1.2. Symptômes de l'électro-hypersensibilité

Les premières descriptions de symptômes attribués aux ondes radiofréquences ont été faites dans les années 80 avec les descriptions de syndromes dermatologiques attribués à une exposition aux Video Display Unit (fréquence d'exposition non indiquée) (Berg, 1988; Liden and Wahlberg, 1985; Linden and Rolfsen, 1981; Nilsen, 1982). Les symptômes rapportés étaient soit des symptômes subjectifs tels que des démangeaisons, des sensations de brûlures ou de piqûres, soit des symptômes objectifs, tels que des éruptions cutanées, une peau sèche ou des rougeurs. Ces symptômes se trouvaient localisés, pour la majorité des patients, sur le visage. Les diagnostics cliniques qui étaient alors posés étaient des dermatoses, comme l'eczéma séborrhéique, l'*acnea vulgaris* ou la dermatose atopique. Une étude réalisée sur cette population a notamment pu faire le lien entre l'exposition aux Video Display Unit et les symptômes cités précédemment (Feldman et al., 1985).

Quelques années après, un syndrome plus général a émergé regroupant des effets dermiques, des effets sur le système nerveux (vertiges, fatigue, maux de tête, difficulté de concentration, difficulté de mémorisation, anxiété, dépression), des effets sur le système respiratoire (difficulté à respirer), des effets gastro-intestinaux, des effets sur la vision (rétrécissement du champ visuel, vision floue), des effets sur l'audition (acouphènes) et des palpitations cardiaques (Bergdahl, 1995; Knave et al., 1992).

Les premières attributions de symptômes aux ondes électromagnétiques de type radiofréquence provenant des téléphones datent de 1998, alors que ceux attribués aux antennes relais ont été décrits en 2002 par Santini et son équipe (Hocking, 1998; Santini et al., 2002).

Une étude française, réalisée en 2016 sur 40 personnes souffrant d'EHS, a permis de mettre en exergue les symptômes principaux et d'en faire un classement en fonction de leur fréquence de déclaration (Figure 7).

Symptoms	Number of subjects
Sleep problems	28
Headaches	25
Pain in various locations	25
Abnormal fatigue	20
Concentration problems	17
Tinnitus	14
Memory loss	13
Skin rashes	11
Dizziness	8
Cardiac arrhythmia	8
Speech problems	7
Digestive problems	7
General feeling of ill-being	5
Nausea	5
Other	21

Figure 7 : Symptômes déclarés par 40 personnes souffrant d'EHS et classés seulement le nombre de déclaration (tiré de Dieudonné 2016)

La même étude a permis de classer par fréquence de déclaration les sources d'ondes électromagnétiques qui entraîneraient les symptômes précédemment cités (Figure 8).

Sources	Number of subjects
Wi-Fi routers	34
Mobile phone base stations	28
Mobile phones	24
Digital cordless phones (DECT)	20
Electric home appliances	18
Fluorescent lamps	9
Computers (system units)	8
Screens (computer displays and TV sets)	6
Cars	4
Other	7

Figure 8 : Sources perçues des champs électromagnétiques par les personnes souffrant d'EHS (tiré de Dieudonné 2016)

Actuellement l'EHS n'est pas reconnue comme étant une maladie, entre autres à cause de l'interaction entre les aspects somatiques et psychologiques. Toutefois, le malaise des personnes souffrant d'EHS est pris en considération par les associations (Robin des Toits, Priartem, Une terre pour les EHS...) et par les agences gouvernementales (ANSES...).

### *1.6.1.3. Hypothèses formulées sur l'origine des symptômes décrits par les personnes souffrant d'électro-hypersensibilité*

Afin de comprendre l'origine des symptômes des personnes souffrant d'EHS, différentes hypothèses ont été formulées, explorant diverses voies physiologiques et psychologiques.

Une première hypothèse est l'implication des radicaux libres (Pall, 2013, 2014). Ces radicaux libres sont des molécules électroniquement instables en raison de la perte ou du gain d'un électron. Bien que de nombreux radicaux libres soient impliqués dans les voies métaboliques telles que la respiration cellulaire, un déséquilibre dans la synthèse de ces composés peut conduire à des désordres métaboliques. Lorsque la concentration de ces radicaux devient trop importante, la cellule est en état de stress oxydatif. Dans un tel état, les radicaux libres agressent les composants cellulaires pouvant, dans les cas les plus avancés, conduire à des maladies telles que la maladie d'Alzheimer (Cubinkova et al., 2018) ou la polyarthrite rhumatoïde (Quiñonez-Flores et al., 2016). Dans le cas de l'EHS, l'hypothèse repose sur l'observation de modifications de conformations de canaux ioniques voltage-dépendants sous l'action de champs électriques oscillants. L'induction d'un signal électrique erroné transmis aux canaux entraînerait l'ouverture ou la fermeture de ces canaux, ce qui conduirait à un déséquilibre électrochimique au niveau des membranes plasmiques. Une exposition aux CEM, de 50 Hz à 1100 MHz avec des durées de 30 à 60 minutes, induit une entrée des ions calcium dans la cellule, ce qui entraîne par voie métabolique la synthèse de monoxyde d'azote (NO) (Barbier et al.; Pall, 2013; Rao et al., 2008). Dans un deuxième temps, Pall émet comme sous-hypothèse que la production accrue de NO pourrait entraîner une synthèse de l'ion peroxy-nitrique (ONOO-) qui est à même de générer des radicaux libres (Pall, 2014). Par la suite, d'autres études ont été réalisées sur les liens entre les radicaux libres et les CEM. Il a été montré qu'une exposition de 24h à 1800 MHz, entraînait une augmentation de 8-hydroxyguanine (8-OHdG), qui est un marqueur des dommages oxydatifs faits à l'ADN (Xu et al., 2010). De même, une exposition de même fréquence mais avec des durées moindres (10 ou 20 minutes) entraîne une augmentation de la concentration de la malondialdéhyde ou de NO ainsi qu'une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase, de la myéloperoxidase et de la glutathione peroxidase dans le foie du cochon d'Inde (Ozgur et al., 2010).

La seconde hypothèse actuellement étudiée pour comprendre l'EHS est l'intoxication aux métaux lourds et plus largement l'intoxication aux polluants environnementaux. Ce

syndrome, portant le nom de TILT (Tolerant-induced Loss of Tolerance), a été décrit par Miller en 1997 et se déroule en deux grandes étapes. Dans un premier temps, la personne est exposée à un polluant environnemental (de manière aiguë ou chronique). Au cours de cette phase, l'organisme perd sa tolérance soit à l'égard du toxique, soit, d'une manière plus globale, aux contraintes chimiques. Dans un second temps, une seconde exposition au produit toxique entraîne des symptômes physiologiques ou cognitifs. Lors de l'apparition de ces symptômes, ceux-ci ne sont pas forcément immédiatement perçus par la personne. On parle alors de masquage. Les symptômes peuvent ensuite apparaître en cas d'aggravation ou de comorbidité. Dans le cas spécifique de personnes atteintes d'EHS, l'hypothèse serait le développement d'une sensibilisation initiale par les métaux lourds tels que le plomb, le zinc ou le cadmium provenant par exemple des amalgames dentaires et que la seconde phase serait une sensibilité aux CEM. La bioaccumulation de ces métaux se ferait alors en raison d'une mauvaise chélation (voie d'élimination des métaux) (Costa et al., 2010). Toutefois, une étude mesurant les concentrations des métaux lourds circulant chez des patients souffrant d'EHS par rapport à des patients non-EHS n'a pas montré de différence (Ghezel-Ahmadi et al., 2010).

Une troisième hypothèse a également été avancée et implique le système immunitaire. Dans ce cadre-là, deux possibilités sont étudiées. La première, formulée par Genuis and Lipp en 2012, présente un raisonnement similaire à celle du TILT, précédemment évoquée. Dans un premier temps, l'organisme est exposé à un toxique environnemental (physique ou chimique) ce qui entraîne par bioaccumulation une perte de la capacité normale d'adaptation du système immunitaire ainsi qu'une perte de l'immunotolérance. Dans un second temps, lors d'une exposition aux CEM, les effets de ces derniers seraient exacerbés et entraîneraient les symptômes dont les symptômes immunologiques ou immuno-dépendants des personnes souffrant d'EHS.

Suite à la déclaration de symptômes allergiques chez les personnes souffrant d'EHS, une hypothèse « allergique » a émergé. Cette hypothèse a été par la suite étayée par la découverte de la dégranulation des mastocytes en présence de CEM, libérant ainsi des médiateurs chimiques tels que l'histamine impliquée dans les phénomènes allergiques (Gangi and Johansson, 2000).

De nombreuses autres hypothèses ont été formulées telles que la modification du rythme circadien, la présence de marqueurs génétiques ou la perturbation de la production de neurotransmetteurs mais ne seront pas traitées dans ce document.

#### *1.6.2. Champs électromagnétiques et Santé*

Au vu des différents symptômes rapportés dans le cadre de l'EHS et de la variabilité de ces derniers d'un patient à l'autre, les recherches des potentiels effets des CEM présentent un large spectre thématique. Seront présentés ici des éléments de recherches en lien avec les symptômes régulièrement retrouvés. Les effets présentés ne prennent pas en compte ceux qui seront développés plus tard dans ce document (tel que le sommeil ou le système immunitaire).

##### *Effets thermiques*

Des effets biologiques liés à des effets thermiques des champs électromagnétiques ont été observés à des niveaux de DAS supérieurs ou égaux à 4 W/kg provoquant un effet de type réponse inflammatoire pour un DAS de 6 W/kg et un effet sur la plasticité cérébrale pour un DAS de 10 W/kg (ANSES, 2013).

##### *Champs électromagnétiques et système cardiovasculaire*

Concernant les impacts des CEM sur le système cardiovasculaire, les différentes études ont montré des effets lors d'une exposition aux ELF, mais pas lors d'une exposition aux radiofréquences (Lyskov et al., 2001; Sandström et al., 1997, 2003). Ainsi l'étude de Wilén a montré une fréquence cardiaque inférieure chez les personnes professionnellement exposées (27 MHz). De plus, une exposition aux CEM de hautes fréquences a montré être la cause d'une propension plus grande à avoir des maladies cardiaques et coronaires (Tikhonova et al., 2004). Concernant les radiofréquences, des exposition de 900 MHz à 1800 MHz sur le système cardiovasculaire n'ont pas montré d'effets (Braune et al., 2002; Mann et al., 1998; Tahvanainen et al., 2004).

##### *Champs électromagnétiques et système nerveux central*

Au cours d'une étude épidémiologique, 7 % des personnes ont attribué les migraines à une exposition aux CEM (Szyjkowska et al., 2005). Généralement, ces migraines sont associées à des sensations de fatigue et des difficultés de concentration (Hutter et al., 2006). Toutefois les

résultats concernant ce symptôme sont partagés, car il n'est pas toujours retrouvé (Santini et al., 2002) et parce qu'une exposition en laboratoire (902 MHz pendant 60 min) n'a montré aucune incidence sur ces migraines (Koivisto et al., 2001).

#### *Champs électromagnétiques et organes reproducteurs*

Du fait de la localisation de nos téléphones, générateurs de CEM, à proximité des organes reproducteurs, la fertilité et l'endocrinologie de la reproduction ont été étudiées. Une diminution de la fertilité due à une augmentation de l'apoptose des spermatozoïdes a été montrée lors d'une exposition aux CEM (Bernabò et al., 2007; Kim et al., 2009). Chez la femme, il a été observé une diminution de la croissance folliculaire (Cecconi, 2000) et une perturbation des cycles œstraux (Jung et al., 2007). Toutefois les études en laboratoires lors d'exposition aux radiofréquences restent controversées, les auteurs concluant soit à une diminution de la fertilité (Bin-Meferij and El-kott; Yan et al., 2007) soit une absence de variation (Dasdag et al., 2003; Imai et al., 2011).

#### *Effets moléculaires*

Une exposition aux ondes radiofréquences (respectivement 872 et 900 MHz de 1 à 5W/kg) entraînent la production de ROS (Luukkonen et al., 2009; Zeni et al., 2007) et par conséquent l'augmentation du stress oxydatif pouvant conduire à des variations histopathologiques, notamment au niveau de l'endomètre (Guney et al., 2007). Des fréquences similaires ont montré avoir un impact au niveau nucléaire, avec des ruptures des hélices d'ADN (Aitken et al., 2005; Diem et al., 2005).

Différentes études ont également porté sur les conformations protéiques et donc sur les protéines chaperonnes qui en sont responsables. Certaines de ces protéines chaperonnes, les HSP (Heat Shock Protein), sont des marqueurs de stress cellulaire, qu'il soit physique (comme la température) ou chimique. Elles ont pour rôle la régulation, le maintien et la protection des protéines auxquelles elles sont associées. Ainsi, une augmentation de HSP70 a été montrée lors d'une exposition à des fréquences d'exposition inférieures à 300 Hz (Goodman and Blank, 2002), et une augmentation de HSP27 à une fréquence de 900 MHz (Leszczynski et al., 2002).

En 2011 le CIRC a classé les champs électromagnétiques de type radiofréquence dans la catégorie 2B, donc potentiellement cancérigène pour l'homme (IARC, 2011).

Les études visant à comprendre les mécanismes sous-jacents de l'EHS sont toujours en cours et conduisent à une meilleure compréhension des personnes souffrant d'une exposition aux CEM. Toutefois, jusqu'à présent les instances réglementaires n'ont toujours pas statué en faveur d'un lien de causalité entre une exposition aux CEM et les symptômes observés.

## 2. Le sommeil

La première fonction physiologique présentée ici est le sommeil. A la suite des grandes caractéristiques physiologiques, les effets des champs électromagnétiques sur cette fonction seront exposés.

### 2.1. Généralités

Le sommeil se définit comme une modification naturelle et réversible des rapports sensitivo-moteurs que des stimuli internes ou externes peuvent faire cesser. Le sommeil est un impératif biologique auquel les mammifères, entre autres, ne peuvent échapper et qui est nécessaire dans de nombreux processus de récupération physiologique et psychologique cellulaire (Diekelmann and Born, 2010; Ferrara and De Gennaro, 2001; Hobson, 1989; Wesensten et al., 1999). Le sommeil est en particulier impliqué dans les processus cognitifs et de mémorisation (Palagini et al., 2017; Tononi and Cirelli, 2003), dans la régulation du système immunitaire (Everson, 1993), la régénération tissulaire (Adam and Oswald, 1977) et les sécrétions hormonales (Van Cauter et al., 1998).

Le sommeil présente un caractère essentiel pour l'organisme. L'absence totale de sommeil le conduit dans un état hypercatabolique pouvant mener à la mort en 19 jours chez les rongeurs (Everson et al., 1989; Rechtschaffen et al., 1983).

### 2.2. Stades de sommeil

A la fin des années 50, il a été démontré grâce aux techniques de polysomnographie que le sommeil pouvait être caractérisé en divers états de vigilance. Le sommeil se présente comme une alternance de deux états, le sommeil à ondes lentes (SOL) et le sommeil paradoxal (SP). Les états de vigilance sont habituellement discriminés selon trois variables physiologiques : la fréquence d'oscillation de l'électroencéphalogramme (EEG), le tonus musculaire donné par l'électromyogramme (EMG) et les mouvements oculaires enregistrés par l'électro-oculogramme (EOG). Les caractéristiques des principaux stades sont décrites dans le Tableau 5.

<i>Caractéristiques</i>	<i>Eveil</i>	<i>Micro-éveil</i>	<i>Sommeil à ondes lentes</i>	<i>Sommeil paradoxal</i>
<i>Terme anglais</i>	Active Wake / Wakefulness (AW)	Quiet-Wakefulness (QW)	Non Rapid Eye Movement (NREM)	Rapid Eye Movement (REM)
<i>EEG</i>	Activité rapide	Activité rapide	Activité lente et ample	Activité rapide
<i>EMG</i>	Tonus musculaire important	Tonus musculaire réduit	Tonus musculaire réduit	Tonus musculaire absent - atonie
<i>EOG</i>	Yeux ouverts et mouvements oculaires rapides	Yeux ouverts et mouvements oculaires rapides	Yeux fermés, pas de mouvement oculaire	Yeux fermés, mouvements oculaires rapides
<i>Caractéristiques spectrales de l'EEG</i>	Faible dans la bande $\delta$ (0,5-4 Hz) Moyenne dans la bande $\theta$ (5,5-9 Hz)	Faible dans la bande $\delta$ (0,5-4 Hz) Moyenne dans la bande $\theta$ (5,5-9 Hz)	Elevée dans la bande $\delta$ (0,5-4 Hz) Bouffées d'ondes dans la fréquence $\sigma$ (11-16 Hz)	Elevée dans la bande $\theta$ (5,5-9 Hz)

Tableau 5 : Caractéristiques des différents états de vigilance (Bjorvatn et al., 1998; Gaztelu et al., 1994; Green and Arduini, 1954)

L'éveil est l'état de conscience induit par une stimulation directe ou indirecte du cortex via le thalamus par un système excitateur ascendant. Il existe de nombreux systèmes redondants les uns avec les autres tels que le système cholinergique du télencéphale basal, les noyaux sérotoninergiques du raphé ou les noyaux histaminergiques tubéromamillaires revue dans (de Lecea, 2012). En 1917, Von Economo a découvert qu'une régulation de la vigilance était opérée par l'hypothalamus et que sa lésion pouvait entraîner une somnolence excessive ou une insomnie. En étudiant les lésions, Jouvet a pu faire le lien entre une altération de la partie

postérieure de l'hypothalamus et la somnolence et entre la partie antérieure de l'hypothalamus et l'insomnie (Jouvet, 1972).

Le sommeil est divisé en deux phases et commence habituellement par une phase de sommeil à ondes lentes chez l'adulte. Le système neural inducteur de cet état se situe dans la région préoptique latérale et est constitué de neurones GABAergiques inhibiteurs (Anaclet and Fuller, 2017; Gallopin et al., 2005). Ces neurones, actifs lors des stades de sommeil sont inhibés lors de l'éveil sous l'action de l'acétylcholine, de l'adrénaline, de la noradrénaline et de la sérotonine (Gallopin et al., 2000). Cette phase de sommeil permet la récupération de la fatigue physique. C'est la dénomination anglaise, Non Rapid Eye Movement qui sera utilisée dans la suite de ce document.

La seconde phase de sommeil est le sommeil paradoxal. Il tire son nom du fait de la présence de caractéristiques d'éveil (EEG rapide, mouvement oculaire) (Renaud, 1988). Ce sont ces mouvements oculaires qui lui ont donné sa dénomination anglaise, Rapid Eye Movement Sleep (REM), qui sera utilisée dans ce document. Le sommeil paradoxal est habituellement considéré comme étant la phase de récupération des fonctions cognitives et nerveuses, et permet la consolidation de la mémoire comme revu dans (Siegel, 2001).

Concernant le rat, les caractéristiques des différents stades se trouvent dans le Tableau 5 : Caractéristiques des différents états de vigilance (Bjorvatn et al., 1998; Gaztelu et al., 1994; Green and Arduini, 1954) Tableau 5.

La discrimination des stades de sommeil permet de différencier les cycles de sommeil et d'obtenir l'architecture globale de celui-ci sous la forme d'un hypnogramme. Cet hypnogramme montre l'enchaînement des épisodes de sommeil afin d'avoir leurs durées moyennes et l'heure de leurs incidences.

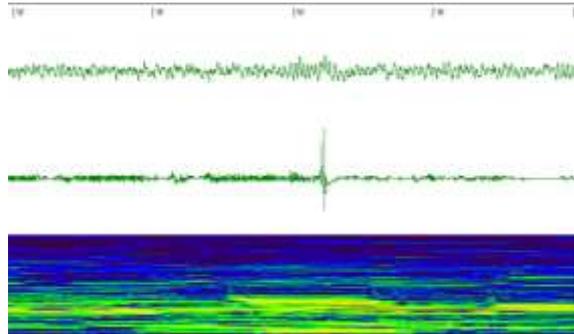
Il existe une seconde méthode d'analyse du sommeil qui se base sur l'analyse fréquentielle afin d'obtenir l'énergie spectrale mais qui ne sera pas développée ni utilisée dans ce document.

## Eveil

EEG : forte activité

EMG : forte activité (mouvement du rat)

Energie fréquentielle de l'EEG : ondes  $\delta$  et  $\theta$

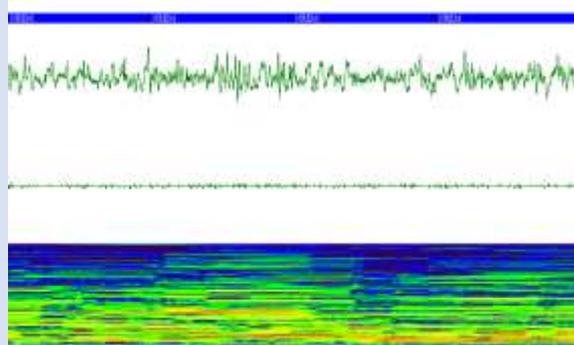


## Sommeil à ondes lentes - NREM

EEG : grande amplitude, fréquence faible

EMG : activité musculaire réduite

Energie fréquentielle de l'EEG : ondes  $\sigma$  et  $\delta$

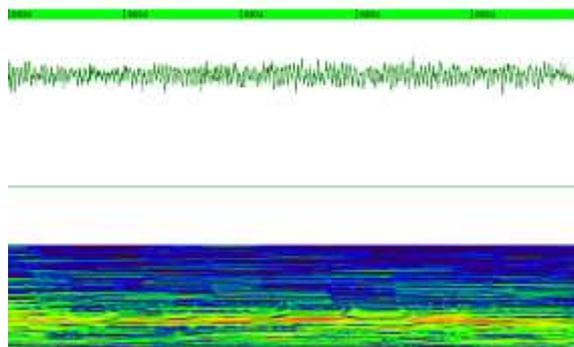


## Sommeil paradoxal - REM

EEG : activité rapide et régulière, en « dent de scie »

EMG : atonie musculaire

Energie fréquentielle de l'EEG : ondes  $\theta$



## Micro-éveil

EEG : diminution temporaire

EMG : présence ou non de mouvement

Energie fréquentielle de l'EEG : ondes  $\delta$  et  $\theta$

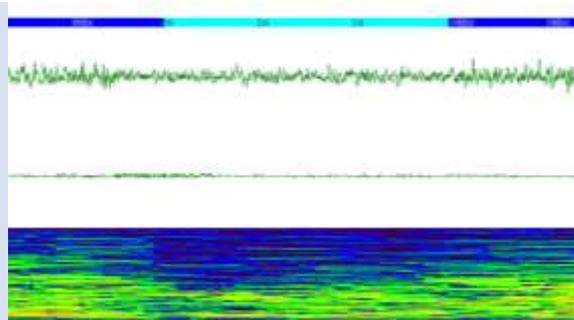


Tableau 6 : Tracés et caractéristiques de l'EEG, de l'EMG et de la puissance spectrale de l'EEG des états de veille du rat

### 2.3. Effets des champs électromagnétiques sur le sommeil

Les troubles du sommeil sont les principaux symptômes décrits par les personnes souffrant d'EHS. D'autre part, Santini a montré que le nombre de plaintes de troubles du sommeil chez les riverains d'antennes relais était plus important que chez des personnes plus éloignées de ces antennes (Santini et al., 2002).

Des études épidémiologiques ont montré que les troubles du sommeil avaient une prévalence de 42,7 % à 62 % (Frick et al., 2002; Hagström et al., 2013; Schooneveld and Kuiper, 2008; Schreier et al., 2006). Toutefois, parmi ces études, celles de Frick et de Schreier, ayant des prévalences des troubles du sommeil respectives de 42,7 et 43,1 %, ne montrent pas de différence de prévalence entre les personnes souffrant d'EHS et les personnes ne souffrant pas d'EHS. Dans le cas de troubles pathologiques du sommeil, des études ont montré une prévalence accrue (de 25 % à 65 %) chez les personnes souffrant d'EHS par rapport aux personnes non-EHS (de 4 % à 13 %) (Johansson et al., 2010a; Rösli et al., 2004, 2010). En parallèle, une étude qualitative du sommeil a été faite selon l'index de Pittsburg (étude subjective de la qualité du sommeil) et a montré que les personnes souffrant d'EHS avaient une qualité de sommeil moindre par rapport aux non-EHS (Landgrebe et al., 2009).

Différentes études ont été menées en laboratoire afin de voir les impacts d'une exposition aux CEM sur le sommeil. Une exposition aux EBF sur 18 sujets sains (50 Hz, 1  $\mu$ T pendant une nuit) a montré une diminution du temps total de sommeil ainsi qu'une diminution du nombre d'épisodes de NREM sans toutefois montrer de variation au niveau des concentrations plasmatiques de mélatonine, d'hormone de croissance, de cortisol et d'ACTH (Åkerstedt et al., 1999). Une autre étude n'a pas montré de variation du sommeil si une exposition à 60 Hz était faite en continu. En revanche, lors d'une exposition intermittente (alternance d'une heure exposée avec une heure non exposée), les sujets présentaient une diminution du temps total de sommeil, une augmentation du nombre de sommeil de stade 2 (sous division du NREM chez l'Homme) et une diminution du REM (Graham and Cook, 1999).

Dans le cadre d'une exposition aux ondes radiofréquences, Mann and Röschke (1996) ont montré qu'une exposition de sujets adultes à une fréquence de 900 MHz pendant 8h (pendant la période de sommeil) entraînait une diminution de la quantité de REM sans que les autres

stades ne soient affectés. Selon les auteurs, cette diminution pourrait venir de l'augmentation de la latence d'apparition du REM, qui n'était toutefois pas significative. La puissance spectrale du REM était également altérée, avec une augmentation au niveau de bandes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  (respectivement 7,5-12,5 Hz et 12,5-15 Hz). Une autre étude, réalisée dans des conditions similaires, n'a pas été concluante quant aux variations spectrales, bien que les variations architecturales au niveau du REM soient visibles (Wagner et al., 1998). A l'inverse, différentes études ont montré qu'une exposition aux CEM (900 ou 884 MHz pendant 1 à 9 nuits, DAS 1,4 à 2 W/kg) entraînait une variation de la puissance spectrale de l'EEG avec une modulation à 14 Hz sans pour autant présenter d'altération générale de l'architecture hypnique (Danker-Hopfe et al., 2011; Lowden et al., 2011; Schmid et al., 2012).

Des hommes adultes exposés de manière intermittente pendant une nuit à une fréquence de 900 MHz (CEM avec un cycle ON-OFF de 15min, DAS 1 W/kg) ont montré une augmentation de la puissance spectrale du NREM, sans variation de la puissance spectrale de l'EEG pendant le REM. Il a également été montré que le risque de réveil après l'endormissement initial était significativement diminué chez les personnes exposées. Les auteurs en ont conclu que les effets observés étaient de l'ordre d'une « chaîne d'évènements » plutôt que des effets directs et immédiats (Borbély et al., 1999).

Une étude, menée dans notre laboratoire sur le rat à une fréquence équivalente aux études précédentes (900 MHz, 1 V.m<sup>-1</sup> pendant 5 semaines), a montré une fragmentation du REM chez les animaux exposés (Pelletier et al., 2013). Deux études, également chez le rat, ont porté sur les effets d'une exposition à 1,8 et 2,45 GHz. Aucune de ces deux fréquences n'a montré de variation de l'architecture du sommeil ou de la puissance spectrale (Crouzier et al., 2007a, 2007b).

### 3. Le système immunitaire

La seconde fonction étudiée au cours de ce travail est le système immunitaire. Une introduction à ce domaine et les études ayant déjà portées sur les effets des champs électromagnétiques sur celui-ci sont exposés ci-dessous.

#### 3.1. Généralités

Le terme immunité, du latin *immunis* (libre de), initialement utilisé pour désigner la résistance aux infections microbiennes, s'est par la suite étendu à l'ensemble des actions de protection du « soi » contre les attaques physiques, l'invasion des micro-organismes pathogènes mais également contre ses propres éléments altérés tels que les cellules cancéreuses. Il est capable de générer, dans l'objectif de conserver l'intégrité de l'organisme, de grandes variétés de cellules et de molécules qui permettent de reconnaître ou d'éliminer spécifiquement l'élément considéré comme étranger ou du « non-soi ». Ces cellules et molécules agissent ensemble dans un réseau dynamique dont la complexité rivalise avec celle du système nerveux.

D'un point de vue fonctionnel, la réponse immunitaire se déroule en deux phases : la reconnaissance des éléments étrangers puis la réponse à cette intrusion. La reconnaissance immunitaire est un phénomène extrêmement spécifique qui utilise les antigènes de surface des cellules, ce qui permet de distinguer les pathogènes étrangers par rapport aux cellules du soi et d'adapter la réponse immunitaire à mettre en place. Une fois qu'un organisme étranger est reconnu, le système immunitaire met en place une réponse effectrice par l'intermédiaire de nombreuses cellules et molécules, dans le but d'éliminer ou de neutraliser l'organisme. Lors d'une première exposition à un organisme étranger, le système immunitaire induit une réponse mémoire, qui permettra lors d'une seconde exposition, une réaction immunitaire plus rapide et renforcée.

Toutefois la plupart des agents infectieux environnementaux avec lesquels un individu peut être mis en contact ne pénètre pas dans l'organisme en raison de la présence de barrières naturelles : anatomiques (peau et autres muqueuses qui empêchent l'entrée mécanique des agents pathogènes), physiologiques (température, pH, médiateurs chimiques tels que les lysozymes), phagocytaires (par internalisation des macromolécules ou des pathogènes) et des

processus inflammatoires (par l'intermédiaire de protéines sériques qui permettent le recrutement de cellules phagocytaires).

### 3.2. Réponses immunitaires

Les différents types de réponse se répartissent en deux phénomènes immunitaires distincts. L'immunité innée (dite également spontanée ou naturelle) et l'immunité adaptative. Ces deux phénomènes se distinguent par leur spécificité. L'immunité adaptative, qui est spécifique dans sa reconnaissance de l'agent pathogène et de la mise en place d'une mémoire immunitaire et l'immunité, qui présente un large spectre mais sans spécificité ni mémoire.

#### 3.2.1. Immunité innée

L'immunité innée est le premier phénomène de défense de l'organisme. Il intervient dans la limitation de l'invasion des pathogènes, grâce à un rôle primordial des barrières anatomiques et physico-chimiques. Les réponses immunitaires innées, mettant en jeu une réponse cellulaire, sont initiées dans les minutes suivant la pénétration des agents pathogènes dans l'organisme. Les cellules impliquées sont les monocytes, les cellules Natural Killer (NK), les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles.

En fonction du type d'infection, le système immunitaire active les macrophages pour phagocyter les pathogènes ou activer les cellules NK afin de lyser les cellules infectées par l'intermédiaire de perforines. Les cellules dendritiques, qui permettent de fixer les pathogènes, favorisent la phagocytose mais également activent les cellules productrices de cytokines qui induisent l'inflammation. L'activation des récepteurs de surface présents sur les cellules permet la production de protéines ou le recrutement de liquides, cellules et molécules dans la zone infectieuse. Les cellules dendritiques permettent également d'initier la réponse immunitaire adaptative (Figure 9) (Kuby, 1997).

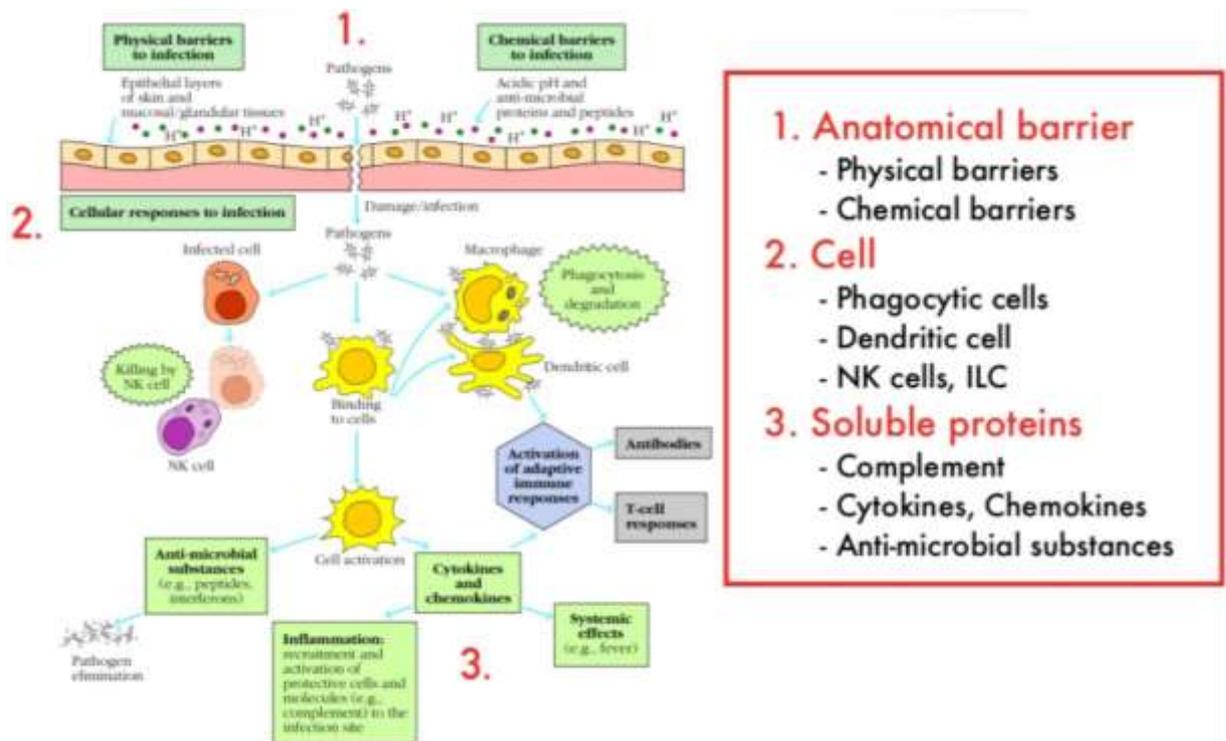


Figure 9 : Composants du système immunitaire inné (Kuby, 1997)

### 3.2.2. Immunité adaptative

En plus de l'immunité innée, l'organisme est également capable de se défendre à travers le développement d'un ensemble de mécanismes de défenses immunitaires spécifiques et extrêmement puissants. On parle alors d'immunité acquise ou « immunité adaptative ».

L'immunité adaptative fonctionne selon quatre grandes caractéristiques : la spécificité antigénique, la diversité des anticorps, la mémoire immunologique vis-à-vis d'un antigène et la reconnaissance du « soi » et du « non-soi »

L'extrême spécificité de l'immunité adaptative permet la distinction de deux antigènes n'ayant qu'un acide aminé de différent. Une fois que le système immunitaire a fait la distinction entre ces antigènes (Ag), une mémoire antigénique se met en place en même temps que la réponse elle-même. Cette mémoire permettra, dans le cadre d'une seconde infection par le même pathogène, d'avoir une réponse plus rapide et plus importante.

L'immunité acquise et l'immunité innée ne sont pas indépendantes l'une de l'autre. Comme indiqué dans la Figure 10, les cellules dendritiques servent de lien entre les deux systèmes. En effet, le bon fonctionnement de l'immunité acquise se fait grâce à la coopération entre les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) dont font partie les cellules dendritiques

et les lymphocytes, qu'ils soient de type B ou T. La CPA présente l'antigène, qu'elle aura au préalable fixé sur ses récepteurs membranaires, aux lymphocytes afin que ceux-ci puissent être mis en action (Figure 10).

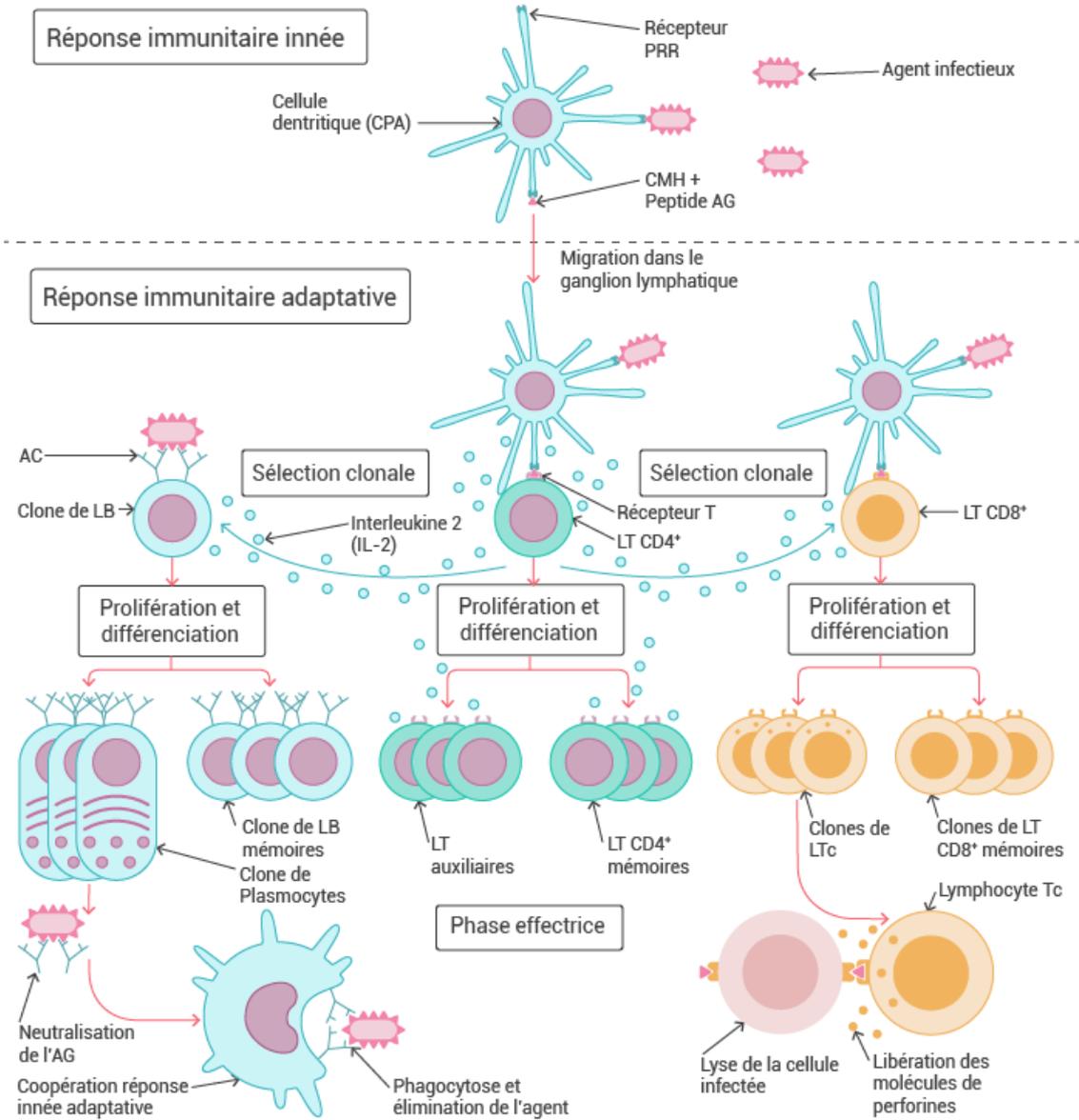


Figure 10 : Lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise par les cellules dendritiques (Kuby, 1997)

### 3.2.2.1. Cellule présentatrice de l'antigène

Ces cellules spécialisées, qui englobent les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques présentent deux propriétés essentielles : l'expression membranaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et la capacité de co-stimuler le lymphocyte T<sub>Helper</sub> à qui va être présenté l'Ag. Les lymphocytes seront détaillés par la suite.

Lors de la mise en contact entre un pathogène et une CPA, celle-ci internalise l'élément étranger par phagocytose ou par endocytose. L'épitope de l'Ag internalisé va alors former un complexe avec le CMH. Ce complexe migre ensuite au niveau membranaire afin qu'il soit « présentable » aux autres cellules et que la liaison avec le T-cell receptor (TCR) puisse s'effectuer.

En fonction de la nature du pathogène internalisé, la liaison entre l'épitope et le CMH se fera, soit avec le CMH de type 1 (CMH I), soit avec le CMH de type de 2 (CMH II). Le CMH I est utilisé pour présenter les épitopes ingérés par la CPA alors que le CMH II permet la présentation de cellules qui ont été infectés par un virus (Figure 11).

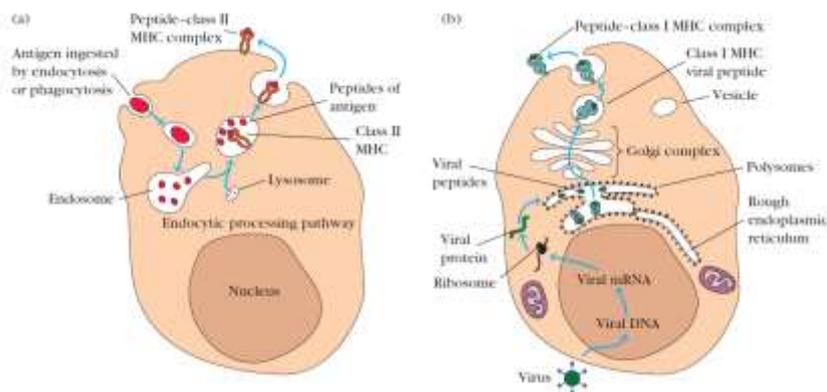


Figure 11 : Processus d'expression membranaire du complexe formé entre les CMH et l'antigène (Kuby, 1997)

Cette variation dans le complexe présentateur conditionne la cellule cible qui pourra par la suite se fixer sur ce complexe. Si le complexe formé met en action le CMH I, la CPA pourra réaliser une liaison avec un lymphocyte  $T_{\text{cytotoxique}}$  car présentant le récepteur CD8. Si le complexe est formé avec le CMH II, la liaison se fera avec un lymphocyte  $T_{\text{Helper}}$  car présentant le récepteur CD4 (Figure 12).

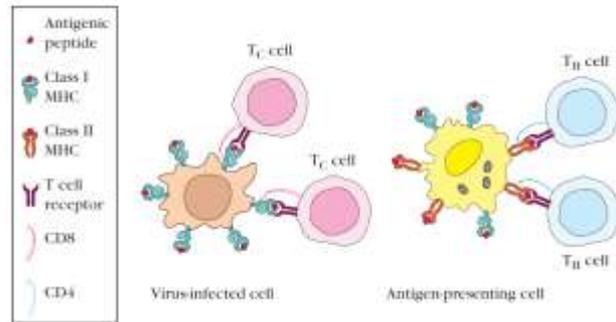


Figure 12 : Rôle du type de classe de CMH dans la reconnaissance par le Lymphocyte T (Kuby, 1997)

### 3.2.2.2. *Lymphocyte T*

Les lymphocytes T sont issus des cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moelle osseuse des os longs, la moelle étant le premier organe lymphoïde primaire. Dans la moelle osseuse, les premiers marqueurs membranaires à apparaître sont c-Kit (aussi appelé CD117, récepteur pour les facteurs de croissance des cellules souches), CD44 (récepteur permettant l'interaction cellule-cellule et l'activation lymphocytaire) ou CD25 (récepteur de l'IL-2). Afin d'acquérir leur maturité, les progéniteurs ou pro-thymocytes migrent vers le thymus, l'autre organe lymphoïde primaire, en passant par la circulation sanguine.

Une fois que les pro-thymocytes ont réalisé leur migration de la moelle osseuse vers le thymus, les cellules localisées dans le cortex prolifèrent lentement. A leur arrivée dans le thymus, les cellules sont appelées « double négatif » ou « thymocytes multipotents » en raison de l'absence des clusters de différenciation (CD) mais également de l'absence du TCR. Ces cellules seront à même de devenir des lymphocytes T, des cellules NK et des cellules dendritiques.

La première étape ayant lieu dans le thymus est une étape de réarrangement des gènes du TCR. Cette étape de réarrangement se fait suite à l'activation de l'expression des gènes Recombinant Activating Genes RAG-1 et RAG-2. Le premier réarrangement est celui des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR. Ces premiers réarrangements permettent l'apparition du CD3, qui est un CD formant le TCR. Viennent ensuite la synthèse des chaînes TCR- $\alpha$  et TCR- $\beta$ . Les cellules qui ne seront pas capables de synthétiser ces chaînes, seront éliminées. La chaîne TCR- $\beta$  et la chaîne pré-T- $\alpha$  s'associent avant de s'adjoindre au CD3 pour former le pré-TCR. Une fois le TCR complet, ce dernier stimule la prolifération de ces cellules, l'expression de CD54 et celle de CD8.

A la suite de cette étape de synthèse des marqueurs membranaires, les thymocytes sont alors double positifs, car ils expriment à leur surface le CD4 et le CD8 (cellules CD4+/CD8+).

Au cours de cette maturation dans le thymus, appelée également ontogénèse primaire, le lymphocyte T acquiert le TCR impliqué dans la liaison entre le lymphocyte et la CPA, et associé aux différents CD. La maturation au sein du thymus se déroule en deux étapes, une sélection positive et une sélection négative.

La sélection positive permet de ne conserver que les cellules exprimant un TCR et donc capables de reconnaître les cellules du soi exprimant un CMH autologue. Cette sélection a lieu dans le cortex de l'organe et met en œuvre l'interaction des thymocytes immatures avec les cellules épithéliales. Au cours de cette sélection, les cellules capables de se fixer au CMH de la cellule épithéliale avec une faible affinité seront conservées grâce à la transmission d'un signal de survie tandis que les cellules se fixant avec une forte affinité ou ne se fixant pas seront détruites par apoptose. L'apoptose des cellules ayant une trop forte affinité avec le CMH, est un des prémices de la sélection négative. Cette étape de maturation va également permettre d'obtenir des cellules « simple positif » soit CD4 (CD4+/CD8-) soit CD8 (CD4-/CD8+). Lors de la sélection positive, les thymocytes peuvent se fixer indifféremment à un CMH I ou à un CMH II. Si le TCR se lie à un CMH I, l'expression du CD4 est arrêtée tandis que celle du CD8 est augmentée. Réciproquement, lors de la fixation à un CMH II, le CD8 n'est plus exprimé tandis que CD4 est accru. A cette étape de maturation, on commence également à voir la distinction entre les sous-populations de lymphocytes T : les lymphocytes T auxiliaires ou « Helper » ( $T_{\text{Helper}}$ ) et les lymphocytes T cytotoxiques ( $T_{\text{Cytotoxiques}}$ ). Une des distinctions entre ces populations est la présence de glycoprotéines membranaires CD4 ou CD8 sur la surface et qui permettent une liaison spécifique avec le CMH I ou le CMH II, les lymphocytes  $T_{\text{Helper}}$  exprimant le CD4 et les lymphocytes  $T_{\text{Cytotoxiques}}$  le CD8.

La seconde sélection, dite « sélection négative », permet d'éliminer les cellules qui réagissent de manière trop importante envers les cellules ou les peptides du soi. Cette seconde sélection, qui se déroule dans la médulla de l'organe, permet également la création d'un répertoire de cellules tolérantes au soi. Pendant cette étape de maturation, les macrophages et les cellules dendritiques présentent les CMH I et CMH II aux thymocytes. Si un thymocyte entre en interaction avec ces cellules avec une trop forte affinité, ces dernières délivrent alors un signal conduisant à l'apoptose de la cellule (Figure 13).

Une fois ces étapes de maturation terminées, les cellules dites « naïves » regagnent la circulation sanguine.

Une ontogénèse secondaire est faite dans un organe lymphoïde secondaire au moment où la cellule naïve est mise en contact et activée par un antigène. Lors de la présentation d'un antigène par une CPA, il y a initiation d'une « réponse primaire » entraînant l'augmentation en taille de la cellule appelée désormais un blast. La synapse immunologique qui est le nom du complexe formé entre la liaison du TCR, du CMH et du CD4 ou CD8, entraîne la stimulation de la cellule. Cette stimulation passe par la phosphorylation des kinases intracellulaires du CD3, ou par la co-stimulation qui est le fruit de l'interaction entre CD28 et le récepteur B7 (présent sur la surface de la CPA). Une fois activée, la cellule entre dans une phase de prolifération et de différenciation. De cette différenciation seront obtenus les lymphocytes  $T_{\text{cytotoxiques}}$  activés, les lymphocytes  $T_{\text{H-1}}$  qui sécréteront IL-2, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , les  $T_{\text{H-2}}$  qui sécréteront IL-4, IL-6 et IL-10 et les  $T_{\text{H-17}}$  sécrétant l'IL-17 et l'IL-22. Les  $T_{\text{H-1}}$  ont pour rôle la prolifération des cellules effectrices et des cellules mémoires, tandis que les  $T_{\text{H-2}}$  ont pour rôle l'activation des lymphocytes B (Figure 10).

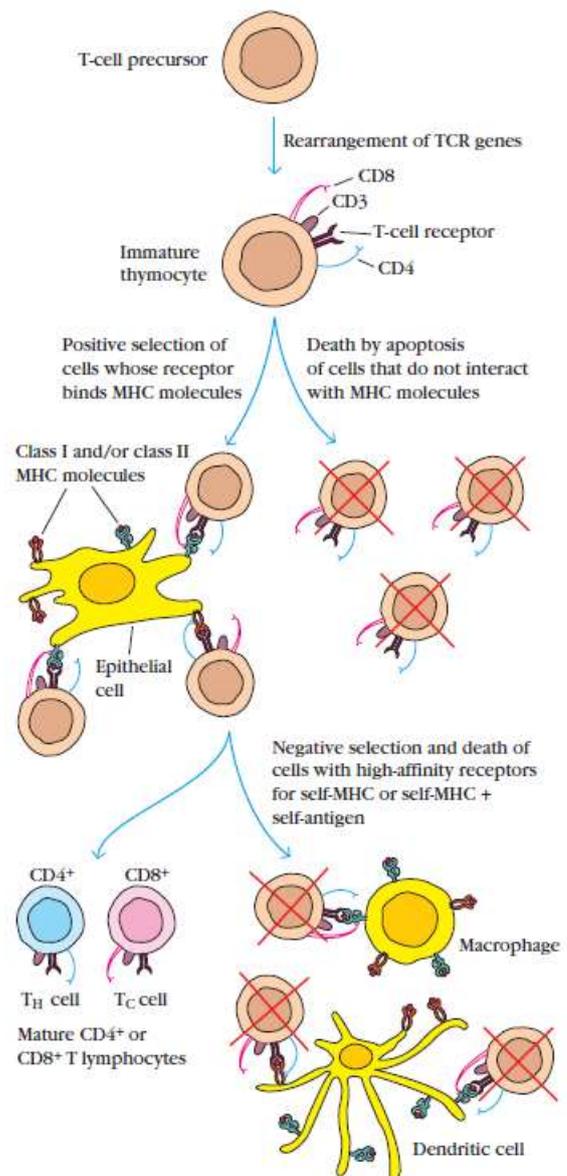


Figure 13 : Sélection positive et négative des thymocytes dans le thymus (Kuby 1997)

### 3.2.2.3. *Lymphocyte B*

A l'instar des lymphocytes T, les lymphocytes B dérivent également des CSH de la moelle osseuse. Toutefois, à l'encontre des lymphocytes T, leur maturation se fait au niveau de la moelle osseuse. Le premier stade de différenciation, transforme la CSH en un progéniteur pro-B précoce puis pro-B qui exprime le CD45R. Les cellules pro-B prolifèrent dans la moelle osseuse avant de se différencier en cellule pré-B grâce au micro-environnement des cellules stromales. Ces cellules stromales permettent la stimulation des cellules non seulement par contact direct grâce aux facteurs d'adhésion tels que VLA4 (chez la cellule pré-B) et VCAM-1 (sur la cellule stromale), mais également en sécrétant de l'IL-7. Cette dernière a pour rôle le déclenchement des futures différenciations mais aussi la régulation négative des facteurs d'adhésion qui entraînent le détachement des cellules stromales.

A l'instar des lymphocytes T qui présentaient le TCR, les lymphocytes B présentent le B-cell receptor (BCR). Pour exprimer ce récepteur de manière transmembranaire, celui-ci subit un ensemble de réarrangements des gènes qui conduit à l'apparition de l'IgM.

A ce stade, les cellules sont considérées comme immatures donc non activées. Les cellules naïves passent, comme les Lymphocytes T, une étape de sélection négative qui va entraîner la mort des cellules ayant soit une trop forte affinité pour le CMH, soit une absence d'affinité pour le CMH. Cette sélection permet de détruire les cellules des auto-anticorps dirigés contre les composants du soi de la moelle osseuse. Afin que la cellule soit dite « mature », il faut que celle-ci exprime en plus de l'IgM, l'IgD qui est obtenu par épissage alternatif.

Les Lymphocytes B matures migrent alors dans un centre germinatif de la rate où ils sont activés. Une fois activés, ils vont alors entrer en phase de prolifération intensive conduisant à la production de cellules effectrices (des plasmablastes) ou de cellules mémoire (ratio 4:1). En parallèle, s'opère la commutation de classe qui permet la modification de la conformation de l'immunoglobuline qui permet d'exprimer les IgG, IgA et IgE.

Les plasmablastes sont ensuite réactivés par les Lymphocytes T<sub>Helper-2</sub> et remigrent vers la moelle osseuse où ils se transformeront en plasmocytes matures, n'exprimant plus d'immunoglobulines membranaires mais capables de libérer les anticorps pour lesquels ils ont été activés. Ces anticorps seront alors à même de neutraliser le pathogène et de favoriser son élimination.

L'allergie, qui est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'une substance normalement inoffensive et appelée allergène (par exemple du pollen, des squames, des produits chimiques, des aliments...) est un cas particulier de réponse immunitaire. Une fois l'allergène présenté par la CPA au lymphocyte B, celui-ci interagit avec un plasmocyte qui produit une importante quantité d'IgE. Ces IgE ont la capacité de se fixer sur les mastocytes. Lors d'une seconde exposition à l'allergène, le mastocyte libère alors d'importantes quantités de médiateurs tels que la sérotonine et l'histamine. Cette dernière agit ensuite sur les capillaires sanguins comme vasodilatateur et augmente la perméabilité mais agit également sur la contraction des muscles lisses du système respiratoire.

### 3.3. Effets des champs électromagnétiques sur le système immunitaire

Les résultats d'exposition à des EBF quant aux variations des cellules immunitaires ne sont pas consensuels. Une étude menée sur des cultures de lignées immortalisées n'a pas montré de variation du nombre et du fonctionnement des neutrophiles suite à des expositions de 50 Hz allant de 30 min à 4h (Bouwens et al., 2012; Golbach et al., 2015). Les études menées chez des adultes professionnellement exposés ont montré soit une augmentation du nombre de cellules NK (exposition à 50 Hz 8h/j de 1 à 5 ans) (Bonhomme-Faivre et al., 1998, 2003; Tuschl et al., 2000), soit une diminution (exposition de 50 Hz, 40 à 120 V.m<sup>-1</sup>, 20h par semaine) (Boscolo et al., 2001; Del Signore et al., 2000; Di Giampaolo et al., 2006). Gobba a montré en 2009 un nombre constant de cellules NK après exposition aux EBF (3j, 8h/j), avec toutefois une diminution de l'activité lytique de ces cellules. Chez l'animal, il a été montré qu'une exposition de 13 semaines à 60 Hz entraînait une réduction voire une suppression de l'activité des cellules NK (House and McCormick, 2000; House et al., 1996). Enfin, une étude pendant laquelle des rats ont été exposés pendant trois mois à une fréquence de 50 Hz, n'a pas montré d'effet au niveau de la concentration sérique d'IL-4, d'IL-6, d'IFN $\gamma$ . Toutefois dans le cas d'une stimulation *in vivo*, une augmentation de la production d'IL-6 était observée (Salehi et al., 2013).

Dans le cadre d'une exposition professionnelle aux radiofréquences (6 à 12 GHz durée non indiquée), Dmoch and Moszczyński (1998) ont montré une augmentation de la concentration d'IgG et d'IgA, ainsi qu'un nombre accru de lymphocytes (en raison d'une augmentation des lymphocytes T) chez des personnes travaillant dans des centres de transmissions télévisuelles ou des centres satellitaires. De même, dans le cadre de travailleurs au niveau de stations radars, il a été observé une augmentation des lymphocytes IgM<sup>+</sup> et une diminution des lymphocytes T<sub>cytotoxiques</sub> (Moszczyński et al., 1999). Des résultats similaires, concernant les lymphocytes IgM<sup>+</sup> et les IgG<sup>+</sup> ont été retrouvés après une exposition à 170 MHz sans toutefois montrer de variation du nombre des lymphocytes IgA<sup>+</sup> (Yuan et al., 2004a).

Après l'injection de cellules de moelle osseuse issues de souris exposées aux CEM (900 MHz 2 W/kg, 2 h/jour, 5 jours/semaine pendant 4 semaines), les animaux receveurs n'ont pas montré de variation du nombre de cellules thymiques et de la fréquence de différenciation à 3 et 6 semaines post-injection. De même, au niveau de la rate, le pourcentage des

lymphocytes B et T, leur prolifération et la production d'IFN $\gamma$  n'ont pas été modifiés (Prisco et al., 2008a).

Une autre série d'études a été menée sur les impacts d'une exposition à 900 MHz ou 2,45 GHz (1 ou 2 W/kg) sur le système immunitaire de souris (souche C57BL/6). Sur ces souris adultes, une exposition pendant 2h, allant de 1 à 4 semaines, n'a montré aucun effet sur le nombre de cellules spléniques ni sur les sous-populations de lymphocytes T. La prolifération et la production de cytokines suite à une activation par des Ac monoclonaux n'ont pas été altérées chez les animaux exposés aux CEM. De même, cette exposition n'induisait pas de différence entre les concentrations d'IgM et d'IgG dans le sérum (Gatta et al., 2003; Nasta et al., 2006).

Les effets d'une exposition chronique aux CEM sur un modèle murin ont été évalués en fonction de la fenêtre d'exposition. L'exposition a été réalisée durant les périodes *in utero* ou postnatale (respectivement pendant les 15 derniers jours de grossesse ou les cinq premières semaines de vie). Le système immunitaire des trois populations (mères, souriceaux exposés *in utero* et souriceaux exposés après la naissance) ne présentait pas d'altération au niveau des paramètres suivants : nombre de cellules thymiques, sous-populations lymphocytaires, prolifération thymique, nombre de lymphocytes B spléniques, prolifération des Lymphocytes B, production d'anticorps (IgM et IgG) et de cytokines (IL-2 et IFN $\gamma$ ). Seuls les souriceaux exposés après la naissance ont présenté une diminution de la production d'IFN $\gamma$  (Laudisi et al., 2012; Sambucci et al., 2010, 2011).

Concernant l'hypothèse allergique, Gangi et Johansson montrent que les CEM entraînent une dégranulation des mastocytes qui a pour conséquence la libération de médiateurs chimiques dont l'histamine. Cette affirmation fait suite aux études réalisées aussi bien chez l'Homme que sur des mastocytes issus de l'animal après une exposition aux EBF ou aux radiofréquences (50 Hz de 2 à 32 kA/m 4 h/j pendant 5j et 835 MHz, 8,1 W/cm<sup>2</sup>, 20 min/j pendant 7j) (Donnellan et al., 1997; Iurina et al., 1997; Johansson et al., 2001).

D'après l'ANSES, à l'heure actuelle, les éléments scientifiques ne permettent pas de conclure quant à un effet spécifique des CEM sur le système immunitaire ou sur l'un de ses composants.

## 4. Le métabolisme

Certains éléments du métabolisme seront étudiés au cours de ce projet. Ces derniers et les études précédemment effectuées avec une exposition aux champs électromagnétiques sont évoqués ici.

### 4.1. Le comportement alimentaire

Le comportement alimentaire est l'ensemble des agissements d'un organisme vis à vis de la consommation d'aliments. Le comportement alimentaire est une part importante de l'homéostasie énergétique particulièrement pendant la croissance, période pendant laquelle l'organisme doit répondre à l'accroissement des besoins énergétiques. La prise alimentaire est la source d'énergie sous forme de calories, mais aussi sous la forme de macro et micronutriments (vitamines, minéraux, acides aminés...), qui sont essentiels pour la construction et le fonctionnement des éléments cellulaires. Dans la suite de ce document, nous nous focaliserons sur la prise alimentaire de manière générale, en parlant d'apport énergétique, sans faire la distinction entre les différents apports (glucides, lipides, vitamines...).

Chez l'Homme, la prise alimentaire est dépendante des codes sociaux et culturels. Ainsi le nombre de repas et la quantité de chacun d'entre eux est variable (de Castro, 1998). La variabilité des repas, est également dépendante des activités journalières. Cet élément montre que l'organisme fait en sorte de recevoir suffisamment de nutriments par jour. Ceci a été par la suite prouvé chez l'animal, où lors d'une mise à disposition d'un régime hypocalorique, la quantité de nourriture ingérée était supérieure pour compenser (Adolph, 1947).

Un repas est composé de trois phases : une phase pré-prandiale, une phase prandiale qui est le repas à proprement parler et une phase post-prandiale. La phase pré-prandiale débute lorsque la glycémie atteint un seuil (Mayer, 1955). Par la suite, il a été montré qu'une diminution supérieure à 12 % de la glycémie plasmatique entraînait un signal vers l'hypothalamus (Campfield et al., 1985). Au cours de cette phase, on observe également une augmentation de la température corporelle (De Vries et al., 1993). La température commence à diminuer lors du repas et retrouve sa valeur basale à la fin de ce dernier. La phase post-prandiale qui a lieu à la suite de l'ingestion, est la période pendant laquelle l'organisme va

digérer les éléments incorporés. Elle est notamment caractérisée par une hyperlipémie et une hyperglycémie avant l'utilisation ou le stockage du glucose et des lipides circulants (Vors et al., 2014).

A la différence de la dépense énergétique qui se fait de manière continue, la prise alimentaire se fait de manière discontinue. Les organismes mettent donc en place des mécanismes de stockage énergétique. Ce processus de stockage énergétique peut également être poussé à l'extrême dans le cas d'hibernation. Dans le cas d'un apport non suffisant, qui peut conduire à des déficiences physiologiques et cognitifs, l'organisme doit utiliser des sources internes d'énergie qui sont issues du métabolisme cellulaire (Leibel et al., 1995). Il va alors y avoir une production de glucose par néoglucogenèse et d'acide gras par lipogenèse à partir des éléments stockés dans les tissus adipeux et dans le foie.

La régulation de la prise alimentaire est sous le contrôle principal de l'hypothalamus (Hetherington and Ranson, 1940). L'hypothalamus, divisé en deux parties avec les noyaux ventro-médians, qui contrôlent la satiété et les aires hypothalamiques latérales qui induisent la sensation de faim (Stellar, 1957). Ces deux zones de l'hypothalamus traitent les signaux envoyés par l'organisme et notamment les signaux métaboliques tels que la diminution de la glycémie ou la concentration en triglycérides et les signaux endocriniens tels que les signaux orexigènes ou anorexigènes. Ces neurotransmetteurs agissent sur les neurones hypothalamiques afin de stimuler ou d'inhiber la sensation de satiété (Tableau 7). Une autre structure importante de l'hypothalamus impliquée dans la régulation de la prise alimentaire est le noyau arqué. Il s'agit d'un noyau nerveux qui produit des substances régulatrices de la prise alimentaire dont le Neuropeptide Y (NPY) l'Agouti-related protein (AgRP) et le Melan-concentrating hormone (MCH). L'augmentation de la concentration de ces médiateurs dans le noyau paraventriculaire a pour effet d'augmenter la prise alimentaire, la prise de poids (Kalra et al.; Stanley et al., 1986) et la réduction de la dépense énergétique (Billington et al., 1991, 1994).

Médiateurs orexigènes	Médiateurs anorexigènes
Neuropeptide Y (NPY)	$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)
Agouti-related protein (AgRP)	Corticotropine-releasing hormone (CRH)
Melanin-concentrating hormone (MCH)	Thyrotropin-releasing hormone (TRH)
Hypocrétine 1 et 2	Cocain and amphetamin related hormone (CART)
Orexine A et B	Pro-opiomélanocortine (POMC)
Galanine	Leptine
Noradrénaline	IL-1 $\beta$
	Glucagon-like peptide 1
	Ocytocine
	Sérotonine

Tableau 7 : Neurotransmetteurs hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (adapté de Schwartz et al., 2000)

#### 4.2. Effets des champs électromagnétiques sur le métabolisme

Une exposition aux CEM de type EBF entraîne des variations de poids. Les résultats de la littérature sont contrastés, car indépendamment de la fréquence d'exposition, des augmentations et des diminutions sont observées. Lors d'une exposition à 60 Hz, les études ont montré soit une augmentation du poids (Babbitt et al., 2001), soit une diminution de celui-ci (Sandrey et al., 2002; Wilson et al., 1999) ou encore une absence de variation du poids (Margonato et al., 1995). A 50 Hz, l'exposition de rat pendant 3 mois (7h/j et 5j/semaine) a montré une augmentation du poids, poids qui a ensuite diminué afin de retrouver une valeur équivalente à celle des rats non-exposés (Rajkovic et al., 2003).

En 2010, une exposition aux CEM a été faite dans un but thérapeutique afin de voir un éventuel effet bénéfique des ondes (50 Hz, 17.9  $\mu$ T, 2h/j pendant 8 semaines). Pour cela, des animaux, rendus paraplégiques par une section de la moelle épinière au niveau de la T13, ont présenté lorsqu'ils étaient exposés aux CEM, une restauration de leur poids mais également de leur prise alimentaire et hydrique, contrairement aux animaux paraplégiques non-exposés (Kumar et al., 2010). Peu d'études ont été menées sur les effets des CEM de type radiofréquences sur le métabolisme. Une seule étude a montré qu'une exposition de souris (900 MHz, 0,4 W/kg, 24 h/j, pendant 40 semaines) augmentait le poids des animaux exposés par rapport aux animaux non-exposés (Sommer et al., 2004).

## 5. Interaction entre les différentes fonctions

D'après un proverbe français, «le sommeil est la moitié de la santé». Ce dicton, indique que dans les croyances populaires un bon sommeil est la cause et la conséquence d'une bonne santé et qu'il existe un lien fort entre les différentes fonctions physiologiques. Si le terme «santé» désigne dans le langage courant le système immunitaire, l'ensemble des fonctions physiologiques permet à l'organisme de conserver sa stabilité et son bon fonctionnement.

### 5.1. Interaction entre le sommeil et le système immunitaire

La science a mis en évidence le lien entre le sommeil et le système immunitaire à travers des messagers chimiques capables de traverser la barrière hémato-encéphalique qui peuvent agir de manière centrale et donc sur le sommeil (Capuron and Miller, 2011; Dickstein and Moldofsky, 1999). Le lien entre les deux fonctions physiologiques se fait également à travers les organes lymphoïdes, qui par leur innervation, sont sous contrôle à la fois du système nerveux autonome et du système endocrinien (Nance and Sanders, 2007; Ottaway and Husband, 1992).

#### 5.1.1. Liens cellulaires et moléculaires entre le sommeil et le système immunitaire

Les premiers liens existant entre ces deux systèmes sont les neurotransmetteurs et modulateurs tels que les cytokines ou les chémokines qui sont à même d'agir aussi bien sur les fonctions immunitaires que sur le sommeil (Besedovsky et al., 2012). Une étude menée chez la souris a montré que certains gènes, pouvant par exemple coder pour des cytokines, sont impliqués aussi bien dans l'établissement du sommeil que dans le bon fonctionnement du système immunitaire (Tafti et al., 1999).

En plus d'une régulation génique, il a été montré qu'une augmentation des concentrations de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  entraînait une augmentation de la durée du NREM (Shoham et al., 1987) et que le blocage de ces cytokines par des anticorps spécifiques diminuait la durée du NREM (Takahashi et al., 1995). De manière plus générale, la concentration de ces cytokines dans le liquide céphalo-rachidien dépend du stade de sommeil (Krueger et al., 2001). Ces cytokines agissent spécifiquement sur les neurones inducteurs de sommeil, situés sur l'aire pré-optique de l'hypothalamus antérieur et réciproquement inhibent les neurones des noyaux du raphé

(Obal and Krueger, 2003). L'augmentation des cytokines pendant la période nocturne est notamment due à une régulation négative de l'axe hypothalamo-hypophysaire adrénérurgique et du système nerveux sympathique. Cette régulation est caractérisée par une diminution des concentrations du cortisol, de l'adrénaline et de la noradrénaline, mais également une augmentation de l'hormone de croissance et de la prolactine (Born and Fehm, 1998; Haus, 2007; Reis et al., 2011) contribuant à l'augmentation de la libération de cytokines.

Cette augmentation de la production de cytokines peut être expliquée par l'accumulation au cours de l'éveil de «signaux de danger» tels que les ROS, les nucléotides ou les HSP au niveau cellulaire conduisant à un stress.

Concernant les cellules immunitaires, la concentration des macrophages spléniques et les lymphocytes T<sub>Helper</sub> circulants, est dépendante du cycle veille/sommeil (Keller et al., 2009). Ainsi pendant la période de sommeil, on observe une accumulation des lymphocytes B et T dans les ganglions lymphoïdes (Dickstein et al., 2000). Le nombre de lymphocytes et de monocytes circulants est maximal pendant la nuit tandis que celui des cellules NK est maximal au réveil (Born et al., 1997). Les lymphocytes T ont un rythme synchronisé sur celui du cortisol, le pic de ce dernier, au début de l'éveil, précède de 3h une diminution des Lymphocytes T circulants (Cox and Ford, 1982; Dimitrov et al., 2009).

#### *5.1.2. Système immunitaire lors d'une privation de sommeil*

L'étude de l'interaction entre le sommeil et le système immunitaire a souvent été réalisée grâce à des études de privation ou de perturbation du sommeil.

Lors de ces études, il a été montré que la perturbation du sommeil entraînait des effets aussi bien sur les cellules immunitaires que sur les médiateurs de l'immunité. Les études sur le nombre de leucocytes sont contrastées car elles montrent, après une nuit sans sommeil, une diminution (Born et al., 1997) ou une augmentation (provenant de la prolifération des Lymphocytes T<sub>Helper</sub>) (Bollinger et al., 2008). Il a également été montré qu'une privation partielle de sommeil entraîne une diminution transitoire de l'activité des cellules NK (Matsumoto et al., 2001) qui est due à une baisse du nombre de cellules NK circulants (Born et al., 1997). Concernant les médiateurs, diverses études ont montré qu'une nuit de privation de sommeil entraînait une augmentation de la concentration en IL-2, IL-7 et IL-12 (Benedict et al., 2007; Born et al., 1997; Lange et al., 2010) et en récepteurs à IL-6 (Dimitrov et al., 2006).

Les résultats d'autres études témoignent d'une diminution de la concentration en IL-10, IL-14, IL-1 $\beta$  et en INF $\gamma$  (Lange et al., 2006).

Une perturbation (ou privation) de sommeil est responsable de la qualité des réponses immunitaires mises en place lors de la mise en contact avec un Ag. Ainsi, Lange et son équipe ont montré qu'un vaccin perd de son efficacité si le patient ne passe pas une bonne nuit de sommeil la veille de l'administration du vaccin (Lange et al., 2003). Dans une autre étude pendant laquelle une inoculation répétée de l'Ag de l'Hépatite A et B a été faite, le nombre de lymphocytes T<sub>Helper</sub> circulants était deux fois plus important chez les sujets ayant dormi la veille de l'inoculation comparé à ceux dont le sommeil avait été perturbé. Chez l'animal, une souris au préalable immunisée présentait un échec de l'élimination du virus de l'influenza si celle-ci était privée de sommeil pendant les 7 heures suivant l'injection (Renegar et al., 1998, 2000; Toth and Rehg, 1998). La mémorisation immunitaire était donc moins importante suite à une perturbation du sommeil (Lange et al., 2011).

De manière plus générale, la privation chronique de sommeil peut être considérée comme un état de stress chronique pouvant par la suite impacter les fonctions immunitaires et la santé notamment par une inflammation systémique ou une immunodéficiance (McEwen, 2006; Meerlo et al., 2008).

### 5.1.3. *Effet d'une infection sur le sommeil*

Une infection, qu'elle soit virale ou bactérienne, entraîne des modifications de la structure du sommeil, avec l'apparition d'une courte période d'augmentation du temps total de sommeil avant que celui-ci ne soit diminué en raison de la suppression du REM (Toth and Krueger, 1988). A l'inverse de cette étude, une infection par le virus de la grippe chez des patients humains entraîne une réduction du temps de sommeil pendant la période d'incubation avant de présenter une augmentation lors du sommeil pendant la période symptomatique (Smith, 1992).

Chez l'Homme, lors de l'injection de lipopolysaccharides (de 0,2 à 0,8 ng/kg de poids corporel), on observe une modification de la structure du sommeil avec une augmentation de la quantité de NREM associée à une augmentation des concentrations de TNF- $\alpha$  et de IL1- $\beta$ .

## 5.2. Interaction entre le sommeil et le métabolisme

Les effets d'une privation ou d'une perturbation du sommeil sur la prise alimentaire ont été étudiés aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. De manière générale, une diminution de la qualité du sommeil entraîne une augmentation de la prise alimentaire aussi bien chez les adultes (Hogenkamp et al., 2013) que chez les enfants (Tatone-Tokuda et al., 2012). Cette augmentation se traduit par l'augmentation des portions afin d'apporter les éléments nécessaires pour rester éveillé. Toutefois cet apport est supérieur à la quantité nécessaire pour compenser les dépenses énergétiques engendrées par la perturbation du sommeil (Hogenkamp et al., 2013; Markwald et al., 2013). Les personnes ayant subi une restriction de sommeil peuvent donc présenter une augmentation jusqu'à 20 % supérieure à la prise journalière habituelle (Bosy-Westphal et al., 2008; Brondel et al., 2010). En plus de la variation de la quantité de nourriture ingérée, une modification du type d'alimentation a été observée. Les personnes ayant subies une privation choisissent spontanément des aliments hautement caloriques de type snacks (Nedeltcheva et al., 2009) ou riche en gras (Brondel et al., 2010). Ce fait a également été confirmé sur la population juvénile (Mcdermott et al., 2008). En plus d'une perturbation du régime alimentaire, il a été montré que le pattern alimentaire lui-même était altéré, avec une irrégularité des heures de repas, mais également une propension à manger plus vite ce qui explique un apport supérieur, les signaux de satiété n'ayant pas le temps de se mettre en place (Tatone-Tokuda et al., 2012). De même, les études réalisées chez les rongeurs ont montré une augmentation de la prise alimentaire, quelque soit la durée de la perturbation de sommeil (Baud et al., 2012; Rechtschaffen et al., 2018).

Ces variations peuvent s'expliquer par une perturbation du système endocrinien conduisant à «un état hormonal qui prédispose à manger» (St-Onge et al., 2011). Le cortisol augmente lors d'une privation de sommeil (Buxton et al., 2010; Nedeltcheva et al., 2009; Reynolds et al., 2012; Spiegel et al., 2004a). Ces mêmes études ont montré que la tolérance au glucose était plus faible accompagnée d'une insulino-résistance et d'un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  du pancréas. La sécrétion de ghréline (hormone qui induit l'appétit) est augmentée lors d'une restriction de sommeil (Schüssler et al., 2006; Spiegel et al., 2004b), tandis qu'une diminution de leptine (hormone anorexigène) est observée (Chaput et al., 2007; Taheri et al., 2004). Ces variations ont été quantifiées chez l'Homme et révèlent une diminution de 18 % de la leptine et une augmentation de 28 % de la ghréline (Spiegel et al.,

2004b). A titre de comparaison, un régime alimentaire restrictif à 900 kCal/jour n'a montré une diminution que de 22 % de la leptine (Chin-Chance et al., 2000). Ainsi une privation de sommeil entraîne une augmentation de la sécrétion de ghréline, qui agit non seulement sur les fonctions métaboliques, mais également sur le sommeil en favorisant l'induction de ce dernier (Schüssler et al., 2006) tandis que l'augmentation de la leptine relarguée au niveau des adipocytes (lieu de stockage des triglycérides) pendant le sommeil permet d'éviter un réveil de l'organisme dû à une sensation de faim (Simon et al., 1998).

Une étude chez le rat a mis en évidence un nouveau système de régulation impliquant les neurones à hypocrotine montrant que l'hypoglycémie déclenche l'éveil pour la recherche de nourriture (Mileykovskiy et al., 2005).

D'une manière plus globale, le sommeil et ses perturbations ont montré avoir une incidence sur l'augmentation du poids (Watanabe et al., 2010) et sur l'apparition de maladies métaboliques (Mullington et al., 2009, 2010). Ainsi une quantité de sommeil trop faible (inférieure à 5 ou 6h chez un adulte) (Lucassen et al., 2012) ou trop grande (supérieure à 9h) peut conduire à l'apparition de diabète de type 2 (Ayas et al., 2003). De même la prévalence de l'obésité est accrue lors d'une réduction du temps total de sommeil, aussi bien chez les enfants (von Kries et al., 2002) que chez les adultes (Taheri et al., 2004).

### 5.3. Interaction entre le système immunitaire et le métabolisme

Lors d'une infection ou toute autre pathologie entraînant une réponse immunitaire, il est commun de voir que les patients ont un appétit plus faible. Ceci a été vérifié chez l'animal. Une souris infectée par *Listéria monocytogenes* mange seulement 58 % de sa ration alimentaire habituelle (Murray and Murray, 1979).

Un des liens entre le système immunitaire et les variations du métabolisme est l'implication conjointe de médiateurs chimiques comme la leptine. En plus de ses fonctions sur l'hypothalamus afin de réguler NPY, la leptine joue un rôle dans le maintien de la réponse immunitaire. En effet, une déficience de la leptine conduit à une prédisposition aux infections (Faggioni et al., 2001). De plus, des récepteurs de la leptine sont également présents sur les membranes des lymphocytes T<sub>Helper</sub> et T<sub>Cytotoxiques</sub> (Howard et al., 1999), et bien que leurs

actions ne soient pas encore pleinement connues, il semble que ces récepteurs soient impliqués dans la production de cytokines (Maruna et al., 2001).

Un autre exemple de lien entre l'immunité et le métabolisme passe par les Toll-like receptors (TLR). Ces TLR se trouvent à la surface des cellules immunitaires (lymphocytes, cellules dendritiques et mastocytes), et permettent, suite à leur activation, d'induire une différenciation de CD ou la production de cytokines (Watts et al., 2007). De même, ces TLR sont exprimés à la surface des adipocytes. Leur activation permet la synthèse par les adipocytes de facteurs pro inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, chémokines...) et la régulation du métabolisme lipidique (Bès-Houtmann et al., 2007; Khazen et al., 2007; Lin et al., 2000).

Les liens entre les différentes fonctions physiologiques ont donc été établis. Ceux-ci nous permettront d'évaluer, lors d'une altération d'une fonction, s'il s'agit d'un effet direct de la contrainte sur la fonction ou d'un effet indirect par l'altération d'une fonction connexe.

## 6. Les nuisances sonores

Comme il l'a été évoqué précédemment, notre étude portera sur une co-exposition entre les champs électromagnétiques et une seconde contrainte environnementale : le bruit.

### 6.1. Généralités

Le bruit est une des causes majeures de la pollution environnementale et peut se trouver aussi bien sur les lieux d'habitation que sur les lieux de travail. En effet, deux tiers des français déclarent le bruit comme première source de nuisance à leur domicile et 67 % des actifs travaillent dans un environnement bruyant (Kantar TNS, 2013; 2009a). En 2009, l'OMS a indiqué que 40 % de la population européenne était exposée à un bruit routier supérieur à 55 dB(A) lors de la période diurne et 30 % de la population lors de la période nocturne (2009b). En plus de ces expositions subies, il faut ajouter les expositions volontaires, qui découlent des activités pratiquées dans le cadre des loisirs (concert, sorties, jardinage...).

### 6.2. Caractéristiques physiques

Le bruit est généralement défini comme étant un son «non-voulu» par une personne. C'est une vibration de l'air se déplaçant selon un phénomène ondulatoire. Il s'agit d'ondes sphériques qui se déplacent dans toutes les directions depuis la source émettrice. Elles sont caractérisées par le mouvement (de vibration et de collision) des particules constituant le milieu de propagation. La vitesse de déplacement, appelée célérité de l'onde, est dépendant de la nature du milieu traversé. Dans le vide, l'absence de matière empêche tout déplacement de matière et donc toute propagation de l'onde sonore. Dans l'air, le bruit se déplace à une célérité de 340 m/s et dans l'eau 1460 m/s et suit la formule suivante :

$$c = \sqrt{\frac{k}{\rho}}$$

k étant la résistance à la compression et  $\rho$  la masse volumique d'un matériau. La vibration de l'air dû au déplacement de l'onde sonore entraîne une variation locale de la pression qui, arrivée dans le conduit auditif, fait vibrer la membrane tympanique.

Une onde sonore est caractérisée par :

- Son intensité : appelée aussi niveau sonore, dépend de l'amplitude des vibrations. Elle est exprimée en décibel (dB). Cette unité suit une échelle logarithmique, ainsi l'ajout de 3 dB correspond au doublement de l'intensité sonore (Figure 14). Il existe également des échelles « corrigées » prenant en compte l'audition humaine. On parlera alors de dB(A) ou de dB(C).
- Sa fréquence : c'est le nombre de vibrations émises par la source par unité de temps, elle est mesurée en hertz (Hz). Les fréquences perçues par l'oreille sont fonction des espèces, mais également de l'âge. Pour l'Homme, les fréquences audibles sont comprises entre 20 et 20 000 Hz et chez le rat entre 250 et 80 000 Hz.
- Sa durée : on considère généralement 2 échelles de temps, les expositions courtes (inférieures à 24h) et les expositions longues (supérieures à une journée)

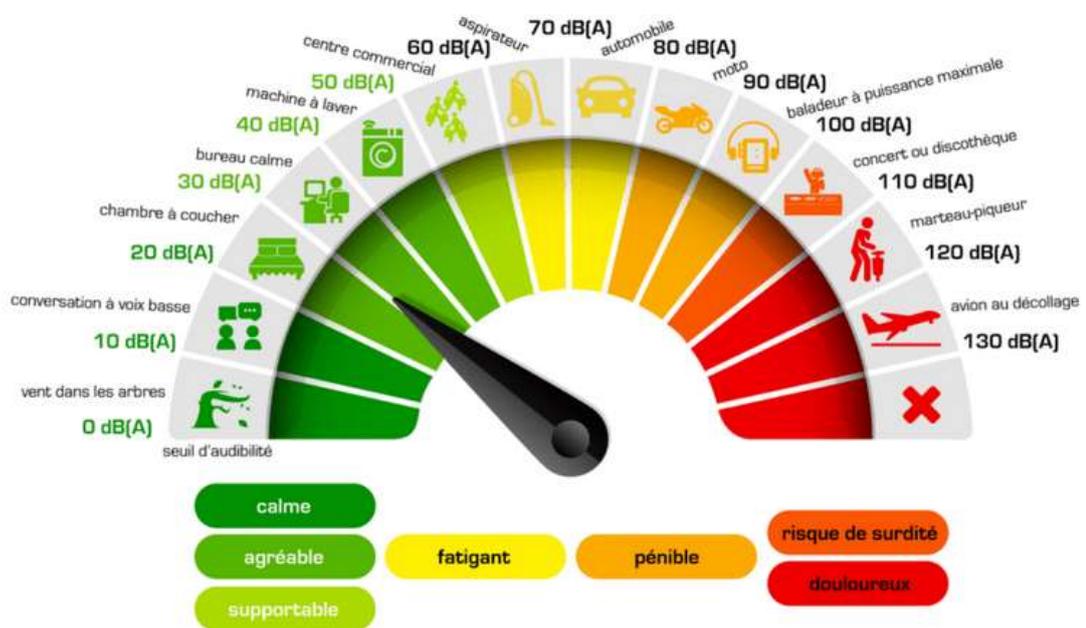


Figure 14 ! Echelle sonore en dB(A) comportant des exemples de sources sonores (source Audilo.com)

### 6.3. Règlements

Le décret 2006-892 « relatif aux prescriptions de sécurité et de santé applicables en cas d'exposition des travailleurs aux risques dûs au bruit » introduit dans le Code du Travail les valeurs limites d'exposition. A l'instar de la réglementation des champs électromagnétiques, la réglementation d'une exposition à une nuisance sonore définit une valeur d'exposition inférieure déclenchant l'action (80 dB(A) pendant 8h et 135 dB(C) en niveau de crête) et les valeurs limites d'exposition (87 dB(A) pendant 8h et 140 dB(C) en niveau de crête). Ces valeurs

prennent en compte les protections que les employeurs doivent mettre à disposition et que les employés doivent porter lors de telles expositions. Ces équipements de protection individuelle (EPI) doivent obligatoirement être portés lorsque le niveau sonore dépasse le niveau de 85 dB(A) et une mise à disposition des 80 dB(A).

#### 6.4. Effets du bruit sur la santé

En 2007, Goines et Hagler ont qualifié, en raison de l'omniprésence des bruits environnementaux et de l'absence d'échappatoire, le bruit comme étant la «peste moderne». Ils donnent également une définition des bruits environnementaux comme étant l'ensemble des bruits générés par nos sociétés sans toutefois prendre en compte les bruits qui sont dûs à une activité de travail. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont été portées afin de mettre à jour les effets du bruit sur la physiologie. Il en est ressorti deux grands types d'effets, les effets auditifs, agissant directement sur l'organe récepteur des ondes sonores (oreille interne), et les effets extra-auditifs qui regroupent l'ensemble des autres effets.

Les effets extra auditifs du bruit peuvent apparaitre à partir d'une exposition à 50 dB (Anticaglia and Cohen, 1970; Ising and Kruppa, 2004) et regroupent les effets physiologiques (cardiovasculaire, respiratoire, sommeil...) et les effets psychologiques (attention, mémoire, humeur...).

##### 6.4.1. Effets du bruit sur le sommeil

Le traitement de l'information sonore, générée lors d'une exposition, met en action un réseau de structures cérébrales. L'organe de Corti, localisé dans la cochlée de l'oreille interne est un récepteur de l'information auditive, qui est délivré au cerveau via le nerf cochléaire. L'information auditive est ensuite transmise du thalamus vers le lobe temporal pour être traitée par le cortex auditif. Lorsque l'organisme est dans une phase de sommeil, les connexions thalamo-corticales filtrent, voire bloquent ces informations sensorielles en provenance des récepteurs périphériques. Toutefois, il a été montré qu'une stimulation auditive pouvait entraîner un «réveil» des systèmes nerveux centraux et autonomes sans modifier le stade d'éveil (Krichagin, 1978).

De nombreuses études aussi bien épidémiologiques expérimentales ont montré qu'il y avait des effets subjectifs (via un questionnaire) et objectifs (via des mesures physiologiques)

du bruit sur le sommeil (Ohrstrom, 2000). Elles ont également montré que les effets dépendent de paramètres tels que l'âge avec une augmentation de la sensibilité avec l'âge (Lukas, 1975). De plus, les enfants sont moins sensibles aux réveils que les sujets adultes avec une différence de 10 dB dans l'intensité sonore provoquant le réveil (Eberhardt, 1987).

Le bruit engendre généralement deux types d'effets sur le sommeil : les effets sur la durée totale du sommeil (difficulté d'endormissement, réveil prématuré, décalage du temps de sommeil) et les effets sur l'architecture interne du sommeil (fréquences et durée moyenne des épisodes...). Le premier élément indiquant une perturbation du sommeil est l'augmentation de la latence d'endormissement. Une exposition à un bruit intermittent de 55 dB entraîne une augmentation de cette latence (Eberhardt et al., 1987) mais n'a pas été retrouvée lors d'études avec une intensité sonore inférieure (Eberhardt and Akseleson, 1987; Marks and Griefahn, 2007; Wilkinson and Campbell, 1984). Le second facteur est le réveil nocturne. Ils apparaissent dès 55 dB, mais sont plus fréquents à partir de 60 dB (Griefahn and Muzet, 1978) mais peuvent survenir dès 55 dB (Basner, 2008). Ces réveils nocturnes semblent aussi dépendants du stade de sommeil dans lequel se trouve la personne. Toutefois les résultats sont contradictoires car ils montrent une plus grande propension à se réveiller soit à partir d'un épisode de REM (Rechtschaffen et al., 1966) soit de NREM (Eberhardt et al., 1987). Ces réveils sont également liés à l'environnement dans lequel se trouve la personne. En effet, une étude faite dans un service de soins intensifs prouve que le seuil entraînant un réveil augmente si une personne est déjà soumise à un bruit de fond continu et modéré (62 dB dans l'étude) comparé à un même bruit chez une personne non-exposée (Stanchina et al., 2005). Enfin, le troisième facteur est la diminution du temps total de sommeil. Celui-ci peut être une conséquence des deux facteurs précédents, mais aussi de l'augmentation des réveils nocturnes revus dans (Muzet, 2007).

Au niveau de l'architecture interne du sommeil, on observe une augmentation des phases de latence de NREM ou de REM (Kuroiwa et al., 2002; Vallet et al., 1983). Selon Eberhardt, des changements vers un stade plus léger sont observés et dépendent de l'intensité sonore et de sa distribution au cours de la nuit. Ainsi un bruit continu aurait plus d'impact sur le REM alors que le NREM serait plus impacté par un bruit intermittent (Eberhardt et al., 1987). Chez le rongeur, un bruit blanc continu (bruit artificiel donc l'intensité est la même dans toutes les bandes spectrales) entraîne un raccourcissement des épisodes de NREM et une augmentation

du nombre des épisodes de REM. Dans le cas d'un bruit intermittent, on observe une perturbation du NREM (Eberhardt et al., 1987; Griefahn and Jansen, 1975; Thiessen, 1978), ainsi que des réveils dès 45 dB(A) quelque soit le stade dans lequel se trouve la personne (Kawada and Suzuki, 1999; Terzano et al., 1990). Des études similaires ont été menées chez l'animal. Les premiers à avoir montré une variation du sommeil d'animaux exposés aux bruit étaient Khazan and Sawyer en 1963. Ils ont montré une perturbation du REM chez le lapin suite à une exposition à un bruit blanc continu (78 dB pendant 24h). Dans un premier temps, l'animal avait moins d'épisodes de REM mais récupérait la durée de sommeil manquante dans une période de rebond. La diminution de la quantité de REM a ensuite été démontrée chez le rat à un bruit de 92 dB pendant 24h (Twyver et al., 1966). Dans ces deux études, la quantité mais également l'architecture du NREM étaient conservées. De plus, des études menées sur le rat, avec une stimulation auditive répétée (1 kHz, durée de 20 ms toutes les 20 s) selon différentes intensités (de 50 à 100 dB) entraînaient une augmentation de la durée des stades de REM (Amici et al., 2000, 2001).

Ces résultats ont été par la suite confirmés en comparant différents types de bruits blancs et environnementaux (bruits du quotidien qui ne sont pas dûs à une exposition professionnelle) (Rabat et al., 2004). En effet, le type de bruit utilisé est un facteur impactant l'intensité de la perturbation. Une étude sur le rat a ainsi mis en exergue que le bruit environnemental avait un effet plus délétère que le bruit artificiel et cela même si l'intensité du bruit blanc était supérieur à celui du bruit environnemental (Rabat et al., 2004).

En plus des effets directs du bruit sur le sommeil, l'exposition au bruit a un effet indirect. En effet, chez l'Homme, une exposition diurne entraîne une diminution de la durée du sommeil à cause d'une diminution de la durée du REM en absence de bruit durant le sommeil (Blois et al., 1980). En revanche, une exposition de jeunes adultes pendant la période diurne à 80 dB entraîne une augmentation du NREM (Fruhstorfer et al., 1984).

#### *6.4.2. Effets du bruit sur le système immunitaire*

Contrairement aux effets sur le sommeil, les effets sur le système immunitaire des personnes ayant été exposées au bruit ont été relativement peu étudiés.

Une étude épidémiologique portant sur des travailleurs aéroportuaires a montré que ces derniers présentaient une prévalence accrue pour les infections virales, bactériennes et

fongiques (Branco Castelo, 1999). En 2017, Kim et al. ont fait le lien entre une exposition à un trafic routier avec une augmentation de la production d'IL-12 et une diminution du nombre de cellules NK. Les cellules NK, mais aussi les neutrophiles, lors d'une exposition à 72 dB pendant 4 jours sur des souris, présentaient une infiltration des cellules immunitaires au niveau des vaisseaux (Münzel et al., 2017).

Lors d'une étude chronique d'une exposition à 90 dB, le système immunitaire de souris a présenté des modifications en fonction du temps. Trois jours après le début de l'exposition, une augmentation de la prolifération des lymphocytes au niveau splénique ainsi qu'une augmentation de la concentration d'IgM étaient observées. En revanche, suite à 4 semaines d'exposition, la lymphoprolifération splénique était inférieure chez les animaux exposés, qui présentaient également une diminution de la concentration en IgG. Enfin ils avaient une augmentation de la concentration en 8-OHdG urinaire (8-hydroxydeoxyguanosine) qui est un marqueur de stress cellulaire supérieure aux animaux non-exposés (Zheng and Ariizumi, 2007). A une exposition d'une intensité sonore similaire pendant 8 mois, Aguas a montré une diminution des Lymphocytes T helper et cytotoxiques spléniques ainsi qu'une diminution des Lymphocytes B IgM+ (Aguas et al., 1999). D'un point de vue plus global, le bruit entraînerait un ralentissement de la cicatrisation, expérience effectuée chez des rats exposés à des bruits blancs allant de 2 to 16 KHz (Wysocki, 1996).

Les éléments présentés précédemment nous ont donc montré que le bruit avait des impacts sur les paramètres hypniques. De plus, le lien entre la perturbation du sommeil et une dérégulation du système immunitaire a également été avéré. Dans le cadre de notre protocole, une exposition au bruit pourrait entraîner une perturbation du sommeil qui à son tour pourrait entraîner une perturbation du système immunitaire.

## OBJECTIFS DE L'ETUDE

Au vu de la littérature et des éléments qui ont été présentés précédemment, les personnes souffrant d'EHS attribuent leurs symptômes aux champs électromagnétiques. Mais à ce jour, objectivement à partir des données expérimentales, ces symptômes ne peuvent pas encore être attribuables aux champs électromagnétiques. En effet, les expériences menées afin de retrouver en laboratoire les symptômes des personnes souffrant d'EHS ou les tentatives pour en déterminer les mécanismes d'actions, restent très controversées.

Afin d'évaluer les effets des champs électromagnétiques, nous avançons l'hypothèse qu'une exposition unique aux champs électromagnétiques engendrerait des effets statistiquement faibles voire invisibles, ce qui expliquerait les conclusions variables d'une étude à l'autre. Afin d'observer ces effets, l'ajout d'une seconde contrainte environnementale pourrait induire une exacerbation d'effets jusqu'alors invisibles ou non statistiquement significatifs. Cette hypothèse s'appuie sur les travaux précédemment réalisés dans le laboratoire au cours de laquelle une exposition combinée entre les CEM et une contrainte thermique montraient une exacerbation des effets sur la thermorégulation lors d'une co-exposition. Une potentialisation des effets thermiques sur le sommeil était induit par les CEM (Pelletier et al., 2013).

La seconde contrainte environnementale, le bruit, a été choisie pour être la seconde source de stress de notre étude. Le choix de cette contrainte s'est fait pour différentes raisons. La première est son caractère ubiquitaire dans notre société. En effet, une population telle que la population française, quelque soit son lieu de vie ou de travail, est exposée à des niveaux sonores différents qui peuvent être importants selon les situations. De plus, le bruit a été montré comme ayant des impacts effectifs sur la santé et notamment dans les deux paramètres principaux de notre étude à savoir le sommeil et le système immunitaire.

Au sein de la population générale, nous nous sommes spécifiquement intéressés à une tranche d'âge dite «vulnérable» : la population juvénile. Sa plus grande vulnérabilité viendrait du fait que les fonctions physiologiques et cognitives de ces individus sont en plein développement et qu'une atteinte pendant cette période pourrait entraîner des perturbations ou dysfonctionnements plus importants sur la santé du futur adulte. D'autre part, des modélisations du DAS ont montré une absorption plus importante comparée aux adultes.

L'objectif du travail présenté ici est d'évaluer les perturbations auxquelles une population juvénile serait soumise lorsqu'elle est chroniquement exposée à une ou plusieurs contraintes environnementales durant son développement et de voir les impacts à l'âge adulte. Ce travail simulera l'exposition quotidienne à laquelle un enfant est soumis, exposé aussi bien aux champs électromagnétiques émis par les antennes relais qu'aux bruits produits par les moyens de transport, travaux et autres actions de la vie quotidienne.

La première étude présentée ici montrera les impacts sur le sommeil et l'homéostasie énergétique par une contrainte sonore seule. Elle s'est focalisée sur les différents paramètres hypniques, le poids corporel, la prise alimentaire et hydrique et les apnées suite à une exposition chronique (pendant 5 semaines) à un haut niveau sonore (87,5 dB). Cette étude a également pour objectif la validation du protocole sonore qui sera appliquée lors de la co-exposition.

La seconde étude qui sera présentée évalue les impacts d'une exposition simple ou combinée à une nuisance sonore ou une exposition aux champs électromagnétiques. Au cours de cette étude, les paramètres hypniques métaboliques et respiratoires seront évalués.

Les troisièmes et quatrièmes volets se sont portés sur les aspects immunitaires des animaux présentés dans l'étude précédente, donc ayant été soumis aux mêmes contraintes environnementales. A travers ces études qui présenteront respectivement les effets d'une exposition seules aux champs électromagnétiques et les effets d'une co-exposition, l'immunité innée, l'immunité acquise et les paramètres sanguins. Ces derniers seront évalués à travers les différentes sous-populations cellulaires aussi bien au niveau central que périphériques.

Enfin dans un dernier temps, ces études seront complétées par des analyses comportementales et de microcirculation sanguine.

## MATERIEL ET METHODES

## 1. Modèle animal

### 1.1. Environnement

Les expérimentations animales ont été réalisées sur la plateforme animale (PlatAnn) de l'Université de Picardie Jules Verne en accord avec les directives européennes et l'accord du Comité Ethique et du Ministère de la Recherche (autorisation n°APAFIS#3735-2016012017118094 v3). Les locaux se composent de 4 pièces : deux chambres climatiques, une pièce de chirurgie et une pièce d'expérimentation intégrés au sein du laboratoire PériTox. Les animaux étaient, dès leur arrivée, installés dans les chambres climatiques.

Les chambres climatiques permettent de contrôler les facteurs environnementaux tels que la photopériode (cycle jour/nuit imposé aux animaux, 12h/12h avec un allumage des éclairages à 6h et une extinction à 18h), l'éclairage utilisé (éclairage artificiel, produit par des néons et délivrant une intensité inférieure à 200 lux), la température et l'hygrométrie afin de conserver un environnement constant autour des animaux. La température était de  $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  et l'humidité relative comprise entre 40 et 60 %. Ces paramètres, vérifiés chaque jour, ont également fait l'objet d'un enregistrement par la sonde ESCORT iLog (Cryopak, Edison, NJ, USA) afin de s'assurer de la stabilité des paramètres au cours de la journée. La vitesse de ventilation était inférieure à  $0,1\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

A l'intérieur de ces chambres, un portoir permettait d'accueillir sept cages individuelles en plexiglas de dimensions 42,5 x 26,6 x 18,5 cm avec une surface au sol de  $800\text{ cm}^2$ . Ces cages étaient équipées d'une mangeoire (dont la grille de séparation est en métal et le reste en plastique) et d'un biberon (seule la tétine était en métal).

L'intérieur des cages était tapissé d'une litière à base de maïs (LZB COB 1, Serlab, Montataire, France) avec une litière foisonnante (Serlab, Montataire, France) pour l'enrichissement. L'accès à l'eau (eau du robinet) et à l'alimentation (3436EXF12, Serlab, France) de l'animal était *ad libitum*.

### 1.2. Animaux

Le modèle animal utilisé était un modèle murin. Il s'agissait de rats mâles Wistar de souche SPF RjHan:WI issus de l'élevage Janvier (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). A leur arrivée au

laboratoire, les animaux, alors âgés de trois semaines et donc sevrés, avaient un poids compris entre 55 et 85 g.

Les animaux ont été répartis en quatre groupes (contrôle, exposé aux CEM, exposé au bruit et co-exposé) de 12 animaux chacun et placés dans les chambres climatiques. Pour des raisons de capacité des chambres climatiques, les quatre groupes ont été divisés en deux sous-groupes (n=6 par groupe) chacun faisant l'objet d'une session expérimentale. Afin de limiter l'impact de la saison sur les expérimentations, les demi-groupes ont été faits à des périodes différentes. Cette variabilité a été prise en compte lors des analyses statistiques.

Les animaux ont été, hébergés individuellement afin d'enregistrer les prises alimentaire et hydrique de chaque rat ainsi que le sommeil.

Les rats étaient habitués pendant 3 jours à leur hébergement avant d'être exposés aux CEM et/ou au bruit.

## 2. Modalités d'exposition

### 2.1. Exposition aux champs électromagnétiques

Un générateur de radiofréquences (model RFS 900–64, RFPA, Artigues-près-Bordeaux, France) émettait un champ électromagnétique continu de 900 MHz. Ce générateur, situé à l'extérieur des chambres climatiques était relié aux antennes (model 800–10465, KATHREIN-Werke KG, Rosenheim, Allemagne). Chaque chambre disposait de quatre antennes individuellement reliées au générateur et situées au-dessus des cages. Les antennes étaient distantes de 45 cm et placées à 80 cm au-dessus de la cage. Le nombre et l'utilisation des antennes dépendaient de l'intensité voulue qui était mesurée par une sonde de mesure (PMM EP600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA). Les valeurs données par la sonde étaient visualisées à l'aide d'un logiciel spécifique (Win EP 600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA).

Le générateur était réglé afin de dispenser une intensité moyenne de  $1,8 \text{ V.m}^{-1}$  lorsque les antennes étaient en marche. Lorsque le générateur ne délivrait aucun signal l'intensité moyenne était et  $0,3 \text{ V.m}^{-1}$ . Le DAS était estimé à partir de simulation numérique  $30 \text{ mW/kg}$ .

En effet, des simulations ont été menées par le Whistlab (Télécom Bretagne) afin de développer un modèle de rat (Figure 15), prenant en compte différents tissus corporels, à

différents âges, et dans différentes positions (allongé, replié, debout, assis). Ces simulations ont permis de calculer le DAS lors de l'exposition de nos animaux, résultats présentés dans le Tableau 8.

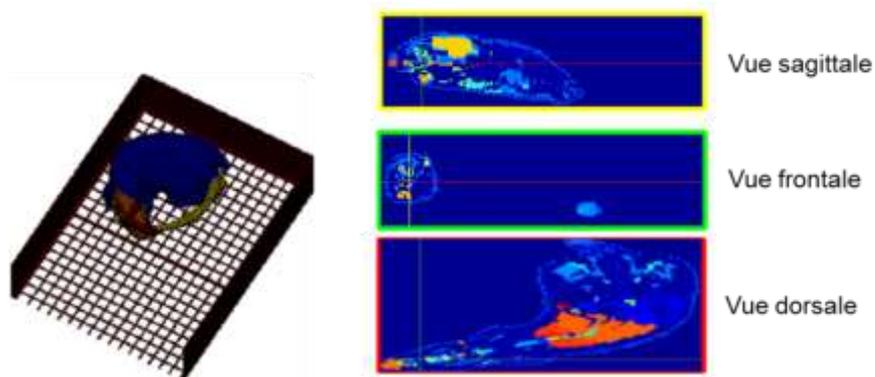


Figure 15 : Modèle de rat (à gauche) ayant permis de calculer les différentes valeurs de DAS selon différentes vues (à droite) (issu du projet EVIREF, Laboratoire PériTox)

<b>Position du rat</b>	<b>DAS calculé (W/kg)</b>
<i>allongé</i>	Tête : $9,5 \cdot 10^{-3}$
	Queue : $10,5$ à $20 \cdot 10^{-3}$
	Base de la queue : $60$ à $80 \cdot 10^{-3}$
<i>recroquevillé</i>	Tête : $3,9$ à $4,2 \cdot 10^{-2}$
	Queue : $2,5$ à $3,2 \cdot 10^{-2}$

Tableau 8 : Valeurs de DAS en fonction de la position du rat et de la partie anatomie concernée (issu du projet EVIREF, Laboratoire PériTox)

L'exposition aux CEM avait lieu 23 h par jour et était uniquement interrompue pendant l'heure des soins quotidiens des animaux (de 17h00 à 18h00).

## 2.2. Exposition au bruit

L'exposition sonore commençait 3 jours après l'arrivée des animaux dans le laboratoire et continuait jusqu'au jour du sacrifice. Les nuisances sonores auxquelles les animaux étaient soumis prenaient la forme d'une bande sonore de 24 heures. Ces 24 heures étaient divisées en 13 heures de silence relatif (bruit de fond de 65 dB pendant la période nocturne) et 11 heures de bruit (de 6h00 à 17h00, pendant la période diurne, donc de sommeil du rat). Les bruits diffusés pendant la période de bruit étaient segmentés par fragments de 10 minutes et ont été constitués à partir d'une bibliothèque sonore. Cette bibliothèque contenait des sons de la vie quotidienne comme des bruits urbains (circulation, sirènes, travaux...), des sons artificiels (bruits blancs, bruits rouges, sinusoïdes...) ou de la musique. Cette multiplicité, couplée à une variation des intensités sonores permettaient une bonne représentation en termes d'intensités et de fréquences auxquelles l'oreille humaine peut être soumise de manière quotidienne.

L'intensité sonore était de  $87,5 \pm 3,7$  dB (de 59 à 111 dB) et la gamme fréquentielle comprise entre 50 et 20 000 Hz. Lors des périodes sans bruit, l'intensité sonore de la chambre était inférieure à 65 dB.

Afin de limiter le phénomène d'habituation, quatre fichiers ont été conçus comportant les mêmes séquences sonores, mais dans un ordre d'apparition différent. Le choix quotidien du fichier utilisé était réalisé pseudo-aléatoirement pour éviter la répétition d'un même fichier deux jours consécutifs.

Le son était émis par un amplificateur (Combo 130, Audiophony Hit Music SAS, Fontanes, France) et diffusé par deux enceintes, une dans chaque chambre, (K50-8 Ohm, JBSystems, Groot-Bijgaarden, Belgium).

## 3. Protocole général

Le protocole est schématisé dans la Figure 16. Après leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été habitués pendant 3 jours à leur nouvel environnement. Ils ont été ensuite exposés aux champs électromagnétiques et/ou au bruit pendant trois semaines. Au début de la 4<sup>ème</sup> semaine, une chirurgie crânienne a permis la disposition d'un implant télémétrique permettant l'enregistrement de l'EEG et de l'EMG pour distinguer les différents stades de vigilance. A la suite de cette chirurgie, les animaux disposaient de 5 à 6 jours de récupération

avant que ne débute les enregistrements au cours de la 5<sup>ème</sup> semaine d'exposition. Le dernier jour de la 5<sup>ème</sup> semaine, l'enregistrement des paramètres pléthysmographiques a été réalisés. Le premier jour de la 6<sup>ème</sup> semaine, des mesures de laser doppler ont été réalisés sous anesthésie générale. Enfin les animaux ont été sacrifiés et les organes ont été prélevés le deuxième jour de la 6<sup>ème</sup> semaine. Pendant l'ensemble de la durée du protocole, la prise alimentaire et la prise hydrique ont été enregistrées quotidiennement. Le poids des animaux était mesuré tous les deux jours. Le comportement des animaux a été évalué à l'aide d'un Open Field Test, qui a été réalisé quatre fois au cours du protocole (une journée par semaine pendant les trois premières semaines et la veille du sacrifice). Les détails des enregistrements seront expliqués soit à la suite de cette partie, soit dans les articles correspondants.

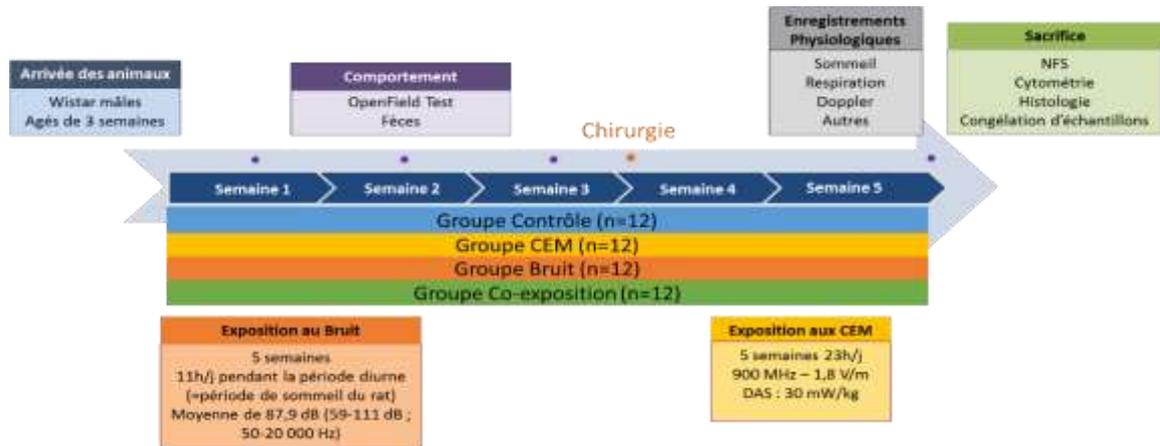


Figure 16 : Schéma du déroulement des expérimentations

## 4. Paramètres étudiés

### 4.1. Paramètres hypniques

L'enregistrement du sommeil a été effectué par l'intermédiaire d'un implant télémétrique (F20-EET, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA). Cet implant télémétrique, disposé chirurgicalement au début de la 4<sup>ème</sup> semaine d'exposition, permettait l'enregistrement de deux biopotentiels, dans notre cas, un EEG et un EMG. Pour cela, l'animal a été mis sous anesthésie générale. Celle-ci était initiée par un mélange gaz/air, de 5 % d'isoflurane (Iso-Vet 1000 mg/g, Piramal Healthcare UK Ltd, Morpeth, United-Kingdom) puis était maintenue par un mélange à 2,5 %. Une fois anesthésié, l'animal était placé en position ventrale sur un champ stérile (Barrier, Mölnlycke Health Care, Wasquehal, France) lui-même disposé sur un tapis chauffant (Thermoplasme, Cromex, France). Une incision longitudinale au sommet du crâne était effectuée, de la zone temporale jusqu'à dégager les muscles de la nuque. La peau écartée, une rugine permettait de préparer l'os à l'installation du ciment. Deux trous ont été percés dans l'os, de part et d'autre de la suture fronto-pariétale, à droite de la suture longitudinale. Deux vis, plaquées d'or (15 surtex, Dentatus AB, Spånga, Sweden) ont été alors insérées jusqu'à entrer en contact avec la dure mère. Les électrodes de l'EEG étaient alors enroulées autour des vis et le tout était recouvert d'un ciment dentaire afin d'assurer la stabilité et l'isolation électrique vis-à-vis de muscles sus-jacents. Les électrodes de l'EMG étaient insérées dans les muscles de la nuque et fixées avec une suture de part et d'autre du muscle. L'implant était ensuite placé en position sous cutané et l'incision suturée avec du fil non résorbable. Avant son réveil, l'animal recevait en intrapéritonéal une dose d'analgésique, sous la forme de buprénorphine à la concentration de 0,05 mg/kg (Buprécare, Axiene, Pantin, France). A la suite de cet acte chirurgical, l'animal était remis dans sa cage et surveillé régulièrement.

L'implant télémétrique était connecté à un receveur (RPC-1, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) situé sous la cage de l'animal et connecté à l'ordinateur à travers une matrice (Data Exchange Matrix, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA). Les données étaient enregistrées par un logiciel dédié appelé Ponemah (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA).

Les données polysomnographiques ont été analysées à l'aide du logiciel Spike pour discriminer toutes les 4 secondes les états d'éveil, de NREM, de REM et de micro-éveil et d'avoir la durée totale, la durée moyenne et la fréquence des stades. Etaient également obtenus, la durée totale de sommeil et le ratio NREM/REM.

#### 4.2. Paramètres immunologiques

L'étude de ces paramètres ont été fait en collaboration avec le laboratoire Hématim (UPJV-Amiens)

Les différentes analyses menées sur le système immunitaire de l'animal ont été menées suite au sacrifice de ce dernier. A la suite du prélèvement intracardiaque du sang et afin de limiter les phénomènes de coagulation, les tubes étaient disposés sur une roue à température ambiante. A J+1, une Numération de la Formule Sanguine (NFS) était réalisée sur le KT-6400 (Genrui Biotech Inc. Shenzhen, Chine).

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) provenant des animaux ont été isolées en utilisant une séparation de gradient par Ficoll Pacques Plus © (GE-Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni). Les cellules ont été lavées dans une solution saline tamponnée phosphatée (PBS, Corning, New York, USA) puis congelées dans du sérum foetal bovin (FBS) et du diméthylsulfoxyde (DMSO) (90 % de FBS et 10 % de DMSO) jusqu'au marquage. Les cellules spléniques et thymiques ont été extraites pour la rate et le thymus à l'aide de d'un tube M et du programme « rate » de l'Octodissociateur (Miltenyi Biotec).

Avant marquage, les cellules, quelles soient issues de la rate, du thymus ou des PBMC ont été décongelées dans du milieu RPMI (PAN-Biotech, Aidenbach, Allemagne) additionné de 10% de FBS (Eurobio, Courtaboeuf, France), 2 mM de L-glutamine (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) et 50 U/ml de pénicilline-streptomycine (Sigma Aldrich) pendant trois heures. Les cellules ont ensuite été marquées avec des anticorps conjugués à un fluorochrome. Les anticorps suivants ont été utilisés pour l'analyse par cytométrie de flux: PE-anti-rat-CD3 (clone REA223), APC-anti-rat-CD4 (clone REA482), FITC-anti-CD8a (clone REA437), FITC-anti-rat- IgM (clone ES26-13D3.4), APC-anti-rat-CD45R (clone REA450), APCVio770-anti-rat-CD45 (clone REA504), FITC-anti-rat-CD161 (clone REA227), APC, anti- rat-IgG1 (clone RG11 / 39.2) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) et CD27-PE (clone LG3A10) (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). Des analyses des populations lymphoïdes

ont été effectuées sur des événements déclenchés ( $1 \times 10^5$  cellules viables) selon les paramètres FSC/SSC.

Tous les échantillons ont été acquis en utilisant un MACSQuantify (Miltenyi Biotec). L'analyse de cytométrie a été effectuée sur le logiciel FlowJo v10.2.

#### 4.3. Paramètres métaboliques

##### 4.3.1. *Prise Alimentaire et Prise Hydrique*

Chaque animal disposait d'une mangeoire individuelle placée sur une balance électronique Sartorius TE601 (Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, Germany) ayant une sensibilité de 0,1 g. L'animal avait un accès *ad libitum* à l'alimentation à travers une grille et pour limiter les imprécisions de mesure un réceptacle au bas de la grille permettait de récupérer les petits fragments ou poussières non-ingérés. Ces balances, reliées à l'ordinateur, permettaient d'enregistrer les variations de quantité de nourriture présente sur la balance et donc de savoir la quantité absorbée par l'animal. Cet enregistrement étant horodaté, l'heure des repas et la durée des repas étaient connues. Les paramètres qui ont été extraits de ce fichier sont la quantité totale de nourriture ingérée, la quantité moyenne de nourriture par repas, la durée moyenne et le nombre de repas. La quantité totale et la quantité moyenne par repas ont été rapportées au poids de l'animal.

Les cages disposaient d'un biberon individuel gradué permettant le suivi de la consommation hydrique de l'animal. La sensibilité du biberon était de 5 mL.

##### 4.3.2. *Poids corporel*

Tous les deux jours à partir de leur arrivée dans le laboratoire les animaux étaient pesés sur une balance de sensibilité 0,1 g (Scaltec Instruments, Göttingen, Germany). Le gain de poids des animaux ont été calculé par rapport au poids de l'animal à son arrivée au laboratoire.

##### 4.3.3. *Poids des organes*

Lors du sacrifice de l'animal, les organes étaient récupérés, pesés et sectionnés afin de les conserver soit au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ , soit dans du formol puis dans la paraffine. La mesure du poids a été faite par une balance Sartorius BP211D (Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, Germany) ayant une sensibilité de 0.01 mg. Ces poids ont été exprimés en valeurs brutes et en pourcentage par rapport au poids corporel.

#### 4.4. Pléthysmographie

La pléthysmographie correspond à l'étude des paramètres respiratoires (temps inspiratoires, temps expiratoires, fréquences respiratoires et apnées) de l'animal au cours d'une période donnée. Ce test était effectué afin de récupérer ces paramètres pendant une période d'une heure. Pour cela l'animal était placé dans une chambre de pléthysmographie (Model PLY3213, Buxco-EMKA Technologies, Sharon, CT, USA). Avant le début de l'enregistrement, deux phases d'habituation à cette chambre ont été effectuées, la première la veille, d'une durée de 30 min, et la seconde immédiatement avant le début de l'enregistrement d'une durée de 45 min. L'enregistrement avait lieu en période diurne hors des chambres climatiques, dans un environnement non-exposé.

En parallèle de ce test et afin de pouvoir discriminer les résultats selon les stades de sommeil, l'EEG et l'EMG ont été enregistrés.

Les apnées ont été définies comme des arrêts de la respiration d'une durée était supérieure à 2,5 secondes, soit deux cycles respiratoires.

#### 4.5. Autres paramètre étudiés

##### 4.5.1. Comportement

Afin d'évaluer le comportement de l'animal, l'Open Field Test a été choisi car il permet d'enregistrer l'activité locomotrice et le comportement explorateur du rongeur dans un espace clos. Cela permettait également d'évaluer le degré d'anxiété, un animal anxieux évitant le centre du terrain ouvert, et préférant être près des murs. Le système est de forme cubique (45 x 45 x 35 cm) avec deux hauteurs de capteurs infra-rouge séparés de 10 cm permettant d'évaluer si le rat était le long du sol ou dressé sur ses pattes arrières. Les parois de l'Open Field était opacifié. Le plancher de l'appareil a été virtuellement divisé en quatre zones appelées «murs», «coins», «centre» et «périphérie centrale» (Figure 17).

Le test a été effectué pendant 10 min, une fois par semaine entre 13h30 et 15h30, pendant la période diurne exposée (y compris l'exposition aux CEM). L'OPF était placé dans la chambre climatique mais n'était pas sous une antenne. L'enregistrement et l'analyse ont été faites à travers le logiciel Actitrack (Panlab, Barcelone, Espagne).

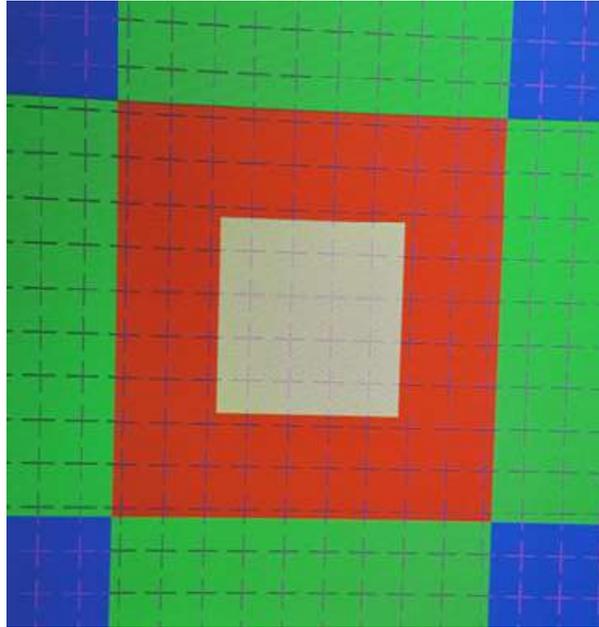


Figure 17 : Zones définies virtuellement sur Actitrack, Coins en bleu, Mur en vert, Périphérie centrale en rouge, Centre en gris

#### 4.5.2. Fèces

En parallèle de l'Open Field Test réalisé pendant les trois premières semaines d'exposition, les fèces produites par l'animal sur une période de 20 heures (du changement de litière la veille à 17h00 jusqu'au début de l'OFT à 13h00) ont été récupérées, comptées, pesées et conservées à -80°C. Les paramètres obtenus étaient ainsi le nombre de fèces, le poids total des fèces et le poids moyen d'une fèces.

#### 4.5.3. Laser Doppler

La microcirculation cutanée a été évaluée en utilisant la technique du laser doppler. Cette mesure a été effectuée dans la chambre climatique la veille du sacrifice (après les cinq semaines d'exposition). Au cours de cette mesure, l'exposition aux CEM (si le groupe était concerné) était éteinte pendant la durée d'enregistrement. En revanche, l'exposition au bruit restait en marche dans les groupes concernés.

Afin que les rats soient immobiles, les rats étaient préalablement anesthésiés au pentobarbital (dose 50 mg/kg ; Pentobarbital Sodique 54,7 mg/mL, Ceva Santé, Libourne France), puis une fois l'anesthésie complète les animaux étaient placés en position ventrale sur le couvercle de la cage sur un matelas de coton.

Deux sondes (Probe 457, Perimed, Järfälla, Suède) ont été placées respectivement sur l'oreille gauche et la patte droite de l'animal et branchées sur l'appareil (Flowmeter Periflux System 5010, Perimed, Järfälla, Suède). Ces sondes utilisent une longueur d'onde de 780 nm, spécifique de l'évaluation de la microcirculation superficielle cutanée. Afin de calibrer les électrodes, une solution de 0,5 % de microsphères de polystyrène de 0,48  $\mu\text{m}$  a été utilisée, conférant comme valeur basale  $250 \pm 4$  PU.

L'enregistrement s'est déroulé sur trois phases, une phase d'enregistrement de l'état basal d'une durée de 10 min, une phase de 2 min pendant laquelle la température de la sonde était montée à 44°C afin de voir la réaction à une contrainte thermique localisée.

Les données recueillies par la sonde sont la perfusion unitaire et la température qui ont été enregistrées par le logiciel Perisoft (version 2.10, Perimed, Järfälla, Suède).

## PARTIE EXPERIMENTALE

Etude 1 : Impacts d'une exposition chronique à une contrainte sonore de haute intensité sur le sommeil, le poids et la prise alimentaire de rats juvéniles

### ***Introduction***

L'exposition au bruit est un problème récurrent remontant à l'Antiquité. De nos jours, dans les pays développés, un tiers de la population souffre d'une perturbation ou d'un manque de sommeil. De plus, d'après les grandes instances internationales, la population est exposée à des nuisances sonores supérieures à 65 dB alors que des effets sur le sommeil et sur le système nerveux autonome sont observés dès 55 dB (Basner, 2008; Basner et al., 2006). Les études habituellement menées sur les effets du bruit sur le sommeil s'intéressent à des expositions aiguës et peu d'entre elles ont été menées sur une population juvénile malgré la vulnérabilité particulière de cette population et l'importance de son sommeil.

L'objectif de ce premier travail était d'analyser les impacts d'une exposition chronique au bruit sur le sommeil d'une population juvénile.

### ***Matériel et méthodes***

Pour mener à bien cette étude, 24 rats mâle Wistar, répartis en deux groupes de 12, ont été exposés (ou non) à une nuisance sonore pendant 5 semaines (de l'âge de 3 à 8 semaines). L'exposition, d'une durée de 11 heures par jour, se déroulait pendant la période diurne, qui est la période de sommeil de l'animal. L'intensité sonore était de 87,5 dB, avec une gamme de fréquences allant de 50 à 20 000 Hz. Les bruits utilisés, chacun d'une durée de 10 minutes, étaient des bruits environnementaux (travaux, trafic routier, musique...) et des bruits artificiels (blancs, rouges, sinusoïdes...).

Après trois semaines d'exposition chronique, les animaux ont été opérés afin d'y disposer un implant télémétrique permettant l'enregistrement de l'EEG et de l'EMG. Cet enregistrement a eu lieu au cours de la 5<sup>ème</sup> semaine d'exposition au bruit. Au cours de cette même semaine, les prises alimentaires et les prises hydriques ont été quotidiennement enregistrées. Les poids des animaux et le gain de poids depuis l'arrivée de l'animal au laboratoire ont été mesurés tous les deux jours. A la fin de cette période d'enregistrements, un enregistrement des paramètres pléthysmographiques a été effectué pendant une heure au cours de la période diurne, dans un environnement non exposé au bruit. Lors du sacrifice (premier jour de la sixième semaine), les organes ont été collectés et pesés. A partir de

l'hypothalamus, l'expression génique de POMC, NPY, CART et des récepteurs à la leptine ont été évalués par RT-PCR.

### ***Résultats***

Les animaux exposés au bruit présentait une hyperphagie de l'ordre de 15 % et une augmentation du gain de poids d'environ 6 %. Les poids relatif (par rapport au poids corporel) du thymus et des glandes surrénales étaient significativement plus élevés chez les animaux exposés au bruit. En revanche, les poids relatifs du cœur, du cerveau, des reins, de la rate, des poumons et du foie n'ont pas montré de variation significative.

L'analyse du sommeil sur la période de 24 heures a montré des différences de la structure principalement pendant la période nocturne (période active de l'animal). Les fréquences du QW et du NREM étaient plus faibles chez les animaux exposés. De plus, le rapport NREM/REM était modifié en faveur du REM bien que la durée totale du sommeil n'ait pas été impactée. Les données enregistrées à partir du pléthysmographe (en absence de bruit), le sommeil enregistré dans le pléthysmographe est modifié chez les animaux exposés au bruit. La durée totale d'éveil était inférieure au profit du REM (significativement plus important chez les animaux exposés) et du NREM (résultat indicatif) entraînant une augmentation de la durée totale de sommeil. Le ratio NREM/REM était ainsi significativement modifié en faveur du REM. En revanche, n'ont pas montré de variation du nombre d'apnées réalisé par le rat, ni de leur durée moyenne.

Les expressions géniques dans l'hypothalamus ont montré une augmentation de l'expression de CART, une diminution des récepteurs à la leptine et une absence de variation quant à POMC et NPY.

### ***Discussion***

A notre connaissance, cette étude est la première à s'intéresser aux effets d'une exposition sonore chronique de haute intensité sur l'homéostasie de rats juvéniles.

Lorsque nous considérons la période d'analyse du sommeil sur 24 heures, les effets d'une exposition au bruit étaient faibles et touchaient principalement le NREM. Pour discriminer plus finement ces effets, une analyse en fonction de la période nyctémérale a montré que les variations avaient lieu principalement pendant la période nocturne (période active de

l'animal, en absence de bruit) et non pendant la période diurne (période exposée au bruit). Pendant cette période diurne, ces effets indirects étaient observés sur le NREM, ce qui est cohérent avec des « effets directs » tels qu'ils ont déjà été observés lors d'expositions au bruit ayant lieu pendant le sommeil de l'Homme (Cantrell, 1974; Muzet et al., 1974). Au vu des faibles modifications du sommeil des animaux observés dans notre protocole, nous nous sommes demandés si l'intensité sonore (87,5 dB) était suffisante. Or la littérature a montré qu'une exposition aiguë de rongeurs à 85 dB induisait bien des effets sur le sommeil (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017). Le paramètre intensité sonore n'était donc pas à remettre en cause. De plus, durant la période d'enregistrements de la pléthysmographie sans exposition au bruit, les animaux préalablement exposés présentaient une augmentation de la durée totale de sommeil venant principalement de l'augmentation de la durée du REM. Au vu de ces éléments, nous avons pu émettre plusieurs hypothèses. La première était celle d'une habituation des animaux à la perturbation sonore de sorte que plus aucun effet hypnotique ne soit observé au bout de 5 semaines d'exposition. Toutefois, la présence de faibles effets en période nocturne et surtout les effets observés pendant la pléthysmographie typique des effets de rebond suite à une privation de sommeil n'étaient pas en faveur d'une telle hypothèse. La pression de sommeil accumulée par le rat au cours des semaines d'exposition pourrait alors masquer les effets délétères. Toutefois, l'exposition n'ayant lieu que pendant 11 heures par jour, le rat aurait eu la possibilité de décaler son rythme de sommeil afin de dormir pendant la période nocturne (sans bruit). Le fait que ceci ne soit pas observé peut témoigner d'un maintien du rythme circadien de sommeil. une autre possibilité est que le rat ait présenté une altération de la répartition du sommeil dès la fin de l'exposition au bruit (pendant la période de 1h dédiée aux soins pendant laquelle le sommeil n'est pas enregistré) ou juste après, qui n'apparaîtrait pas significativement quand l'analyse porte sur la totalité de la nuit.

Concernant les effets sur les le poids et la prise alimentaire, les animaux exposés au bruit présentaient une augmentation du gain de poids. Cette augmentation était accompagnée d'une augmentation de la prise alimentaire et de la prise hydrique. Ces variations sont cohérentes avec de précédentes études menées sur l'animal (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017). Ces altérations des paramètres pourraient venir d'un effet direct du bruit, mais également d'un effet indirect via les perturbations du sommeil par le bruit. En effet, une

perturbation du sommeil peut entraîner une augmentation du stress qui conduit à des variations dans le poids (von Kries et al., 2002; Spiegel et al., 1999).

En parallèle, des augmentations du poids et de la prise alimentaire, une augmentation de l'expression génique de CART et une diminution de l'expression des récepteurs à la leptine ont été observés. Toutefois, NPY et POMC n'ont pas présenté de variation. Ainsi, la diminution des récepteurs à la leptine pourrait être une des explications de l'hyperphagie des animaux et cela malgré l'absence de variation de NPY, molécule orexigène.

Enfin le dernier paramètre analysé dans cette étude est le poids des organes. Lors d'une exposition au bruit, les animaux avaient une augmentation du poids du thymus et des glandes surrénales sans que les autres organes ne soient impactés. Cette augmentation pourrait être un second élément lié aux différences de prise alimentaire et de gain de poids, par l'intermédiaire des glucocorticoïdes. Malheureusement, le dosage de ces molécules est un chaînon manquant dans cette étude. L'augmentation du poids du thymus a déjà été relevé chez des animaux exposés au bruit (Zymantiene et al., 2017) et pourrait provenir d'un rebond thymique lié à un effet stress ou à une atteinte immunitaire. Un suivi à long terme des paramètres morphométriques de cet organe dans notre étude aurait également permis de discriminer si l'involution n'a pas eu lieu, ou si celle-ci est retardée dans le temps.

Article : Impacts of chronic, high-level noise exposure on sleep and metabolic parameters: a juvenile rodent model

**Authors:**

Aymar BOSQUILLON de JENLIS<sup>1</sup>, Flavia DEL VECCHIO<sup>1</sup>, Stéphane DELANAUD<sup>1</sup>, Jérôme GAY<sup>1</sup>,  
Véronique BACH<sup>1</sup>, Amandine PELLETIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PériTox, Périnatalité & Risques Toxiques, UMR-I 01 INERIS, Picardie Jules Verne University,  
Amiens, France

**Corresponding author:**

Dr Amandine PELLETIER

Amandine.pelletier@u-picardie.fr

PériTox Laboratory, CURS, Présidence, Chemin du Thil – 80025 Amiens

**Acknowledgements**

We thank Professor Jean-Pierre Libert for helpful discussions, and David Fraser PhD (Biotech Communication SARL, Ploudalmézeau, France) for reviewing and revising the manuscript's English. We also thank Ludovic Didier at the PlatAnn facility for his help.

**Declaration of competing financial interests**

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Keywords:** noise, chronic exposure, juvenile rat, sleep, metabolism, apnea

## Abstract

**Background:** Noise is an environmental factor responsible for sleep and metabolic disorders. Sleep is a vital function, since it underpins physiologic processes and cognitive recovery and development. However, the effects of chronic noise exposure on the developing organism are still subject to debate. **Objective:** The objective of the present study was to assess the effects of chronic, high-level noise exposure on sleep, apnea, and homeostasis in juvenile rats.

**Methods:** Twelve 3-week-old male Wistar rats were exposed to noise (87.5 dB, 50-20000 Hz) for 5 weeks and two days during the 12 hr light period. Sleep, food and water intake, apneas, body and organs weight data were recorded.

**Results:** Five weeks of high-level noise exposure were associated with hyperphagia (+15%), body weight gain (+6%), a heavier thymus (+26%), and heavier adrenal glands (+117%). A sleep analysis highlighted microstructure changes in the dark period: in particular, the mean daily amount of REM sleep as a proportion of TST was higher. The mean daily amount of NREM sleep was lower in the exposed group, meaning that the intergroup difference in the TST was not significant. During a one-hour, noise-free plethysmographic recording during the light period, the mean total amount of active-wakefulness was lower in the exposed group (by 9.1 min), whereas the mean duration of an episode of REM sleep was higher (by +1.8 min) and the TST was higher (by 10.7 min).

**Discussion:** Chronic exposure of juvenile rats to high-intensity noise during the light period was associated with some small but significant sleep disturbances, greater food and water intakes, greater body weight gain, and greater thymus and adrenal gland weights. The main effects of noise exposure on sleep were also observed in the one-hour plethysmography session after five weeks of exposure.

## Introduction

In developed countries, a third of the population suffers from poor-quality sleep and/or a lack of sleep. The main cause of these sleep disturbances is noise exposure. According to the Organization for Economic Co-operation and Development, 100 million people are exposed to noise levels exceeding 65 dB(A) (OECD, 2001). This is despite the fact that 55 dB(A) noise is known to increase the secretion of hormones regulated by the autonomic nervous system and which promote awakening (Basner, 2008; Basner et al., 2006). Indeed, noise exposure is associated with both auditory and non-auditory effects (including sleep disturbances).

Sleep can be disturbed either directly (when exposure to noise occurs during the sleep period) or indirectly (as an after-effect, when exposure occurs before the sleep period). Epidemiologic studies of populations living close to airport or major roads have shown that nocturnal noise exposure decreases subjective sleep quality, and increases difficulty in falling asleep, awakenings and altered sleep stages (especially a reduction in the proportion of REM sleep) (Basner, 2008; Frei et al., 2014; Hobson, 1989; Weyde et al., 2017). Interventional studies in humans have shown that daytime noise decreased REM sleep duration (Blois et al., 1980) while transient nighttime noise up to 71 dB(A) did not modify REM duration but increased transient activation phases (Bach et al., 1991). In rats, environmental acute exposure (for 1 day) and pseudo-chronic exposure (for 9 days) to 85 dB noise during the sleep period was found to fragment sleep and reduce the amount of rapid eye movement (REM) sleep, the amount of non-REM (NREM) sleep, and the total sleep time (TST) (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017).

Besides these effects on sleep, epidemiologic studies of adults have linked noise to hyperglycemia (Eze et al., 2017), elevated blood triglyceride levels (Axelsson and Lindgren, 1985), elevated waist circumference, and obesity (Pyko et al., 2015). Although it is difficult to establish whether these metabolic effects are mediated by sleep disturbances or not, the latter are known to modify certain metabolic functions, which in turn may result in body weight loss (Moraes et al., 2014) or gain (Michel et al., 2003).

In the literature, most investigators have evaluated the physiologic effects of acute or pseudo-chronic exposure to noise over periods ranging from 1 h to 9 days, with intensities of 85 to 90 dB (Mavanji et al., 2013; McCarthy et al., 1992; Rabat, 2007; Rabat et al., 2005; Van

Campen et al., 2002; Zheng and Ariizumi, 2007). Only one study (in mice) assessed long-term, chronic noise exposure (90 dB for 5 h/day over 4 weeks), i.e. under conditions that are more representative of the environment commonly encountered by the population ((Zheng and Ariizumi, 2007). All the above-cited studies were performed with either environmental noise or artificial (white) noise. Artificial noise is not always appropriate for experiments in the rat, because the latter's auditory system is shifted towards high frequencies than in humans (Heffner et al., 1994). Furthermore, it has been shown that white noise has a more harmful impact on sleep than environmental noise does (Rabat et al., 2004). In the present study, we chose to combine environmental and white noise with a mean intensity of 87.5 dB; this corresponds to high-level exposure but does not perturb the rat's auditory functions, even when administered for long periods (Cappaert et al., 2000).

Most of the literature data on the effects of noise on sleep or metabolic functions were generated in studies of adults; this is despite the fact that sleep processes are particularly relevant for body growth, homeostasis, and brain and organ maturation in developing organisms (Porkka-Heiskanen, 2013; Stansfeld and Clark, 2015).

The objective of the present study was to analyzing the effects of chronic noise exposure on hypnic and homeostatic parameters in juvenile rats. Sleep, body weight, the weight of several organs, food and water intakes, and episodes of sleep apnea were recorded. The mRNA expression levels of several genes involved in the regulation of food intake (coding for pro-opiomelanocortin (POMC), neuropeptide Y (NPY), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), and the leptin receptor) were also assessed. Our starting hypothesis was that juvenile rats exposed to chronic noise would present sleep and homeostasis disturbances (relative to control, non-exposed animals), and that these disturbances would be associated with developmental changes (e.g. differences in food intake and/or body and organ weights).

## Material and methods

### Animals

Experiments were conducted on 24 male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) weighing between 55 and 85 g and aged 3 weeks at the time of their arrival in our facility (day (D)1). Two groups of animals were formed: a noise-exposed group (n=12) and a control, non-exposed group (n=12). Each group was housed in a separate anechoic chamber with a controlled thermoneutral air temperature ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ), 12 hr:12 hr dark/light cycle (lights on at 6 am and off at 6 pm), relative air humidity (mean  $\pm$  standard deviation (SD):  $39\pm 12\%$ ) and air velocity ( $<0.2$  m/s). Rats were individually housed in plastic cages (425 mm x 266 mm x 185 mm) within the chamber. Food (3436EXF12, Serlab, Montataire, France) and water were available *ad libitum*. Daily animal care was performed between 5 pm and 6 pm. Experiments were performed in accordance with the European guidelines (2010/63/EU) and the French governmental decree 2013-118 on the care and use of laboratory animals. The study protocol was approved by the nationally accredited Regional Directorate for Health, Animal and Environment Protection (Amiens, France) and the French Ministry of Research (license number: APAFIS#3735-2016012017118094 v3).

### Noise exposure

The noise exposure protocol was initiated after 4 days of adaptation, and continued for the following five weeks (i.e. from D5 to D41). Exposed animals were subjected to a 24 hr soundtrack divided into two main periods: a noise-free dark period from 5 pm to 6 am, and a noisy light period (the rat's rest period) from 6 am to 5 pm. The high-level noise exposure was therefore temporarily interrupted during handling and during plethysmographic measurements (between 5 pm and 6 pm, when the intensity of the background noise was 65 dB).

The noise exposure period was split into 10 min segments, each of which had a unique combination of noise type, frequency and intensity. The noise types were urban sounds (traffic, roadworks, sirens, etc.), music, and artificial sounds (white noise, red noise, sinusoids, etc.). The mean  $\pm$  SD (range) sound level was  $87.5\pm 3.7$  dB (59–111). The frequencies ranged from 50 to 20,000 Hz. To avoid habituation, four different 24 hr noise exposure files were built out of 10-minute segments arranged in a pseudo-random order. Each day's noise exposure

file was chosen in a pseudo-random manner. The noise was regulated by an amplifier (Combo 130, Audiophony Hit Music SAS, Fontanes, France) and delivered through loudspeakers (K50-8 Ohm, JBSystems, Groot-Bijgaarden, Belgium).

### **Protocol**

After 4 days of habituation to housing conditions, animals were exposed (or not) to noise for 5 weeks (until D41). On D26 or D27, a telemetric sensor was surgically implanted in each animal. From D33 to D39, electroencephalography (EEG), electromyography (EMG), food intake, water intake and body weight data were recorded. At D41, the rats were sacrificed by heart puncture under general anesthesia with a mixture of air and 2.5% isoflurane (Iso-Vet 1000 mg/g, Piramal Healthcare UK Ltd, Morpeth, United-Kingdom), and the brain, heart, lungs, spleen, thymus, liver, kidney, and adrenal glands were collected.

### **Surgery**

A subcutaneous telemetric EEG and EMG sensor (F20-EET, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) was implanted under general anesthesia with isoflurane (5% for induction, and then 2.5% during surgery). To record the EEG signal, two gold-plated screws (15 SURTEX, Dentatus AB, Spånga, Sweden) were inserted into the animal's skull, just above the dura matter. Dental cement (Dentalon, Henri Schein, Alfortville, France) was used to fix the probe and isolate the EEG signal. To measure the EMG signal, two probes were inserted into the dorsal muscles of the neck. After surgery, animals were allowed to recover for 5 or 6 days, depending on whether surgery had been performed on D26 or D27.

### **Data acquisition and analysis**

#### *Body and organ weights*

The animals' body mass was measured every other day using scales (Scaltec SPO-62, Scaltec Instruments, Göttingen, Germany; sensitivity: 0.1 g). The weight gain was calculated as follows:  $Weight\ gain = Weight\ at\ D_x - Weight\ at\ D_1$

After sacrifice, the organs were weighed using high-precision scales (Sartorius BP211D, Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, Germany, sensitivity: 0.01 mg). The weight was expressed as a percentage of the body weight.

### *Food and water intakes*

Daily food intake was scored automatically with individual scales (Sartorius TE601, Sartorius Lab Instruments GmbH; sensitivity: 0.1 g). The time, duration (in s) and the quantity of each meal (in g) were recorded using in-house software. Water intake was measured daily, using individual nursing bottles (sensitivity: 5 mL).

### *Sleep*

The EEG and EMG sensors were connected wirelessly to a receiver (RPC-1, Data Sciences International) and a computer via a matrix (Data Exchange Matrix, Data Sciences International). Data were recorded using Ponemah software (Data Sciences International).

Recordings were scored visually every 4 seconds with Spike2 software (version 7.01, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) as active wakefulness (AW), quiet wakefulness (QW), NREM sleep, and REM sleep. Quiet wakefulness was defined as a short episode (lasting between 8 sec and 2 min) of wakefulness within a sleep episode, and during which the animal did not move or eat (Pelletier et al., 2013). For NREM and REM sleep, the total amount (in min per 24 hr), episode frequency (per hour), mean episode duration (in min) and proportion of TST (in %) were calculated.

Due to technical problems, sleep parameters could not be calculated for 2 of the 12 noise exposed animals.

### *Apnea*

On D40, the number and duration of apnea episodes over a one-hour period were measured using whole-body plethysmography (Model PLY3213, Buxco-EMKA Technologies, Sharon, CT, USA) during the light period but in the absence of high-level noise exposure. Rats were familiarized with the plethysmograph for 30 min the day before the measurement and then for 45 min on the day of the measurement. Noise-exposed animals were kept away from noise exposure for 105 min before the measurement. Sleep parameters and apnea events (defined as the cessation of ventilation for at least 2.5 s, i.e. at least two missed breaths) were recorded.

### *Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Total RNA was isolated from hypothalamic samples using the GenUp™ Total RNA kit (biotechrabbit, Hennigsdorf, Germany), according to the manufacturer's instructions. After determination of the RNA concentration using a nanovolume system (Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific, Madison, WI, USA), 2 µg of RNA were used for cDNA synthesis with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). For transcript detection with quantitative real-time PCRs, primers (Table 1) were purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France), and SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) was used. PCRs were run on an ABI Prism 7900 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA). The housekeeping genes coding for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β-actin were used as endogenous controls.

The PCR conditions were as follows: denaturation for 1 min at 95°C, annealing at between 58 and 60°C (depending on the primer), and elongation for 2 min at 72°C. All PCR reactions were performed in duplicate. The results were expressed in arbitrary units using a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  calculation, relative to the control samples ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposed}} - \text{mean } \Delta Ct_{\text{control}}$ ). The expression level of each gene studied was the same relative to GAPDH and relative to β-actin mRNA, and so all results were expressed relative to GAPDH only in the final analysis.

#### *Statistical analysis*

Data (expressed as the mean ± SD) were analyzed using Statview software (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). When the data were normally distributed (according to a Kolmogorov-Smirnov test), a two-way analysis of variance (with Fisher's partial least-squares difference post-test) and Mann-Whitney tests were applied to probe the effects of noise exposure and the dark/light period on sleep and food intake parameters. The threshold for statistical significance was set to  $p < 0.05$ .

## Results

### *Body weight*

On D41, the mean  $\pm$  SD body weight was higher in the noise-exposed group ( $279.5 \pm 26.7$  g) than in the control (non-exposed) group ( $290.6 \pm 33.3$  g), although this difference did not achieve statistical significance). However, the mean  $\pm$  SD body weight gain between D1 and D41 was significantly higher in the noise-exposed group ( $222.7 \pm 28.8$  g) than in the control group ( $210.8 \pm 25.5$  g;  $p=0.043$ ).

The mean  $\pm$  SD absolute weights of the thymus and adrenal glands and their weights relative to body weight were significantly higher in the noise-exposed group (Table 2). There were no significant intergroup differences in weight for the brain, heart, lungs, spleen, liver, and kidneys.

### *Food and water intakes*

As shown in Table 3, exposed animals ate more than control animals during both the light and dark periods; the mean total food intake was 2.72 g higher ( $p<0.001$ ), the number of meals per 24 hr was 1.2 higher ( $p=0.001$ ), and the meal duration was 2.5 min longer ( $p=0.002$ ) when considering pooled data from the light and dark periods. The mean water intake was 7.3 mL higher in the exposed group ( $p<0.001$ ). Given the significant difference in the food intake/body weight ratio between the control and exposed groups ( $p<0.001$ ), the higher food intake in noise-exposed group was not related to a higher body weight.

### *Sleep analysis per 24 h period*

In the control group, the total amounts of AW and REM sleep were lower during the light period than during the dark period, and the total amount of QW, the total amount of NREM sleep, and the TST were higher (Table 4). Moreover, AW episodes were less frequent during the light period, whereas QW and NREM sleep episodes were more frequent. On average, the QW episodes were longer during the light period, whereas the AW and REM episodes were shorter.

Noise exposure was associated with significant differences in the sleep structure (relative to the control group) during both the light and dark periods (Table 4). For the 24 h period as a whole, QW and NREM sleep were less frequent in the exposed group than in the control group

(by 2.3 and 2.4 episodes/h), and the mean duration of NREM sleep episodes was greater (by 0.3 min). The other effects depended on the nycthemeral period; there was a significant interaction between the period (dark, light) and noise exposure. During the light period, the total amount of NREM sleep was 21.1 min greater in the exposed group than in the control group. During the dark period, the total amount of NREM sleep was 22.6 min lower in the exposed group. The intergroup difference in the total amount of REM was similar in the light and dark periods (respectively 4.7 and 5.2 min lower in the exposed group). The NREM/TST ratio was lower in the exposed group (by 3.1%), whereas the REM/TST ratio was higher.

#### *Sleep during the plethysmographic recordings, in the absence of high-level noise exposure*

Noise exposure was also associated with differences in the sleep structure during a one-hour, noise-free plethysmographic recording during the light period (Table 5). Relative to the control group, the noise-exposed group displayed a significantly lower total amount of AW (by 9.1 min). There was a non-significant trend towards a lower AW frequency (by 1.0 episode/hr,  $p=0.07$ ) in the exposed group. The TST was higher in the exposed group (by 10.7 min), as a result of non-significant relative increases in the durations of REM and NREM sleep episodes (by 1.8 min and 8.9 min, respectively). There was an intergroup difference in the NREM/REM sleep ratio; as a percentage of TST, the total amount of REM was 3.9 points higher in the exposed group. REM sleep episodes were more frequent (by 2.6 episodes) in the exposed group, and the mean duration of NREM sleep episodes was longer (by 1 min). There was no intergroup difference with regard to QW.

#### *Apnea*

Noise exposure was not associated with a significant intergroup difference in the frequency of apnea ( $7.3\pm 7.8$  episodes/hr in the control group vs.  $9.6\pm 8.4$  episodes/hr in the exposed group; NS) or the mean duration of an episode of apnea ( $3.2\pm 0.5$  vs  $3.1\pm 0.3$  s, respectively; NS).

#### *Gene expression in the hypothalamus*

There was no intergroup difference in the mRNA gene expression level for either POMC or NPY. Relative to the control group, CART mRNA expression levels were significantly higher in the exposed group, whereas leptin receptor mRNA expression was significantly lower (Table 6).

## Discussion

To the best of our knowledge, the present study is the first to have evaluated the effects of chronic daytime exposure to high-level noise on the main physiological functions involved in the control of body energy balance (sleep, respiration, and energy intake) in growing organisms. Our results indicate that chronic, high-level noise exposure during the daytime (rest) period is associated with sleep disturbances, elevated body and organ weights, and greater food and water intakes in juvenile rats.

In contrast, we did not observe an intergroup difference in the frequency or duration of apnea episodes. The incidence of noise exposure on physiological apnea has not previously been studied. Unfortunately, we could not analyze apnea as a function of the sleep state because only 16% of animals experienced an apnea episode during REM sleep.

When considering the 24 h period as a whole, the effects of noise exposure on sleep were small: a lower frequency and a longer mean episode duration for NREM sleep. Interestingly, the effects of noise exposure appeared to depend on the nycthemeral period. During the light period (the rat's resting period) with noise exposure, the only notable changes were related to NREM sleep (i.e. direct effects of noise that were consistent with previous observations of humans exposed to noise at night (Cantrell, 1974; Muzet et al., 1974)). Sleep was altered more markedly during the dark (noise-free) period, i.e. as after-effects: a lower total amount of NREM sleep, an increase in the total amount of REM sleep, and thus a lower NREM/REM sleep ratio. During a one-hour, noise-free, daytime plethysmography session, the sleep parameters were modified even more markedly: the TST was 10.7 min longer in the exposed group, as a result of increases in the total amounts of NREM sleep and (especially) REM sleep. The NREM/REM sleep ratio was therefore lower in the exposed group than in the control group.

The very small effects of noise on sleep in our study (with regard to the 24 hr period in general and the daytime exposed period in particular) raise the question of whether the noise level was too low to elicit physiological effects. In the literature, sleep was perturbed by (for example) 12 h of acute exposure to 85 dB noise during the sleep period (Parrish and Teske, 2017) and by chronic exposure to 85 dB noise (8 h per day during the light period, for a total of 9 days) (Mavanji et al., 2013). In humans, 8 nights of exposure to 76 dB(A) noise were

associated with marked sleep perturbations (Ehrenstein and Muller-Limroth, 1980). Hence, these literature data suggest that the noise intensity applied in the present study was not inadequate.

Differences in the models and in the experimental protocols make it difficult to compare the effects observed here with those in the literature. As mentioned by Dijk et al. (Dijk et al., 2000), differences might be particularly due to the animals' age (with younger animals used in our study) because sleep is known to be age-dependent. Vallet et al. reported that chronic noise exposure was associated with a relative reduction in NREM sleep in people (<45 years old) and a relative reduction in REM sleep in older people (>45 years old) (Vallet et al., 1983). However, the observation of relevant effects during the dark period and during the daytime plethysmography session might suggest an impact of sleep habituation and/or sleep pressure.

Firstly, with regard to habituation, studies of noise exposure in young adults have highlighted differences between acute and chronic conditions, with a lower amount of NREM sleep after one day of exposure and then a lower amount of REM sleep after two days of exposure (Ehrenstein and Muller-Limroth, 1980). To the best of our knowledge, habituation effects have not previously been studied in animals. In the present study, the fact that five weeks of chronic exposure were associated with small effects on sleep may have resulted from habituation, i.e. with a fall in the magnitude of the effects of noise over time. However, the greater effects on sleep observed in the noise-free dark period and the noise-free daytime plethysmography session are not consistent with this hypothesis.

Secondly, one can hypothesize that sleep pressure masks the harmful effects of noise during the exposed period. Hence, we looked at whether after-effects of noise and a sleep "rebound" could be seen among the data collected during the noise-free dark period. Even though the TST during the experiment as a whole did not differ significantly in the exposed and control groups, exposed animals slept more when the noise exposure was briefly interrupted during the 1 hr plethysmographic recording. In the exposed group, the TST was 10.7 min greater, and the NREM/REM sleep ratio was lower. One can therefore hypothesize that even though the sleep quality was inadequate in animals exposed to noise (as evidenced by slight modifications in sleep structure), sleep pressure can overcome harmful effects of noise during the daytime period (i.e. with a slight sleep rebound during the following night).

The hypnic effects observed here might be due to noise-induced stress. The lack of significant nighttime after-effects on TST is in contradiction with the results of studies performed in adult humans (Blois et al., 1980; Fruhstorfer et al., 1988). This apparent discrepancy between the lack of significant nighttime after-effects on TST and the greater TST during the daytime plethysmography session in the exposed group might be due to the difference in the time interval between sleep onset and the end of the noise exposure (30 min for the plethysmography session but 60 min for the 24 hr recording). Averaging TST over the 12 hr night period might mask effects occurring in the first few hours of the following dark period (Bach et al., 1991). Regardless of whether sleep pressure and/or stress had effects, it is important to bear in mind the fact that noise exposure was not associated with a difference in the TST or the daytime vs nighttime sleep distribution.

In the present study, the animals in the exposed group gained more body weight (by 6%, on average than control animals did. This gain was accompanied by greater food and water intakes. In previous studies of adult rats exposure to chronic noise (85 dB for 12 h a day, over 9 days), weight gain was associated with greater food intake in some studies but not in others (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017). Another study of chronic (30-day), single-tone (2640 Hz) noise exposure (dB not indicated) reported low food intake and body weight in the rats (Alario et al., 1987). Our data on metabolic parameters might reflect both a direct effect of noise exposure and also an indirect effect through sleep perturbation. Indeed, body weight gain is also observed when sleep duration is restricted in animals (Wang et al., 2014), healthy adult humans (Calvin et al., 2013; Spaeth et al., 2013), children in the general population (von Kries et al., 2002; Spiegel et al., 2004b), and children with metabolic disorders (Vgontzas et al., 2008).

The mRNA expression level of CART was significantly greater in the exposed group, while the expression level of leptin receptors was lower. There were no significance intergroup differences in expression for NPY and POMC. The reduction in leptin receptor mRNA levels might explain (at least in part) the hyperphagia observed in noise-exposed animals, even though the mRNA expression level of NPY did not differ significantly. The greater body weight gain, food and water intakes, and the differences in leptin receptor and CART gene expressions observed in the present study might indicate a risk of metabolic disease (such as diabetes

or obesity), as has already been observed in epidemiologic studies of people exposed to noise (Sørensen et al., 2013).

The only intergroup differences in absolute and relative organ weights were observed for the adrenal glands and the thymus, with higher weights in the exposed group. It would have been interesting to measure blood corticosterone levels, since organ hypertrophy can result from the high levels of adrenocorticotrophic hormone induced by primary hypothalamic disease or glucocorticoid feedback dysregulation (Harvey and Sutcliffe, 2010). Indeed, Gamallo et al. demonstrated that noise exposure increased the secretion of corticosterone in the absence of adrenal gland hypertrophy (Gamallo et al., 1988). Functional adrenal gland disorders in rats have previously been linked to changes in body weight gain (Alario et al., 1987).

The greater mean thymus weight recorded in the noise-exposed group of rats might indicate an effect of stress (as observed with “thymus rebound” and thymic hypertrophy or atrophy in adult humans (Nishino et al., 2006)) and/or an immune effect. Thymus hyperplasia has already been correlated with chronic exposure to noise in female adult rats (Zymantiene et al., 2017). Unfortunately, we only measured the weight of the thymus at 9 weeks of age, when the organs involved in the immune system had still not matured.

## **Conclusion**

In accordance with our starting hypothesis, chronic high-level noise exposure was associated with sleep perturbations, hyperphagia, and weight gain. The recorded sleep modifications were more marked during noise-free periods (a greater amount of REM sleep during the nighttime and especially during the 1-hour daytime plethysmography recording, and a greater TST and a lower NREM/REM sleep ratio during the nighttime) than during the daytime exposure, suggesting the presence of after-effects. The noise-exposed animals ate and drank more, and also displayed higher mRNA expression levels of leptin receptors and CART. These homeostasis-related parameters are known to be stress markers, and so might indicate a greater risk of metabolic and immune disorders in the noise-exposed juvenile rats studied here.

## Bibliography

- Alario P, Gamallo A, Beato MJ, Tranco G. 1987. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav* 40: 29–32.
- Axelsson A, Lindgren F. 1985. Is there a relationship between hypercholesterolaemia and noise-induced hearing loss? *Acta Otolaryngol* 100: 379–386.
- Bach V, Libert JP, Tassi P, Wittersheim G, Johnson LC, Ehrhart J. 1991. Cardiovascular responses and electroencephalogram disturbances to intermittent noises: effects of nocturnal heat and daytime exposure. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 63:330–337; doi:10.1007/BF00364458.
- Basner M. 2008. Nocturnal aircraft noise exposure increases objectively assessed daytime sleepiness. *Somnologie* 12:110–117; doi:10.1007/s11818-008-0338-8.
- Basner M, Samel A, Isermann U. 2006. Aircraft noise effects on sleep: application of the results of a large polysomnographic field study. *J Acoust Soc Am* 119: 2772–2784.
- Blois R, Debilly G, Mouret J. 1980. Daytime noise and its subsequent sleep effects.
- Calvin AD, Carter RE, Adachi T, G. Macedo P, Albuquerque FN, van der Walt C, et al. 2013. Effects of Experimental Sleep Restriction on Caloric Intake and Activity Energy Expenditure. *Chest* 144:79–86; doi:10.1378/chest.12-2829.
- Cantrell RW. 1974. Prolonged exposure to intermittent noise: audiometric, biochemical, motor, psychological and sleep effects. *Laryngoscope* 84: 1–55.
- Cappaert NL, Klis SF, Muijser H, Kulig BM, Smoorenburg GF. 2000. Noise-induced hearing loss in rats. *Noise and Health* 3: 23.
- Dijk DJ, Duffy JF, Czeisler CA. 2000. Contribution of circadian physiology and sleep homeostasis to age-related changes in human sleep. *Chronobiol Int* 17: 285–311.
- Ehrenstein W, Muller-Limroth W. 1980. Laboratory investigations into effects of noise on human sleep. *American Speech and Hearing Association* 433–441.
- Eze IC, Imboden M, Foraster M, Schaffner E, Kumar A, Vienneau D, et al. 2017. Exposure to Night-Time Traffic Noise, Melatonin-Regulating Gene Variants and Change in Glycemia in Adults. *Int J Environ Res Public Health* 14; doi:10.3390/ijerph14121492.
- Frei P, Mohler E, Rössli M. 2014. Effect of nocturnal road traffic noise exposure and annoyance on objective and subjective sleep quality. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217:188–195; doi:10.1016/j.ijheh.2013.04.003.
- Fruhstorfer B, Pritsch MG, Fruhstorfer H. 1988. Effects of daytime noise load on the sleep-wake cycle and endocrine patterns in man: I. 24 hours neurophysiological data. *Int J Neurosci* 39: 197–209.
- Gamallo A, Alario P, Villanúa MA, Nava MP. 1988. Effect of chronic stress in the blood pressure in the rat: ACTH administration. *Horm Metab Res* 20:336–338; doi:10.1055/s-2007-1010830.
- Harvey PW, Sutcliffe C. 2010. Adrenocortical hypertrophy: establishing cause and toxicological significance. *J Appl Toxicol* 30:617–626; doi:10.1002/jat.1569.
- Heffner HE, Heffner RS, Contos C, Ott T. 1994. Audiogram of the hooded Norway rat. *Hearing Research* 73:244–247; doi:10.1016/0378-5955(94)90240-2.
- Hobson JA. 1989. Sleep. *Scientific American Library*.
- Mavanji V, Teske JA, Billington CJ, Kotz CM. 2013. Partial sleep deprivation by environmental noise increases food intake and body weight in obesity-resistant rats. *Obesity (Silver Spring, Md)* 21:1396–1405; doi:10.1002/oby.20182.

- McCarthy DO, Ouimet ME, Daun JM. 1992. The effects of noise stress on leukocyte function in rats. *Res Nurs Health* 15: 131–137.
- Michel C, Levin BE, Dunn-Meynell AA. 2003. Stress facilitates body weight gain in genetically predisposed rats on medium-fat diet. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285:R791–R799; doi:10.1152/ajpregu.00072.2003.
- Moraes DA, Venancio DP, Suchecki D. 2014. Sleep deprivation alters energy homeostasis through non-compensatory alterations in hypothalamic insulin receptors in Wistar rats. *Horm Behav* 66:705–712; doi:10.1016/j.yhbeh.2014.08.015.
- Muzet AG, Naitoh P, Johnson LC, Townsend RE. 1974. Body Movements in Sleep During 30-Day Exposure to Tone Pulse. *Psychophysiology* 11:27–34; doi:10.1111/j.1469-8986.1974.tb00818.x.
- Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boiselle PM, Hatabu H. 2006. The Thymus: A Comprehensive Review. *RadioGraphics* 26:335–348; doi:10.1148/rg.262045213.
- OECD. 2001. OECD Environmental Outlook. OECD Publishing.
- Parrish JB, Teske JA. 2017. Acute partial sleep deprivation due to environmental noise increases weight gain by reducing energy expenditure in rodents: Acute Partial Sleep Deprivation Reduces Energy Expenditure. *Obesity* 25:141–146; doi:10.1002/oby.21703.
- Pelletier A, Delanaud S, Décima P, Thuroczy G, de Seze R, Cerri M, et al. 2013. Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy balance in developing rats. *Environmental Science and Pollution Research* 20:2735–2746; doi:10.1007/s11356-012-1266-5.
- Porkka-Heiskanen T. 2013. Sleep homeostasis. *Current Opinion in Neurobiology* 23:799–805; doi:10.1016/j.conb.2013.02.010.
- Pyko A, Eriksson C, Oftedal B, Hilding A, Östenson C-G, Krog NH, et al. 2015. Exposure to traffic noise and markers of obesity. *Occup Environ Med* 72:594–601; doi:10.1136/oemed-2014-102516.
- Rabat A. 2007. Extra-auditory effects of noise in laboratory animals: The relationship between noise and sleep.
- Rabat A, Bouyer JJ, Aran JM, Courtiere A, Mayo W, Le Moal M. 2004. Deleterious effects of an environmental noise on sleep and contribution of its physical components in a rat model. *Brain Res* 1009:88–97; doi:10.1016/j.brainres.2004.02.046.
- Rabat A, Bouyer JJ, Aran JM, Le Moal M, Mayo W. 2005. Chronic exposure to an environmental noise permanently disturbs sleep in rats: Inter-individual vulnerability. *Brain Research* 1059:72–82; doi:10.1016/j.brainres.2005.08.015.
- Sørensen M, Andersen ZJ, Nordsborg RB, Becker T, Tjønneland A, Overvad K, et al. 2013. Long-term exposure to road traffic noise and incident diabetes: a cohort study. *Environ Health Perspect* 121:217–222; doi:10.1289/ehp.1205503.
- Spaeth AM, Dinges DF, Goel N. 2013. Effects of Experimental Sleep Restriction on Weight Gain, Caloric Intake, and Meal Timing in Healthy Adults. *Sleep* 36:981–990; doi:10.5665/sleep.2792.
- Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. 2004. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med* 141: 846–850.
- Stansfeld S, Clark C. 2015. Health Effects of Noise Exposure in Children. *Curr Envir Health Rpt* 2:171–178; doi:10.1007/s40572-015-0044-1.

- Vallet M, Gagneux J-M, Blanchet V, Favre B, Labiale G. 1983. Long term sleep disturbance due to traffic noise. *Journal of Sound and Vibration* 90: 173–191.
- Van Campen LE, Murphy WJ, Franks JR, Mathias PI, Toraason MA. 2002. Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. *Hear Res* 164: 29–38.
- Vgontzas AN, Bixler EO, Chrousos GP, Pejovic S. 2008. Obesity and sleep disturbances: meaningful sub-typing of obesity. *Arch Physiol Biochem* 114:224–236; doi:10.1080/13813450802521507.
- von Kries R, Toschke AM, Wurmser H, Sauerwald T, Koletzko B. 2002. Reduced risk for overweight and obesity in 5- and 6-y-old children by duration of sleep--a cross-sectional study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:710–716; doi:10.1038/sj.ijo.0801980.
- Wang Y, Carreras A, Lee S, Hakim F, Zhang SX, Nair D, et al. 2014. Chronic Sleep Fragmentation Promotes Obesity in Young Adult Mice. *Obesity (Silver Spring)* 22:758–762; doi:10.1002/oby.20616.
- Weyde KV, Krog NH, Oftedal B, Evandt J, Magnus P, Øverland S, et al. 2017. Nocturnal Road Traffic Noise Exposure and Children's Sleep Duration and Sleep Problems. *Int J Environ Res Public Health* 14; doi:10.3390/ijerph14050491.
- Zheng K-C, Ariizumi M. 2007. Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *J Occup Health* 49: 32–38.
- Zymantiene J, Zelvyte R, Pampariene I, Aniuliene A, Juodziukyniene N, Kantautaitė J, et al. 2017. Effects of long-term construction noise on health of adult female Wistar rats. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 20; doi:10.1515/pjvs-2017-0020.

## Tables

Table 1: Primer sequences used for RT-PCRs

Rat GAPDH	F:5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	R:5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'
$\beta$ -actin	F:5'-AGATCAAGATCATTGCTCCTCT-3'	R:5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'
POMC	F:5'-GACCAAACGGGAGGCGACGG-3'	R:5'-GGCTCTGTCGCGAAAGGCA-3'
CART	F:5'-GGACATCTACTCTGCCGTGG-3'	R:5'-GCGTCACACATGGGGACTT-3'
NPY	F:5'-CCGCCC GCCATGATGCTAGG-3'	R:5'-GGCCATGTCCTCTGCTGGCG-3'
leptin receptor	F:5'-CCAGTACCCAGAGCCAAAGT-3'	R:5'-GGGCTTACAACAAGCATGG-3'

Table 2: Absolute weight and relative weight of the thymus and the adrenal glands in the control group (n=12) and in the exposed group (n=12) at D41

Organ	Control group		Exposed group <sup>a</sup>	
	Weight (g)	Relative weight (%)	Weight (g)	Relative weight (%)
Thymus	0.78 ± 0.11	0.26 ± 0.05	0.98 ± 0.22*	0.30 ± 0.05*
Adrenal glands	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.13 ± 0.10*	0.04 ± 0.03*

Note: Values expressed in Mean ± SD

<sup>a</sup>: \* p<0.05

Table 3: Food and water intakes in the control group (n=12) and the noise-exposed group (n=12) per 24 h, during the light period and dark period

Parameter	Control group			Exposed group			Group comparison <sup>c</sup>		
	24 h	Light (rest) <sup>a</sup>	Dark (activity) <sup>b</sup>	24 h	Light (rest)	Dark (activity)	24 hr	Dark	Light
Food intake - Number of meals	12.2 ±2.2	2.4 ±1.7	9.4 ±1.7	13.4 ±2.6	3.0 ±1.5	10.2 ±2.4	**	*	*
Food intake - Total quantity (g)	18.5 ±2.4	2.5 ±1.5	16.5 ±2.3	21.2 ±3.0	3.2 ±1.3	18.1 ±2.6	***	***	***
Food intake - Meal quantity (g)	1.6 ±0.3	0.9 ±0.4	1.8 ±0.4	1.7 ±0.4	1.0 ±0.4	1.9 ±0.5	NS	trend	*
Food intake - Mean episode duration (s)	11.1 ±3.8	5.0 ±3.8	13.0 ±4.7	13.7 ±5.4	7.1 ±4.8	16.2 ±6.9	**	**	**
Water intake - Total quantity (mL)	28.9 ±6.7	NA	NA	36.2 ±24.7	NA	N/A	***	NA	NA

Note: Values expressed in Mean ± SD

<sup>a</sup>: resting period with noise exposure

<sup>b</sup>: active period no noise exposure

<sup>c</sup>: NA: not applicable; NS: non-significant, \* p<0.05; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001. trend: 0.1<p<0.05

Table 4: Sleep parameters in the control group (n=12) and the exposed group (n=10) during the light period and the dark period

Parameters	Control		Noise exposure		Effects <sup>c, d, e</sup>		
	Light (rest) <sup>a</sup>	Dark (activity) <sup>b</sup>	Light (rest)	Dark (activity)	Effect of period	Effect of group	Period x group interaction
AW - Total duration (min)	152.3 ±25.4	394.9 ±32.5	138.8 ±28.3	419.1 ±47.0	***	NS	NS
AW - Frequency (episodes/h)	1.3 ±0.5	1.5 ±0.4	1.0 ±0.4	1.6 ±0.9	**	NS	NS
AW - Mean episode duration (min)	10.9 ±3.7	23.9 ±7.1	12.2 ±3.6	27.5 ±13.2	***	NS	NS
QW - Total duration (min)	98.4 ±29.3	40.3 ±10.3	95.4 ±20.1	33.5 ±11.7	***	NS	NS
QW - Frequency (episodes/h)	21.0 ±3.3	9.7 ±1.6	18.9 ±2.6	7.3 ±2.1	***	**	NS
QW - Mean episode duration (min)	0.4 ±0.1	0.3 ±0.1	0.4 ±0.1	0.4 ±0.1	trend 0.059	NS	NS
TST - total duration (min)	469.3 ±36.0	284.8 ±29.9	485.8 ±36.2	267.4 ±36.4	***	NS	NS
NREM sleep - Total duration (min)	417.4 ±29.3	225.3 ±26.0	438.5 ±33.5	202.7 ±27.5 (#)	***	NS	*
NREM sleep- Frequency (episodes/h)	22.3 ±3.2	11.2 ±1.7	19.9 ±2.8	8.7 ±2.2 (#)	***	**	NS
NREM sleep - Mean episode duration (min)	1.6 ±0.3	1.7 ±0.2	1.9 ±0.3	2.0 ±0.5	NS	**	NS
NREM sleep- NREM	89.0 ±2.7	79.0 ±2.3	90.3 ±2.9	75.9 ±3.7 #	***	NS	*

(% of TST)							
REM sleep - Total duration (min)	51.9 ±14.6	59.5 ±8.3	47.3 ±15.1	64.7 ±14.1	**	NS	NS
REM sleep - Frequency (episodes/h)	4.6 ±1.3	3.9 ±0.7	4.2 ±1.5	3.8 ±0.8	NS	NS	NS
REM sleep - Mean episode duration (min)	1.0 ±0.2	1.3 ±0.3	1.0 ±0.3	1.4 ±0.3	***	NS	NS
REM sleep - REM (% of TST)	11.0 ±2.7	21.0 ±2.3	9.7 ±2.9	24.1 ±3.7 #	***	NS	*

Notes: Values expressed in Mean ± SD

<sup>a</sup>: Resting period, with noise exposure

<sup>b</sup>: Activity period, no noise exposure

<sup>c</sup> : NS: non-significant; trend: 0.1>p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001

<sup>d</sup>: # p<0.05 when comparing the two groups for the dark period and the light period

<sup>e</sup>: (#) 0.1<p<0.05 when comparing the two groups for the dark period, only.

Table 5: Sleep parameters in the control group (n=12) and the noise-exposed group (n=10) measured during a one-hour, noise-free plethysmography session on D40

Parameters	Control group	Exposed group	Group comparison <sup>a</sup>
AW - Total duration (min)	18.9±16.3	9.8±8.5	*
AW - Frequency (ep/h)	2.39±1.62	1.37±0.75	trend
AW - Mean episode duration (min)	9.6±12.6	5.7±6.1	NS
QW - Total duration (min per hr)	5.3±3.3	7.0±3.3	NS
QW - Frequency (ep/h)	13.05±6.92	14.93±6.83	NS
QW - Mean episode duration of the (min)	0.4±0.2	0.5±0.2	NS
TST - Total duration (min)	32.5±13.9	43.2±7.1	*
NREM sleep - Total duration (min)	31.5±13.1	40.4±7.0	trend
NREM sleep - Frequency (ep/h)	15.44±7.39	15.95±6.90	NS
NREM sleep - Mean episode duration (min)	2.0±0.9	3.0±1.3	trend
NREM sleep - Percentage of TST	97.42±3.48	93.57±5.63	trend
REM sleep - Total duration (min)	1.0±1.5	2.8±2.3	*
REM sleep - Frequency (ep/h)	1.19±1.74	3.76±2.63	*
REM sleep - Mean episode duration (min)	0.7±0.6	0.7±0.4	NS
REM sleep - Percentage of TST	2.58±3.48	6.43±5.63	ind

Notes: Values expressed in Mean ± SD

<sup>a</sup> : NS: non-significant; trend: 0.1>p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001

Table 6: mRNA expression in noise-exposed group (n=12), expressed as  $2^{-\delta\delta Ct}$  (fold-induction over the expression level in the control group (n=11), set to a value of 1)

Gene	Control group	Exposed group	Group comparison <sup>a</sup>
Leptin receptor	1	0.629 ± 0.160	* p=0.030
CART	1	1.331 ± 0.140	* p=0.037
POMC	1	1.426 ± 0.310	NS
NPY	1	1.2770 ± 0.220	NS

Notes: Values expressed in Mean ± SEM

<sup>a</sup> : NS: non-significant; \* p<0.05

Etude 2 : Impacts d'une co-exposition entre les champs électromagnétiques de type radio fréquence et une contrainte sonore de haute intensité sur le sommeil, la prise alimentaire, le poids et la respiration de rats juvéniles

### ***Introduction***

Avec le développement des nouvelles technologies, les sources de champs électromagnétiques de types radiofréquence se sont multipliées dans les paysages urbain et rural. En effet, pour permettre à la téléphonie mobile de fonctionner, le territoire est parsemé d'antenne relais. Les riverains des antennes relais, rapportent des symptômes similaires à ceux décrits par les personnes souffrant d'électrohypersensibilité qui attribuent leurs symptômes aux CEM (Santini et al., 2002). Les études menées en laboratoire ne permettant pas actuellement de conclure en faveur d'effets physiologiques, à cause de résultats contradictoires. Selon notre hypothèse, les effets des CEM qui peuvent ne pas être visibles ou statistiquement significatifs lors d'une exposition simple aux CEM pourraient être exacerbés lors d'une co-exposition avec une seconde contrainte environnementale.

Habituellement, les études menées sur les effets des champs électromagnétiques s'intéressent à des expositions aiguës. De plus, peu d'études ont été menées sur une population juvénile bien que cette population soit considérée comme vulnérable et potentiellement plus exposée, comme indiquée par des travaux de modélisation.

Ainsi l'objectif de ce travail était d'évaluer les effets d'une exposition aux CEM, seule ou en co-exposition avec une autre contrainte environnementale le bruit et de voir si une exacerbation des effets des CEM était visible sur les paramètres hypniques, respiratoires, ainsi que le poids et la prise alimentaire.

### ***Matériel et méthodes***

48 rats males Wistar ont été répartis en quatre groupes de 12 animaux, un groupe contrôle, un groupe exposé aux CEM seuls, un groupe exposé au bruit seul et un groupe exposé aux deux contraintes.

L'exposition au bruit avait les mêmes caractéristiques que l'étude précédente : 87,5 dB pendant 11 heures par jour lors de la période diurne. L'exposition aux CEM s'est également déroulée pendant les cinq semaines du protocole. Elle avait lieu 23 heures par jour, car une heure était nécessaire pour les soins quotidiens des animaux (de 17h00 à 18h00). La fréquence d'émission était de 900 MHz et l'intensité de 1,8 V/m.

A l'instar de l'étude précédente, au début de la 4<sup>ème</sup> semaine d'exposition, les animaux ont été opérés afin de placer l'implant télémétrique permettant l'enregistrement des données polysomnographiques. Le poids, la prise alimentaire et la prise hydrique ont été également enregistrés pendant 6 jours lors de la 5<sup>ème</sup> semaine d'exposition de manière concomitante avec les données polysomnographiques. A la fin de la 5<sup>ème</sup> semaine, un test plethysmographique a été réalisé sur les animaux, afin d'évaluer les paramètres respiratoires pendant une heure de la période diurne. Un enregistrement du sommeil a été effectué en parallèle. Pour cela les explorations ont été réalisées en dehors des chambres climatiques et donc sans aucune contrainte environnementale.

### ***Résultats***

Tous les animaux exposés présentaient un gain de poids significativement plus important que chez les contrôles, le groupe exposé aux CEM étant de plus significativement plus lourd que le groupe exposé au bruit. Concernant la prise alimentaire et la prise hydrique, leur pattern était modifié et variable selon le type d'exposition. Aucune différence significative n'avait été observée sur la prise hydrique. Les animaux exposés au bruit augmentaient leur prise alimentaire et leur prise hydrique. Lors d'une exposition aux CEM, nous observions une diminution de la quantité totale de nourriture ingérée en raison d'une diminution du nombre de repas ainsi que leur durée moyenne et ceci malgré une augmentation de la quantité moyenne de nourriture ingérée par repas. De plus, les animaux exposés aux CEM buvaient plus que les animaux contrôles. Les animaux ayant été soumis à la co-exposition des deux contraintes présentaient une augmentation de la quantité totale, une augmentation de la durée moyenne des repas ainsi que de la quantité moyenne de nourriture ingéré par repas mais une diminution du nombre de repas.

A propos des paramètres hypniques, une exposition aux CEM entraînait une fréquence d'éveil supérieure à celle des animaux non-exposés qui, couplée avec une durée moyenne de l'épisode plus courte, conduisaient à une absence de variation de la durée totale de ce stade. L'exposition aux CEM induisait également une durée moyenne du NREM supérieure à celle des animaux non-exposés aux CEM. Ces effets étaient observés quelque soit la période de la journée. Les animaux exposés au bruit avaient une durée moyenne de NREM supérieure comparés aux contrôles quelque soit la période de la journée. Une diminution de la durée moyenne des épisodes de QW et de NREM était également observée mais uniquement

pendant la période nocturne. Cette variation dans la durée du NREM entraînait une modification du ratio NREM/REM en faveur du REM. Aucun effet spécifique à la co-exposition n'avait été observé sur le sommeil.

Lors de l'enregistrement du sommeil pendant la pléthysmographie, aucun effet de l'exposition aux CEM n'avait été observé. Nous retrouvions, chez les animaux exposés au bruit comparés aux contrôles, une durée totale d'éveil inférieure. Une durée totale de sommeil supérieure ainsi qu'une modification du ratio NREM/REM en faveur du REM étaient également observés. La co-exposition entraînait spécifiquement une fréquence du REM supérieure par rapport aux animaux contrôles.

Concernant les paramètres respiratoires, aucune variation n'avait été observée sur la fréquence et la durée moyenne des apnées quelque soit le type d'exposition. En revanche, la fréquence respiratoire était plus faible, quelque soit le stade de sommeil, chez les animaux exposés au bruit, mais n'était pas modifiée lors d'une exposition aux CEM. Les animaux exposés au bruit avaient également un temps respiratoire total significativement plus long en raison d'une augmentation du temps expiratoire. Chez les animaux contrôles, le temps inspiratoire était plus long lors de la phase REM par rapport à la phase NREM. En revanche, chez les animaux exposés au bruit, le temps inspiratoire était significativement augmenté en NREM. Le temps inspiratoire était également augmenté chez les animaux exposés aux CEM en REM. Aucun effet spécifique de la co-exposition n'a été observé.

### ***Discussion***

Notre étude a montré que quelque soit le type d'exposition, les animaux avaient un gain de poids corporel plus important que les animaux contrôles. Ces augmentations sont cohérentes avec la littérature, aussi bien pour les expositions au bruit (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017) qu'aux CEM (Sommer et al., 2004).

Une exposition au bruit induisait une hyperphagie, élément cohérent avec la littérature (Mavanji et al., 2013). Inversement, dans notre protocole, une exposition aux CEM induisait paradoxalement une hypophagie, résultats non cohérent avec un précédent protocole de notre laboratoire, montrant une élévation de la prise alimentaire journalière si les animaux étaient co-exposés au CEM et à une température de 31 ° C ou pas d'effet si la température était de 24°C (Pelletier et al., 2013). Dans notre protocole, la co-exposition des deux

contraintes n'induisait pas de variation de la quantité de nourriture ingérée par rapport aux animaux contrôles. Toutefois le pattern alimentaire était différent d'une exposition simple aux CEM ou au bruit. A l'inverse de l'hypothèse formulée, la co-exposition induisait une combinaison des deux effets simples et non une exacerbation de l'effet des CEM.

Concernant les paramètres hypniques, une exposition au bruit entraînait des effets spécifiques durant la période nocturne (non exposée au bruit). Ainsi la durée totale de QW était plus faible (-6,4 min) ainsi que le rapport NREM/REM (-3,2%) entraînant une prédominance du sommeil REM sans toutefois impacter la durée totale de sommeil. La durée moyenne d'un épisode de NREM était plus élevée dans le groupe exposé au bruit. Nos résultats ne sont pas cohérents avec la littérature dans laquelle une exposition à intensité sonore plus faible, présentaient une diminution du temps total de sommeil (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017). Cependant, ces études avaient un protocole d'exposition plus court. L'enregistrement des paramètres hypniques pendant le test pléthysmographique sans exposition au bruit montrait un temps de sommeil total plus élevé, signe d'un effet rebond sur le sommeil et donc d'une absence d'accoutumance à cette contrainte.

Les animaux exposés aux CEM avaient une légère fragmentation de l'éveil sans que la durée totale de ce stadene soit modifiée. Les animaux exposés aux CEM avaient également une durée moyenne des épisodes de NREM plus longue, résultat non cohérent avec la littérature. En effet, une exposition aux CEM sur des hommes adultes induisait une diminution significative du sommeil paradoxal (Mann and Röschke, 1996; Wagner et al., 1998). Cependant, ces deux études ont été menées sur une exposition aiguë (8h). Une exposition chronique effectuée dans notre laboratoire pendant 5 semaines a montré une fragmentation du sommeil (Pelletier et al., 2013).

La co-exposition des deux contraintes environnementales n'induisait pas d'effet spécifique sur le sommeil par rapport aux contrôles. De manière surprenante, durant la période pléthysmographique et donc sans exposition, les paramètres du sommeil ne présentaient aucune variation par rapport aux animaux contrôles. Différentes hypothèses découlent de ces derniers résultats. Le premier est un effet protecteur des CEM par rapport à l'exposition au bruit ce qui expliquerait l'absence d'effets chez les animaux co-exposés par rapport aux animaux contrôles. Cette absence de perturbation du sommeil pourrait être la conséquence d'un rythme circadien trop fort pour être modifié par la pression du sommeil. Cela peut être

également dû à une distribution temporelle du sommeil le long de la période de repos en période nocturne.

Concernant les paramètres respiratoires, les effets observés sont des effets indirects en raison de l'absence d'exposition pendant l'enregistrement. Une exposition chronique au bruit induisait une fréquence respiratoire inférieure, quelque soit l'état de sommeil. La littérature a déjà fait le lien entre une exposition au bruit et une modification de la fréquence respiratoire, en s'intéressant toutefois à des effets directs de bruit transitoires, tandis que notre étude se porte sur des effets indirects. Notre étude a également montré une augmentation du temps expiratoire, total et une augmentation du temps inspiratoire spécifiquement en phase NREM chez les animaux exposés au bruit. A notre connaissances les effets indirects du bruit sur les paramètres respiratoires n'ont jamais été évalués. Les animaux exposés aux CEM, avec ou sans bruit, avaient également un temps inspiratoire inférieur en REM. Dans la littérature, une exposition aux CEM n'avait pas modifié significativement la fréquence respiratoire lors d'une exposition aiguë (30 min à 1950 MHz et 900 MHz) (Kwon et al., 2012; Wilén et al., 2006).

En ce qui concerne les apnées, nous n'avons observé aucune variation de la fréquence ni de la durée moyenne des apnées, quel que soit le type d'exposition. À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir analysé les apnées et les paramètres respiratoires après une exposition chronique de 5 semaines aux CEM, au bruit et aux deux contraintes environnementales. Cependant, les apnées observées étaient courtes et n'étaient pas de nature pathologique.

Article : Effects of a co-exposure between 900 MHz RF-EMF and high-level noise on juvenile rat sleep, weight, food intake and respiratory parameters

**Authors:**

BOSQUILLON de JENLIS Aymar<sup>1</sup>, DEL VECCHIO Flavia<sup>1</sup>, DELANAUD Stéphane<sup>1</sup>, BACH Véronique<sup>1\*</sup>, PELLETIER Amandine<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>PériTox, Périnatalité & Risques Toxiques, UMR-I 01 INERIS, Picardie Jules Verne University, Amiens, France

\* authors worked equivalently on this work

**Keywords:** RF-EMF, Noise, chronic exposure, juvenile rat, sleep, food intake, body weight, respiratory

## Abstract

**Objective:** Technology improvements is concomitant with radiofrequencies electromagnetic fields (RF-EMF) exposure expansion. Among the sources of electromagnetic field, phone-base stations generate a continuous 900 MHz electromagnetic fog in which population live. In parallel, a subdivision of the population so called the electrohypersensitive people, attributes (physiological or pathological) symptoms to this exposure. In the generally described symptoms, sleep disturbance is one of the most currently cited. However, laboratory experiments presented controversial results regarding sleep alteration when exposed to RF-EMF. Our hypothesis is that a simple exposure to RF-EMF would only lead to slight or to insignificant effects and the apparition of these effects is the consequence of a multi-environmental constraints. In this study we chose the noise as the other everyday constraint.

**Methods:** Forty-eight three-weeks old male Wistar rats were exposed to RF-EMF (900 MHz, 1.8 V/m) and/or to noise (87.5 dB, 50-20000 Hz during the light-rest period) during 5 weeks. At the 5<sup>th</sup> week of exposure, sleep (24 hr long), food and water intakes and body weight were recorded. At the 6<sup>th</sup> week of exposure, sleep (1 hr) and respiratory parameters were scored during the daytime period without any exposure.

**Results:** Chronic RF-EMF and/or noise exposure induced body weight gain, hyperphagia in noise-group and hypophagia in FR-EMF-group. Sleep parameters (24 hr recording) presented an increase of AW frequency in RF-EMF-exposed animals and a decrease of NREM/REM balance of dark period in Noise-exposed animal, without any modification of sleep duration whatever the type of exposure. During the one-hour constraint-free sleep recording, sleep rebound due to noise was shown, while RF-EMF and co-exposed groups presented no sleep alteration. Apneas parameters (duration or frequency) were not affected but respiratory times were lower in noise-exposed group. RF-EMF-exposed animals presented only higher inspiratory time.

**Conclusion:** Our results show global effects of RF-EMF on body weight gain, food intake and respiratory parameters, whether the animals are exposed to noise or not. In the meanwhile, the co-exposed animals did not present effects at all. The co-exposure between

the two environmental constraints did not confirm to the hypothesis of an exacerbation of the effects of RF-EMF.

## Introduction

For the last decades, the raise and the democratization of new technologies has resulted in the augmentation of the electromagnetic fog to which the population is exposed. These technological advances have led to an increase in exposure of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF: artificial waves whose frequencies are between 10 MHz and 300 GHz RF-EMF). In parallel, various symptoms (headaches, fatigue, concentration difficulties, skin manifestations and tintinus) have been described in people suffering from electrohypersensitivity (EHS) (Johansson et al., 2010b; Knave et al., 1992) as well as in phone-base station neighborhood (Santini et al., 2002). Among these symptoms, sleep disorders are regularly mentioned. To understand the potential impacts of RF-EMF on sleep, different laboratories studies on humans were performed but led to controversial results because either did not find evidences of sleep perturbation (Mohler et al., 2012) or observed sleep disturbances and a decrease of sleep quality in exposed persons (Berg-Beckhoff et al., 2009). Controversy also exists in experimental studies: intermittent laboratory exposure on adults (900 MHz for 8h, 15 on/off cycle) induced a significant decrease in REM sleep with no modification of the other sleep states. In rodents, a chronic RF-EMF exposure (5 weeks at 900 MHz 1.0 V/m) performed in our lab, induced a fragmentation of REM (Pelletier et al., 2013) while an acute one exposure (24 hr) did not alter sleep at 1.8 and 2.45 GHz (Crouzier et al., 2007a).

Interestingly, some studies were performed on co-exposure between RF-EMF and another physical (Pelletier et al., 2013) or chemical (Ocelli et al., 2018) constraint. These studies presented an appearance or an aggravation of RF-EMF effects compared to the mono-exposed groups. Given this observation and the existing controversy about the sleep effects of electromagnetic fields, our hypothesis is that an exposure to electromagnetic fields alone (at usual level encountered in everyday life), leads to low or no statistically apparent effects. We suggest that in contrast, a synergistic effect between RF-EMF and a second environmental constraint could allow to highlight the physiological symptoms.

Among the different constraints, noise is an important one. Indeed, noise exposure can be undergoing in work place and/or in leisure place as RF-EMF exposition. Noise is also an environmental constraint which has already been described to disturb various parameters including sleep. A noise exposure, induces sleep disturbance such as REM sleep diminution

(Blois et al., 1980; Fruhstorfer et al., 1988), metabolism (Axelsson and Lindgren, 1985; Pyko et al., 2015) and respiratory alteration (Haas et al., 1986).

In this protocol, we will study the impact of the co-exposition between RF-EMF and high level noise. Another originality of this study is the chronical aspect of the exposure. Although exposure in everyday life is continuous, most laboratory studies were done with acute exposure. Moreover, most of the studies were performed in adults despite the fact that, juvenile period is considered as a vulnerable period, because of the physiological and neurological functions development but also because of greater RF-EMF penetration into the tissues as brain compared to adult's one (Wiert et al., 2011). That is the reason why the aim of our study was to analyze the effects of chronic RF-EMF exposure associated or not with noise co-exposure on juvenile population on sleep, weight, food intake and respiratory parameters.

## Material and methods

### Animals

Experiments were conducted on 48 male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) weighing between 55 and 85 g and aged 3 weeks at the time of their arrival in our facility (day (D)1). Four groups of animals were formed (12 animals each): a noise-exposed group, a RF-EMF exposed group, a co-exposure between noise and RF-EMF and a control, non-exposed group. Groups were housed in anechoic chambers with a controlled thermoneutral air temperature ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ), 12 hr:12 hr dark/light cycle (lights on at 6 am and off at 6 pm), relative air humidity (mean  $\pm$  standard deviation (SD):  $39\pm 12\%$ ) and air velocity ( $<0.2$  m/s). Rats were individually housed in plastic cages (425 mm x 266 mm x 185 mm) within the chamber. Food (3436EXF12, Serlab, Montataire, France) and water were available *ad libitum*. Daily animal care was performed between 5 pm and 6 pm without any exposure. Experiments were performed in accordance with the European guidelines (2010/63/EU) and the French governmental decree 2013-118 on the care and use of laboratory animals and the study protocol was approved by the nationally accredited Regional Directorate for Health, Animal and Environment Protection (Amiens, France) and the French Ministry of Research (license number: APAFIS#3735-2016012017118094 v3).

According to the group, exposure began on D5 and run all over the 5 weeks of experiments until the sacrifice (from D5 to D41).

### RF-EMF exposure

The RF-EMF exposure started after four-days of acclimatization. The climatic chambers were equipped with RF-EMF antennas (model 800–10465, KATHREIN-Werke KG, Rosenheim, Germany) powered by a generator (model RFS 900–64, RFPA, Artigues-près-Bordeaux, France) emitting a continuous-wave 900 MHz electromagnetic field. Antennas were horizontally located in the climatic chamber, 80 cm above the exposed rats' boxes. The power of the generator was set in order to obtain a field intensity of 1.8 V/m. The Specific Absorption Rate of the animals was calculated at 30 mW/kg. The level of RF-EMF exposure was checked with a radiofrequency probe (PMM EP600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA) and monitor on computer software (Win EP 600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA). The RF-EMF exposure was running for 23 hours per day.

## **Noise exposure**

Noise-exposed animals were subjected to a 24 hr soundtrack divided into two main periods: a noisy light period (the rat's rest period) from 6 am to 5 pm, and a noise-free dark period from 6 pm to 6 am). During noise-free period, handling, and during plethysmographic measurements, the intensity of the background noise was 65 dB.

The noise exposure period was split into 10 min segments, each of which had a unique combination of noise type, frequency and intensity. The noise types were urban sounds (traffic, roadworks, sirens, etc.), music and artificial sounds (white noise, red noise, sinusoids, etc.). The mean  $\pm$  SD (range) sound level was  $87.5 \pm 3.7$  dB (59–111). The frequencies ranged from 50 to 20,000 Hz. To avoid habituation, four different 24 hr noise exposure files were built out of 10-minutes segments arranged in a pseudo-random order. Each day's noise exposure file was chosen in a pseudo-random manner. The noise was regulated by an amplifier (Combo 130, Audiophony Hit Music SAS, Fontanes, France) and delivered through loudspeakers (K50-8 Ohm, JBSystems, Groot-Bijgaarden, Belgium).

## **Protocol**

After 4 days of habituation to housing conditions, animals were exposed (or not) to noise and/or RF-EMF for 5 weeks (until D41). On D26 or D27, a telemetric sensor was surgically implanted in each animal. From D33 to D39 food intake, water intake and body weight data were recorded. Electroencephalography (EEG), electromyography (EMG) were recorded for one day. At D41, the rats were sacrificed by heart puncture under general anesthesia with a mixture of air and 2.5 % isoflurane (Iso-Vet 1000 mg/g, Piramal Healthcare UK Ltd, Morpeth, United-Kingdom).

## **Surgery**

A subcutaneous telemetric EEG and EMG sensor (F20-EET, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) was implanted under general anesthesia with isoflurane (5% for induction, and then 2.5% during surgery). To record the EEG signal, two gold-plated screws (15 SURTEX, Dentatus AB, Spånga, Sweden) were inserted into the animal's skull, just above the dura matter. Dental cement (Dentalon, Henri Schein, Alfortville, France) was used to fix the probe and isolate the EEG signal. To measure the EMG signal, two probes were inserted into the dorsal muscles of the neck. After surgery, animals were allowed to recover for 5 days.

## **Data acquisition and analysis**

### *Body weights*

The animals' body mass was measured every other day using scales (Scaltec SPO-62, Scaltec Instruments, Göttingen, Germany; sensitivity: 0.1 g). The weight gain was calculated as follows:  $Weight\ gain = Weight\ at\ D_x - Weight\ at\ D_1$ .

Statistical results on body weight gain confirm the results on body weight per se.

### *Food and water intakes*

Daily food intake was scored automatically with individual scales (Sartorius TE601, Sartorius Lab Instruments GmbH; sensitivity: 0.1 g). The time, duration (in seconds) and the quantity of each meal (in grams) were recorded using in-house software. Water intake was measured daily, using individual nursing bottles (sensitivity: 5 mL). Ratios of the total quantity and mean quantity of each meal based on the weight of the animal have been calculated.

Due to technical problem, food and water intakes parameters were calculated for 11 of the 12 animals exposed to RF-EMF and for 12 animals for noise-exposed, co-exposed and control animals.

### *Sleep*

The EEG and EMG sensors were connected wirelessly to a receiver (RPC-1, Data Sciences International) and a computer via a matrix (Data Exchange Matrix, Data Sciences International). Data were recorded using Ponemah software (Data Sciences International).

Recordings were scored visually every 4 seconds with Spike2 software (version 7.01, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) as active wakefulness (AW), quiet wakefulness (QW), Non-Rapid-Eye-Movement (NREM) sleep and Rapid-Eye-Movement (REM) sleep. Quiet wakefulness was defined as a short episode (lasting between 8 sec and 2 min) of wakefulness within a sleep episode, and during which the animal did not move or eat (Pelletier et al., 2013). For NREM and REM sleep, the total amount (in min per 24 hr), episode frequency (per hour), mean episode duration (in min) and proportion of TST (in %) were calculated.

Due to technical problems, sleep parameters were calculated for 11 to the 12 animals exposed to RF-EMF, for 10 out of the 12 animals exposed to noise, for 12 co-exposed animals and for 12 controls.

#### *Respiratory parameters*

On D40, inspiratory time ( $T_I$  in ms), expiratory time ( $T_E$  in ms), total time ( $T_{Tot}$  in ms), respiration rate (in bpm) and the number and the duration of apneas were measured using whole-body plethysmography (Model PLY3213, Buxco-EMKA Technologies, Sharon, CT, USA) during the light period and in the absence of RF-EMF and high-level noise exposure. Rats were familiarized with the plethysmograph for 30 min the day before the measurement and then for 45 min on the day of the measurement. Animals were kept away from exposure for 105 min before the measurement. Sleep parameters and apnea events (defined as the cessation of ventilation for at least 2.5 s, i.e. at least two missed breaths) were recorded.

Due to technical problems, respiratory parameters were calculated for 11 animals exposed to RF-EMF, for 11 animals exposed to noise, for 12 co-exposed animals and for 10 controls. Concerning sleep during plethysmography, we analyzed 10 control animals, 11 RF-EMF exposed animals, 11 noise exposed animals and 12 co-exposed one.

#### *Statistical analysis*

Data (expressed as the mean  $\pm$  SD) were analyzed using Statview software (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). When the data were normally distributed (according to a Kolmogorov-Smirnov test), a two-way analysis of variance (with Fisher's partial least-squares difference post-test) and if data were non normal, Mann-Whitney tests were applied (ie food and water intakes parameters). The threshold for statistical significance was set to  $p < 0.05$ . Comparison co-exposed group vs control were also performed.

## Results

### *Weight of the animals*

The body weight gain (related to weight of arrival day) of RF-EMF-exposed, noise-exposed and co-exposed animals was higher than that of controls (control  $210.5 \pm 25.5$ , RF-EMF:  $231.9.5 \pm 27.6$  g vs control,  $p < 0.001$ ; noise:  $222.7 \pm 28.8$  g vs control,  $p = 0.018$  and co-exposed:  $223.5 \pm 23.3$  g vs control,  $p = 0.005$ ). Noise-exposed body weight gain was significantly lower than RF-EMF exposed group ( $p = 0.037$ ).

### *Food and water intake on 24 hr*

**Noise-exposed animals** ate more compared to controls whatever the nycthemeral period. This was due to higher total quantity, higher number of meals and higher duration of a meal. Moreover, these animals drunk more than controls (Table 1)

In contrast **RF-EMF-exposed animals** ate less compared to controls as the consequence of lower number of meals, lower mean duration of a meal, despite higher mean quantity per meal. As noise group, RF-EMF-exposed animals drunk more.

**Co-exposed animals** ate more compared to controls due to a higher mean quantity of meal, higher meal duration and lower number of meals. Compared to noise-exposed animals, co-exposed animals had lower total quantity and number of meal while meal mean quantity was higher. Compared to RF-EMF-exposed ones, total quantity, meal duration and meal mean quantity were higher in co-exposed animals. Water intake of co-exposed animals was not significantly different compared to that of the controls, but was lower than in noise and RF-EMF expose animals.

Food and water intake parameters	Control group	Noise exposed group	RF-EMF exposed group	Co-exposed group
Total quantity/animal weight	0.088 ±0.008	0.095 ±0.010 ***###	0.086 ±0.009 #	0.090 ±0.010
Number of Meals	12.2±2.2	13.4±2.6 **###	10.3±4.1 **	10.6±2.8 ***
Meal quantity/animal weight	0.007±0.002	0.007±0.002 ###	0.008±0.001 #	0.009±0.002 ***
Mean episode duration (s)	667.3±228.7	819.9±324.9 **	545.9±285.1 *###	806.9±375.2 **
Total quantity of water (mL) /24 hr	28.9±6.7	36.2±2.7 ***#	33.4±9.0 ***#	30.5±7.6

Table 1: Food and water intake (mean ± SD) in controls (n=12), noise exposed (n=12), RF-EMF exposed (n=11) and co-exposed (n=12) animals during 24 hr. Total quantity and mean quantity of a meal were expressed on body weight. Mann-Whitney group comparison with control group (\* p<0.05 \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001) and with co-exposed group (# p<0.05 ## p<0.01, ### p<0.001).

*Sleep measured over 24 hr (Table 2)*

Usual **nycthemeral effects** were observed: lower duration of AW and REM, and higher duration of QW, NREM sleep and TST during the light period compared to the dark period. In the light period, AW episodes were less frequent whereas those of QW, REM, REM were more frequent. Finally, the mean duration of QW was higher whereas the mean duration of AW and REM sleep episodes were lower. These comparisons were all significant with a p<0.001.

The **noise effects** (whatever the RF-EMF exposure) were only significant during the dark period (i.e. during the recovery period from noise exposure): QW and NREM sleep total durations were lower in RF-EMF groups (respectively p=0.030 and p=0.010), so that relative

duration of NREM (related to TST) was reduced at the benefit of REM relative duration ( $p=0.004$ ).

**RF-EMF exposure** (whatever the noise exposure) increased significantly the frequency of AW episodes ( $p=0.029$ ) and reduced their mean duration ( $p=0.012$ ), so that total duration was maintained. In contrast to noise effects, these results in the RF-EMF group are not dark/light-dependent. Interestingly, the only sleep parameters exhibiting a significant noise \* RF-EMF interaction was the mean duration of NREM episodes: in contrast to both RF-EMF and noise co-exposure, RF-EMF exposure alone and noise exposure alone increased the mean duration of NREM sleep episodes (respectively, vs control group:  $p=0.048$  and  $p=0.006$ ).

**Co-exposed** group characteristic did not significantly differ from those measured in mono-exposed groups. (Table 2).

		Control group		Noise exposed group		RF-EMF exposed group		Co-exposed group	
		Light (rest)	Dark (activity)	Light (rest)	Dark (activity)	Light (rest)	Dark (activity)	Light (rest)	Dark (activity)
AW	Total duration (min)	152.3 ±25.4	138.8 ±28.3	419.1 ±47.0	394.9 ±32.5	149.1 ±30.1	393.9 ±29.0	139.2 ±37.1	415.7 ±61.1
	Frequency (ep/h)	1.3 ±0.5	1.0 ±0.4	1.6 ±0.9	1.5 ±0.4	1.3 ±0.5	2.0 ±0.8	1.6 ±0.9	1.7 ±0.5
	Mean episode duration (min)	10.9± 3.7	12.2 ±3.6	27.8 ±13.2	23.9 ±7.9	10.8 ±3.5	18.0 ±6.0	9.1 ±4.6	22.2 ±6.8

QW	Total duration (min)	98.4 ±29.2	95.4 ±20.1	33.5 ±11.7	40.3 ±10.3	79.4 ±17.8	37.9 ±6.7	98.8 ±18.4	32.2 ±9.2
	Frequency (ep/h)	21.0 ±3.3	18.9 ±2.6	7.3 ±2.1	9.7 ±1.6	18.1 ±3.6	9.3 ±1.0	20.5 ±4.7	8.0 ±2.3
	Mean episode duration (min)	0.4 ±0.1	0.4 ±0.1	0.4 ±0.1	0.3 ±0.1	0.4 ±0.0	0.3 ±0.1	0.4 ±0.1	0.3 ±0.1
TST	total duration (min)	469.3 ±36.0	485.8 ±36.2	267.4 ±36.4	284.8 ±29.9	491.5 ±35.6	288.2 ±30.7	481.9 ±42.7	272.1 ±53.5
NREM	Total duration (min)	417.4 ±29.3	438.5 ±33.5	202.7 ±27.5	225.3 ±26.0	441.4 ±29.6	227.1 ±21.3	438.6 ±35.0	204.2 ±36.9
	Frequency (ep/h)	22.3 ±3.2	19.9 ±2.8	8.7 ±2.2	11.2 ±1.7	19.4 ±3.6	11.2 ±1.2	22.0 ±5.1	9.7 ±2.2
	Mean episode duration (min)	1.6 ±0.3	1.9 ±0.3	2 ±0.5	1.7 ±0.2	2 ±0.4	1.7 ±0.3	1.7 ±0.4	1.8 ±0.3
	NREM (% of TST)	89.0 ±2.7	90.3 ±2.9	75.9 ±3.7	79.0 ±2.3	89.9 ±3.0	79.0 ±3.9	91.1 ±2.4	75.6 ±4.3
REM	Total duration (min)	51.9 ±14.6	47.3 ±15.1	64.7 ±14.0 5	59.5 ±8.3	50.2 ±17.2	61.1 ±15.2	43.3 ±13.5	67.9 ±18.8
	Frequency (ep/h)	4.6 ±1.3	4.2 ±1.5	3.8 ±0.8	3.9 ±0.7	4.3 ±1.1	4.0 ±0.9	4.1 ±1.1	4.4 ±1.3
	Mean episode	1.0 ±0.2	1.0 ±0.3	1.4 ±0.3	1.3 ±0.3	1.0±0. 3	1.3 ±0.2	0.9 ±0.2	1.3 ±0.2

	duration (min)								
	REM (% of TST)	11.0 ±2.7	9.7 ±2.9	24.1 ±3.7	21.0 ±2.3	10.1 ±3.0	21.0 ±3.9	8.9 ±2.5	24.4 ±4.3

Table 2: Sleep parameters (mean ± SD) in controls (n=12), noise exposed (n=10), RF-EMF exposed (n=11) and co-exposed (n=12) animals during 24 hr, and split into light (rest/noise exposure) and dark (activity/no noise) periods

*Sleep during plethysmography (Table 3)*

**Noise exposure** (whatever RF-EMF exposure) induced significant effects during the 1 hr-long, noise-free and RF-EMF-free plethysmographic period during daytime. In the noise-exposed group, TST was significantly longer ( $p=0.036$ ) due to lower AW duration ( $p=0.020$ ) despite slight increase of QW total duration ( $p=0.014$ ). REM and NREM sleep increases failed to reach significance but there was a tendency of a higher REM% and lower NREM% compared to non-noise exposed animals.

Sleep during **co-exposure** condition did not differ from that measured in the noise or in the RF-EMF-exposure alone groups.

		Control group	Noise group	RF-EMF group	Co-exposed group	Noise comparison	RF-EMF comparison	RF-EMF x Bruit interaction
AW	Total duration (min)	22.2±16.3	9.8±8.5	22.5±17.1	14.1±13.8	*	NS	NS
	Frequency (ep/h)	2.4±1.6	1.4±0.8	2.8±2.3	1.5±1.2	*	NS	NS
	Mean episode duration (min)	9.4±12.6	5.7±6.1	13.3±17.0	9.0±6.6	NS	NS	NS
QW	Total duration (min)	5.3±3.3	7.0±3.3	3.7±1.6	6.6±3.1	*	NS	NS
	Frequency (ep/h)	13.1±6.9	14.9±6.8	10.8±4.5	16.1±6.5	NS	NS	NS

	Mean episode duration (min)	0.4±0.2	0.5±0.2	0.3±0.1	0.4±0.1	NS	NS	NS
TST	total duration (min)	32.5±1 3.9	43.2±7.1	33.8±1 5.7	39.2±1 1.5	*	NS	NS
NREM	Total duration (min)	31.5±1 3.1	40.4± 7.0	32.6±1 4.8	37.7±1 0.9	NS	NS	NS
	Frequency (ep/h)	15.4±7. 4	16.0±6.9	13.7±4. 3	17.7±6. 9	NS	NS	NS
	Mean episode duration (min)	2.0±0.9	3.0±1.3	2.5±1.3	2.4±1.1	NS	NS	NS
	NREM (% of TST)	97.4±3. 5	93.6±5.6	97.2±4. 3	96.3±2. 8	NS	NS	NS
REM	Total duration (min)	1.0±1.5	2.8±2.3	1.2±2.1	1.7±1.3	NS	NS	NS
	Frequency (ep/h)	1.2±1.7	3.8±2.6	2.0±2.4	3.2±2.1	**	NS	NS
	Mean episode duration (min)	0.7±0.6	0.7±0.4	0.5±0.4	0.7±0.7	NS	NS	NS

	REM (% of TST)	2.6±3.5	6.4±5.6	2.8±4.3	3.7±2.8	NS	NS	NS
--	-------------------	---------	---------	---------	---------	----	----	----

Table 3: Sleep parameters during the plethysmographic recording (mean ± SD) in controls (n=12), noise exposed (n=11), RF-EMF exposed (n=10) and co-exposed (n=12) animals during 1 hr, during a non RF-EMF-noise-exposed period. Statistical results, NS non-significant, \* p<0.05 \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

### *Respiratory Parameters*

**Noise and/or RF-EMF exposure** did not induce any modification in the frequency (control: 7.3±7.8; RF-EMF: 4.2±5.1; noise 9.6±8.4; co-exposed 8.2±9.7 episodes/hr) and mean duration (control :2.9±1.2; RF-EMF: 3.2±0.6; noise: 3.1±0.3; co-exposed: 3.2±0.5 s) of apnea.

**Noise-exposed groups** (whatever the presence or not of RF-EMF) presented longer  $T_I$ ,  $T_E$  and  $T_{Tot}$  and consistently decreased respiratory frequency.

There was no effect of **RF-EMF** nor double interaction noise\*RF-EMF exposure on these parameters. However **triple interaction noise\*RF-EMF\*sleep stages** was significant on  $T_I$ : noise exposure induced an augmentation of  $T_I$  in NREM sleep when the animals were not exposed to RF-EMF (201±23 vs 240±30 ms, p=0.004) and in contrast in REM sleep when the animals were exposed to RF-EMF (211±15 vs 244±21 ms, p=0.007). On the other hand, RF-EMF exposure alone induced a significant decrease of  $T_I$  in REM sleep when compared to controls (p=0.028) but this disappeared when noise co-exposure was present (vs noise alone).

	Control group		Noise exposed group		RF-EMF exposed group		Co-exposed group	
	NREM	REM	NREM	REM	NREM	REM	NREM	REM
T <sub>I</sub> (ms)	201 ±23	252 ±31	240 ±30	235 ±39	200 ±22	211 ±15	231 ±18	244 ±21
T <sub>E</sub> (ms)	320 ±45	339 ±66	348 ±31	363 ±43	341 ±40	327 ±37	362 ±28	352 ±37
T <sub>Tot</sub> (ms)	513 ±63	575 ±73	580 ±39	587 ±61	522 ±58	516 ±25	574 ±41	568 ±63
Respiration Rate (bpm)	118,8 ±15,4	105,9 ±15,4	103,9 ±6,837	103,1 ±10,3	116,1 ±11,9	116,5 ±5,5	105,1 ±7,2	106,8 ±11,8

Table 4: Respiratory parameters (mean ± SD) in controls (n=10), noise exposed (n=11), RF-EMF exposed (n=11) and co-exposed (n=12) animals during 1 hr (no RF-EMF, no noise), and split into NREM and REM sleep.

## Discussion

To the best of our knowledge, our protocol is the first one analyzing hypnic, weight gain, food intake and respiratory parameters in a juvenile population exposed to RF-EMF, noise and the co-exposure of both constraints.

### *Weight*

Our study shows that whatever the type of exposure, animals had higher body weight gain compared to controls and a significantly higher value for RF-EMF-exposed group compared to noise-exposed group. A higher body weight due to noise exposure has already been described in rodent models (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017). In the same way, RF-EMF exposure has been related to weight variations (+6 %) on a rodent adult model after a chronic exposure (280 days to 900 MHz no intensity indicated) (Sommer et al., 2004) but literature is very sparse on this aspect. Several studies of the literature have demonstrated that stress and/or short sleep duration can lead to weight gain and food intake alterations (von Kries et al., 2002; Michel et al., 2003; Spiegel et al., 2004b). Even though sleep alterations remain quite slight in our environmental exposures (see below), it cannot be excluded that they could be involved in increased body weight.

### *Food and water intake*

Our results point out that higher weight was not always related to an hyperphagia according to the different types of exposure. We observed that noise exposure (alone) induced an hyperphagia which is consistent with literature, such as rodent's exposure (85 dB for 9 days) (Mavanji et al., 2013). These effects are probably due to the intensity or the chronicity of the exposure, because an acute exposure (12 hr) did not induce modification in food intake (Parrish and Teske, 2017).

Conversely RF-EMF exposure (alone) induced an hypophagia. In a previous protocol performed in our laboratory we did not observe any significant variation but interestingly it was greater when animals were at 31°C (Pelletier et al., 2013). This difference with a quite similar protocol is difficult to explain but one of the cause could be the intensity, higher in our study (1.8 vs 1.0 V/m).

Interestingly, the co-exposure of both constraints led the total food intake to return to levels measured in the control group with however a different food intake pattern. This latter presented noise characteristics: i.e. lower number of meals, higher meal duration and higher meal mean quantity. Conversely to our hypothesis, co-exposure did not present a worsening of simple effects regarding the food intake parameters.

A simple exposure of noise or RF-EMF induced a higher water intake than in controls. Water intake alterations have never been studied under RF-EMF exposure. Surprisingly, similarly to total food intake the water intake of co-exposed animals didn't present values comparable of exposed, but presented value comparable to controls. This antagonistic effect has not been, to the best of our knowledge, described for food intake or weight gain parameters before.

#### *Sleep parameters*

Surprisingly, noise did not induce any significant alteration of sleep during the daytime-resting period (when noise was present) but only during the nighttime-active-non-noisy period (higher mean duration of NREM sleep without any TST variation, lower QW duratio and lower NREM/REM ratio. The absence of TST modification is surprising given that two studies on rats related noise exposure with a lower TST (Mavanji et al., 2013; Parrish and Teske, 2017). However, even if their protocol was quite similar to our (noise during light period, dark-light sleep study) these studies used shorter exposure for 1 to 9 days (at 85 dB, 9h during daytime). During the second period of recording (1 hr long while the plethysmograph was running out of the noise and RF-EMF exposed chamber), noise-exposed group presented higher TST (+8 min) and lower AW (-10.2 min). This is a typical rebound sleep phenomenon indicating an increased sleep pressure in this group, even though this latter effect did not significantly appear during the light-noise exposed period nor the dark non-exposed period. This absence of sleep perturbation can be a consequence of a circadian rhythm too strong to be modified by the sleep pressure. This also could be due to a temporal repartition of the sleep along the dark-resting period (higher TST during the first part of the night, as soon as noise exposure stopped which failed to reach significance when 12 hr-long nighttime sleep period is considered).

The RF-EMF-exposed animals have, whatever the noise exposure, slight fragmentation of AW (higher episodes' frequency and lower mean duration of AW) without any modification of the total AW duration. They also have a higher mean duration of NREM sleep episodes. In the literature, studies also pointed out changes in the sleep architecture but mainly on REM. Acute exposed humans showed a lower sleep latency and a significant decrease of REM sleep (900 MHz for 8 hr) (Mann and Röschke, 1996; Wagner et al., 1998). A chronic exposure performed in our laboratory (5 weeks) showed a fragmentation of REM sleep (Pelletier et al., 2013). But RF-EMF effects on sleep remain controversial (ANSES, 2013).

The co-exposure of the both environmental constraints led values comparable to controls during the 24 hr-sleep recording as during the 1 hr sleep period (without noise nor RF-EMF). Different hypotheses arise from these results. The first one is a protective effect of RF-EMF on deleterious effects of noise exposure on sleep. A second hypothesis could relate the fact that a simple exposure leads to effects but when the constraint becomes too important (i.e. with a second simultaneous constraint) sleep and homeostasis needs become too important and overcome sleep perturbation. A spectral analysis would have allowed to analyze effects more accurately and gave complementary results.

#### *Respiratory parameters*

We observed neither variation in apneas frequency nor in mean duration in RF-EMF nor in noise exposure. Absence of literature makes this result difficult to compare, but it must be kept in mind that the observed apneas were short, sparse and did not present a pathological status.

The chronic noise exposure induced a lower respiration rate, whatever the sleep state, during the the non-exposed period. In literature, noise exposure induced lower respiration rate (63 dBA impacts noise) (Park et al., 2017). However, this study analyzed direct effects of intermittent noises so that it is difficult to compare with ours. One study linked noise exposure (16 musicals fragments of 30 s each from 52.2 to 77.5 dB(A) over 1.5 hr of experiment) to a longer inspiratory time, consistently with our observation (Gomez and Danuser, 2004). Bradypnea observed could be a consequence of either the deepening of the sleep and/or a dysfunction of the thyroid. Indeed, pathological hypothyroidism is related to diminished of the respiration rate (Sadek et al., 2017) and hypothyroidism has also been observed in noise

exposed animals (1 to 6 hr/day for 8 weeks, no level indicated) (Ramezani et al., 2014). Unfortunately, thyroid hormones and thyroid morphology have not been evaluated in our study.

The RF-EMF exposure did not significantly modify the respiration rate. This result is consistent with results obtained from an acute exposure (30 min to 1950 MHz and 900 MHz) (Kwon et al., 2012; Wilén et al., 2006). RF-EMF exposed animals, with or without noise, have also a lower inspiratory time in the REM sleep only. This is the first time that such respiratory parameters have been evaluated under RF-EMF exposure so that no comparison is possible. Significant triple interaction RF-EMF\*noise\*sleep stage is difficult to explain but could indicate that RF-EMF may have slight trace effects on respiration.

## Conclusion

In summary, noise and RF-EMF are two environmental constraints acting in a different way on studied parameters.

Noise led to increased body weight with increased food intake. Hypnic parameters were altered (indirect effects, i.e. during the nighttime non noise-exposed period) with a lower NREM/REM balance without modification of TST. However, a rebound effect was observed (higher TST in favor of REM sleep, lower AW) when animals slept in the plethysmograph (1 hr long no noise or RF-EMF exposure) indicating that sleep pressure may be increased. Respiratory parameters were altered by noise exposure with lower respiration rate due to simultaneous higher inspiratory and expiratory times.

RF-EMF group had higher body weight gain while the food quantity was lower. Hypnic parameters, during the 24 hr recording pointed out fragmented AW without any effect during the plethysmographic period, in favor of direct effects of RF-EMF. RF-EMF exposure decreased inspiratory time in REM sleep indicating potential effect on respiration.

Co-exposed animals were also heavier than controls but with no total food quantity modification. The co-exposure between the RF-EMF and the noise did not therefore exacerbate the effects of RF-EMF exposure on juvenile rats. Indeed, most of these hypnic and respiratory effects observed when noise or RF-EMF were present alone disappeared in co-exposed animals. Conversely to our hypothesis, co-exposure did not present a worsening of the effects observed with mono exposure, in contrast to other co-exposure (Ocelli et al., 2018; Pelletier et al., 2013).

## Bibliography

- ANSES (2013). *Radiofréquences et santé* (Maison-Alfort France: ANSES).
- Axelsson, A., and Lindgren, F. (1985). Is there a relationship between hypercholesterolaemia and noise-induced hearing loss? *Acta Otolaryngol.* 100, 379–386.
- Berg-Beckhoff, G., Blettner, M., Kowall, B., Breckenkamp, J., Schlehofer, B., Schmiedel, S., Bornkessel, C., Reis, U., Potthoff, P., and Schüz, J. (2009). Mobile phone base stations and adverse health effects: phase 2 of a cross-sectional study with measured radio frequency electromagnetic fields. *Occupational and Environmental Medicine* 66, 124–130.
- Blois, R., Debilly, G., and Mouret, J. (1980). Daytime noise and its subsequent sleep effects.
- Crouzier, D., Debouzy, J.C., Bourbon, F., Collin, A., Perrin, A., and Testylier, G. (2007). Neurophysiologic effects at low level 1.8 GHz radiofrequency field exposure: a multiparametric approach on freely moving rats. *Pathologie Biologie* 55, 134–142.
- Fruhstorfer, B., Pritsch, M.G., and Fruhstorfer, H. (1988). Effects of daytime noise load on the sleep-wake cycle and endocrine patterns in man: I. 24 hours neurophysiological data. *Int. J. Neurosci.* 39, 197–209.
- Gomez, P., and Danuser, B. (2004). Affective and physiological responses to environmental noises and music. *International Journal of Psychophysiology* 53, 91–103.
- Haas, F., Distenfeld, S., and Axen, K. (1986). Effects of perceived musical rhythm on respiratory pattern. *Journal of Applied Physiology* 61, 1185–1191.
- Johansson, A., Nordin, S., Heiden, M., and Sandström, M. (2010). Symptoms, personality traits, and stress in people with mobile phone-related symptoms and electromagnetic hypersensitivity. *Journal of Psychosomatic Research* 68, 37–45.
- Knave, B., Bergqvist, U., and Wibom, R. (1992). “Hypersensitivity to electricity” - a workplace phenomenon related to low-frequency electric and magnetic fields. 8. International Congress of the International Radiation Protection Association (IRPA8).
- von Kries, R., Toschke, A.M., Wurmser, H., Sauerwald, T., and Koletzko, B. (2002). Reduced risk for overweight and obesity in 5- and 6-y-old children by duration of sleep--a cross-sectional study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 710–716.
- Kwon, M.K., Choi, J.Y., Kim, S.K., Yoo, T.K., and Kim, D.W. (2012). Effects of radiation emitted by WCDMA mobile phones on electromagnetic hypersensitive subjects. *Environmental Health* 11, 69.
- Mann, K., and Röschke, J. (1996). Effects of Pulsed High-Frequency Electromagnetic Fields on Human Sleep. *NPS* 33, 41–47.
- Mavanji, V., Teske, J.A., Billington, C.J., and Kotz, C.M. (2013). Partial sleep deprivation by environmental noise increases food intake and body weight in obesity-resistant rats. *Obesity* (Silver Spring, Md.) 21, 1396–1405.
- Michel, C., Levin, B.E., and Dunn-Meynell, A.A. (2003). Stress facilitates body weight gain in genetically predisposed rats on medium-fat diet. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285, R791–R799.

Mohler, E., Frei, P., Fröhlich, J., Braun-Fahrländer, C., Röösli, M., and QUALIFEX-team, T. (2012). Exposure to Radiofrequency Electromagnetic Fields and Sleep Quality: A Prospective Cohort Study. *PLOS ONE* 7, e37455.

Occelli, F., Lameth, J., Adenis, V., Huetz, C., Lévêque, P., Jay, T.M., Edeline, J.-M., and Mallat, M. (2018). A Single Exposure to GSM-1800 MHz Signals in the Course of an Acute Neuroinflammatory Reaction can Alter Neuronal Responses and Microglial Morphology in the Rat Primary Auditory Cortex. *Neuroscience* 385, 11–24.

Park, J., Chung, S., Lee, J., Sung, J.H., Cho, S.W., and Sim, C.S. (2017). Noise sensitivity, rather than noise level, predicts the non-auditory effects of noise in community samples: a population-based survey. *BMC Public Health* 17, 315.

Parrish, J.B., and Teske, J.A. (2017). Acute partial sleep deprivation due to environmental noise increases weight gain by reducing energy expenditure in rodents: Acute Partial Sleep Deprivation Reduces Energy Expenditure. *Obesity* 25, 141–146.

Pelletier, A., Delanaud, S., Décima, P., Thuroczy, G., de Seze, R., Cerri, M., Bach, V., Libert, J.-P., and Loos, N. (2013). Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy balance in developing rats. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 2735–2746.

Pyko, A., Eriksson, C., Oftedal, B., Hilding, A., Östenson, C.-G., Krog, N.H., Julin, B., Aasvang, G.M., and Pershagen, G. (2015). Exposure to traffic noise and markers of obesity. *Occup Environ Med* 72, 594–601.

Ramezani, N., Ahmadi, R., Akbari, S., and Mohammadi, S. (2014). Effects of Noise Pollution on Thyroid Function in Rat. *International Conference on Earth, Environment and Life Sciences*.

Sadek, S.H., Khalifa, W.A., and Azoz, A.M. (2017). Pulmonary consequences of hypothyroidism. *Ann Thorac Med* 12, 204–208.

Santini, R., Santini, P., Danze, J.M., Le Ruz, P., and Seigne, M. (2002). Investigation on the health of people living near mobile telephone relay stations: I/Incidence according to distance and sex. *Pathol. Biol.* 50, 369–373.

Sommer, A.M., Streckert, J., Bitz, A.K., Hansen, V.W., and Lerchl, A. (2004). No effects of GSM-modulated 900 MHz electromagnetic fields on survival rate and spontaneous development of lymphoma in female AKR/J mice. *BMC Cancer* 4.

Spiegel, K., Tasali, E., Penev, P., and Van Cauter, E. (2004). Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann. Intern. Med.* 141, 846–850.

Wagner, P., Röschke, J., Mann, K., Hiller, W., and Frank, C. (1998). Human sleep under the influence of pulsed radiofrequency electromagnetic fields: A polysomnographic study using standardized conditions. *Bioelectromagnetics* 19, 199–202.

Wiert, J., Hadjem, A., Varsier, N., and Conil, E. (2011). Numerical dosimetry dedicated to children RF exposure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 421–427.

Wilén, J., Johansson, A., Kalezic, N., Lyskov, E., and Sandström, M. (2006). Psychophysiological tests and provocation of subjects with mobile phone related symptoms. *Bioelectromagnetics* 27, 204–214.

Etude 3 : Impacts d'une exposition chronique aux champs électromagnétiques sur le système immunitaire de rats juvéniles

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire Hématim (UPJV – Amiens).

### ***Introduction***

L'exposition aux CEM, au cours des dernières décennies, s'est fortement développée dans nos sociétés. Or, l'attribution de symptômes aux CEM par les riverains d'antennes relais et par une partie de la population souffrant d'électro-hypersensibilité en fait un sujet d'étude de premier ordre. Les études menées en laboratoire afin de retrouver ces effets et pouvoir en déterminer la cause restent à ce jour majoritairement controversées. Parmi les hypothèses qui ont été formulées afin de déterminer le mécanisme d'interaction des CEM avec un organisme, le système immunitaire est un élément important.

Ainsi l'objectif de ce travail était l'évaluation des éventuels impacts immunitaires suite à une exposition chronique aux CEM de type radiofréquence sur une population juvénile. En effet, l'étude des impacts sur cette population est particulièrement importante en raison de la vulnérabilité de celle-ci, d'une part en raison de son immaturité, mais également en raison de valeurs de DAS supérieures à celle d'adultes pour des expositions similaires. Pour cela, les paramètres sanguins et les sous populations immunitaires centrales et périphériques, ont été évalués.

### ***Matériel et méthodes***

Pour cela, 24 rats mâles Wistar, répartis en deux groupes de 12 ont été (ou non selon leur groupe) exposés à un champ électromagnétique pendant 5 semaines. L'exposition, d'une durée de 23 heures par jour, avait une fréquence de 900 MHz, une intensité de 1,8 V/m et un DAS de 30 mW/kg. A la suite des 5 semaines d'exposition, les animaux ont été sacrifiés par ponction intracardiaque afin de récupérer le sang. Le jour suivant, une numération de la formule sanguine a été réalisée avant que les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) ne soient séparés à l'aide d'un gradient de Ficoll. La rate et le thymus ont également été collectés, puis les cellules de ces organes dissociées avant d'être congelées. Suite à leur décongélation, les cellules ont été marquées et comptées par la technique de cytométrie en flux.

## **Résultats**

L'exposition aux CEM n'a pas montré de différence sur les divers paramètres hématologiques analysés (concentration en hémoglobine ou nombre de globules rouges, hématocrite ...) ni sur les nombres de leucocytes, de monocytes et de neutrophiles.

Concernant les PBMC, chez les animaux exposés aux CEM, le pourcentage de lymphocytes B activés était significativement plus important tandis que celui des lymphocytes T activés était inférieur à celui des animaux contrôles liés à un pourcentage de lymphocytes T cytotoxiques inférieur. Aucune variation du pourcentage de lymphocytes T helper et du pourcentage de cellules NK n'a été observée.

Au niveau de la rate, le pourcentage de lymphocytes B activés chez les animaux exposés était plus élevé que chez les témoins tandis que le pourcentage de lymphocytes B mémoires était significativement plus faible. Aucune variation du pourcentage de lymphocytes B immatures n'a été observée.

Enfin, au niveau du thymus, le pourcentage de lymphocytes T naïfs était similaire entre le groupe exposé aux CEM et dans le groupe contrôle. En revanche, le pourcentage de lymphocytes T double positifs (CD4+/CD8+) était significativement plus faible dans le groupe exposé aux CEM. Le pourcentage de lymphocytes CD4+ était plus élevé dans le groupe exposé aux CEM tandis que le pourcentage de lymphocytes CD8+ ne présentait pas de variation.

## **Discussion**

Cette étude a mis en évidence des effets de l'exposition chronique aux CEM sur les principaux paramètres immunologiques de rats juvéniles.

Les paramètres hématologiques et le nombre de plaquettes chez les animaux exposés aux RF-EMF n'ont pas été modifiés. Ces derniers résultats étaient cohérent avec des études antérieures réalisées chez des souris adultes qui ne montrent aucune modification des globules rouges après une exposition à 1,9 GHz (6 mW / m<sup>2</sup> pendant 4 semaines) (Usman et al., 2012). En ce qui concerne les plaquettes, notre résultat était en contradiction avec (Abdel Aziz et al., 2010a) qui ont observé un nombre plus élevé de plaquettes chez les rats exposés (exposition de deux semaines à 900 MHz). Cependant, leur étude a été réalisée avec une intensité plus élevée (60 à 130 V / m), de sorte qu'un effet thermique ne peut être exclu.

Concernant l'immunité innée, le nombre de monocytes, de neutrophiles et de cellules Natural Killer n'ayant pas été modifié, ce qui suggère que l'exposition aux CEM ne semble pas altérer sur ces paramètres du système immunitaire inné.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'immunité acquise par l'intermédiaire des sous-populations lymphocytaires. Le pourcentage de lymphocytes T activés dans le sang des animaux exposés aux CEM était plus faible que dans le groupe contrôle. De même, les cellules double positif (CD4+/CD8+) étaient en nombre plus faible dans le thymus d'animaux exposés aux CEM. Un pourcentage plus élevé de lymphocytes T CD4+ a été observé chez les animaux exposés aux CEM, sans aucune modification des lymphocytes T CD8+. Il semblerait donc que l'exposition aux CEM conduise à un engagement préférentiel des lymphocytes pour la lignée helper (CD4+). Cette engagement préférentiel vers les lymphocytes helper se fait au détriment des lymphocytes cytotoxiques. Une diminution du nombre de lymphocytes T pourrait conduire à une diminution des performances dans la gestion des cellules infectées par le virus mais aussi des cellules déviantes telles que les cellules cancéreuses.

Le deuxième résultat principal de l'immunité acquise était le pourcentage plus élevé de lymphocytes B activés chez les rats exposés aux CEM que nous avons retrouvés aussi bien dans le sang que dans la rate. En parallèle, le pourcentage de cellules B mémoire était plus faible dans la rate. Ces résultats pourraient être un indicateur de l'activation des lymphocytes B. Les animaux exposés aux CEM auraient donc une augmentation de l'immunité humorale. Cette immunité humorale pourrait être le signe d'une augmentation de la sensibilité aux agents pathogènes, ou d'une augmentation de la défense des agents pathogènes. Pour confirmer ce résultat, le dosage des cytokines et des immunoglobulines serait intéressant.

En conclusion, l'exposition aux CEM conduit à une prédisposition de la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T helper au détriment des lymphocytes T cytotoxiques. Les CEM conduisent également à une augmentation de l'activation des lymphocytes B et donc à une activation de l'immunité humorale.

**Authors:**

BOSQUILLON de JENLIS Aymar<sup>1\*</sup>, COLLET Louison<sup>2\*</sup>, DELANAUD Stéphane<sup>1</sup>, OULED-HADDOU Hakim<sup>2</sup>, GARCON Loïc<sup>2</sup>, BACH Véronique<sup>1</sup>, MAROLLEAU Jean-Pierre<sup>2\*</sup>, PELLETIER Amandine <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>PériTox, Périnatalité & Risques Toxiques, UMR-I 01 INERIS, Picardie Jules Verne University, Amiens, France

<sup>2</sup>Hématim, Picardie Jules Verne University, Amiens, France

\* authors worked equivalently on this work

**Keywords:** RF-EMF, chronic exposure, juvenile rat, immunity

## Abstract

**Objective:** Electromagnetic fields are an environmental factor that has significantly increased over the past few decades. The impacts of these on living organisms remain uncertain. The immune system is an important factor in the protection of growing organisms because of their immaturity. However, the effects of chronic noise exposure on the developing organism are still subject to debate.

**Methods:** Forty-eight 3-week-old male Wistar rats were exposed to electromagnetic fields (900 MHz, 1.8 V/m 23hr/day) for 5 weeks. After the exposure protocol, blood, spleen and thymus were collected in order to analyze blood count and lymphocytes sub-populations.

**Results:** No variation has been observed in general blood count. Innate immunity, represented by monocytes, neutrophils and Natural Killer (NK) cells, were not altered by exposure. However, in blood, T lymphocytes were lower in exposed than in control, while B lymphocytes were higher. Concerning T lymphocytes in thymus, double positive cell presented a lower percentage while CD4+ committed cells were higher. In exposed spleen, activated cells were in higher propensity while memory cells were lower.

**Conclusion:** Innate immunity did not appear to be altered on the observed parameters. However, the adaptive immunity seemed to be impaired with a redistribution of the lymphocyte subpopulations. T lymphocytes show a predisposition for helper lymphocytes differentiation as well as a more deleterious effect on cytotoxic lymphocytes. There is also an increase in B cell activation and thus an activation of humoral immunity.

## Introduction

The democratization of wireless technologies lead to incrementing of radiofrequencies sources in the daily environment. These radiofrequencies electromagnetic fields (RF-EMF) come from mobile phone, but also from mobile phone base stations. In parallel, a phenomenon has appeared: the electro-hypersensitivity. Within this term, a fraction of the population attributed various symptoms to EMF exposure (sleep perturbation, tiredness, headache, equilibrium perturbation...) (Knave et al., 1985; Seitz et al., 2005). Similar symptoms were reported by mobile phone base station neighborhood emitting an exposure to RF-EMF at 900 MHz (Santini et al., 2002). Among the various hypotheses evoked to understand this phenomenon, some of them implicated the immune system (Gangi and Johansson, 2000; Genus and Lipp, 2012b).

The effects of professional chronic exposure to RF-EMF have been evaluated. Thereby, a 6 to 12 GHz chronic exposure lead to a higher concentration of IgG and IgA and a higher number of lymphocytes and cytotoxic lymphocytes in exposed human adults (*vs* non-professionally exposed persons) (Dmoch and Moszczyński, 1998). Another study showed that a professional exposure at 170 MHz significantly increased the levels of IgM and IgG, without any variation in IgA level (Yuan et al., 2004b). However, such human studies do not allow to attribute with certainty the observed effects to RF-EMF exposure highlighting the interest of experimental animal or *in vitro* studies.

Human cells were acutely exposed to RF-EMF (respectively 1800 and 1950 MHz, 45 min to 8h) but presented no variation on Reactive Oxygen Species release and cytokines production compared to control group (Lantow et al., 2006; Tuschl et al., 2006). On adult rodents, at 900 MHz, an acute (2 hours, SAR 0.27 and 1 W/kg)(Chagnaud and Veyret, 1999) and a chronic exposures (5 weeks, SAR 2W/kg) (Gatta et al., 2003; Laudisi et al., 2012; Prisco et al., 2008b; Sambucci et al., 2010, 2011) did not show an immune alteration especially in lymphocyte populations. In contrast, studies conducted in growing rats showed increases of the levels of corticosterone and interleukins (900 MHz, 15 min, 6 W/kg) (Bouji et al., 2012), biochemical and oxidative damages on splenic and thymic cells (900 MHz, 1h, 9.22 W/kg) (Hancı et al., 2015) and modification of the blood homeostasis (increase of platelets number, decrease of hemoglobin concentration...) (900 MHz, 2 weeks at 1.2 W/kg)(Abdel Aziz et al., 2010b). Discrepancies with studies performed in adults could be explained by specificities of juvenile

population related to their physiological and exposure characteristics. Indeed, juvenile period is the period of maturation of the different physiological functions whose immune system and a disturbance during the end of this development could lead to deficiencies on the adult. The efficiency and the kinetic of the maturation process of immune system are not only determined by the genetics but also by environmental factors (Björkstén, 1999) as could be RF-EMF exposure. Genes implicated in the lymphocyte orientation were remanent or persistent whereas they must be repress during the development, due to the influence of environmental factors (Holt, 2000; Prescott et al., 1999). Furthermore, the Specific Absorption Rate values of juvenile population is higher than adults one for similar exposition (Wiert et al., 2011).

This study is the first one studying at the same time, blood parameters, PBMC and lymphoids organs after a chronic RF-EMF exposure. For this, rat model was used owing to similar immune system functioning

The objective of the present study was to analyze the effects on immunologic parameters exposed to low dose chronic exposure to RF-EMF during juvenile period. Rats would be exposed during the end of their immune maturation and parameters such the different immune cells in blood and lymphoid organs but also on different immunities whether innate or adaptive would be observed at the entrance to adulthood. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) (B and T lymphocytes, monocytes, neutrophils, NK) and lymphoid organs (thymus and spleen) were analyzed by flow cytometry and general blood count.

## Material and Methods

### Animals

Experiments were conducted on 48 male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) weighing between 55 and 85 g and aged 3 weeks at the time of their arrival in our facility (Day 1). Two groups of animals were formed: a RF-EMF-exposed group (n=12) and a control, non-exposed group (n=12). Each group was housed in a separate anechoic chamber with a controlled thermoneutral air temperature ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ), 12 hr:12 hr dark/light cycle (lights on at 6 am and off at 6 pm), relative air humidity (mean  $\pm$  standard deviation (SD):  $39\pm 12\%$ ) and air velocity ( $<0.2$  m/s). Rats were individually housed in plastic cages (425 mm x 266 mm x 185 mm) within the chamber. Food (3436EXF12, Serlab, Montataire, France) and water were available *ad libitum*. Daily animal care was performed between 5 pm and 6 pm. Experiments were performed in accordance with the European guidelines (2010/63/EU) and the French governmental decree 2013-118 on the care and use of laboratory animals. The study protocol was approved by the nationally accredited Regional Directorate for Health, Animal and Environment Protection (Amiens, France) and the French Ministry of Research (license number: APAFIS#3735-2016012017118094 v3).

### RF-EMF exposure

The RF-EMF exposure started after 4 days of acclimatization and run all over the 5 weeks of experiments (from Day 5 to Day 41). The climatic chambers were equipped with RF-EMF antennas powered by a generator (model RFS 900–64, RFPA, Artigues-près-Bordeaux, France) emitting a continuous-wave 900 MHz electromagnetic field. Antennas (model 800–10465, KATHREIN-Werke KG, Rosenheim, Germany) were horizontally located in the climatic chamber, 80 cm above the exposed rats' boxes. The power of the generator was set in order to obtain a field intensity of 1.8 V/m. The calculated specific absorption rate of the animals was average to 30 mW/kg after calculation between 3 and 8 weeks on head, body and tail. The level of RF-EMF exposure was checked with a radiofrequency dosimeter (PMM EP600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA) and monitor on computer software (Win EP 600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA). The RF-EMF exposure was running for 23 hours per day, starting 3 days after the animals' arrival and ending on the day of euthanasia. Emission was only interrupted for one hour a day (from 5 pm to 6 pm), during animal care.

## **Protocol**

After 4 days of habituation to housing conditions, animals were exposed (or not) to RF-EMF for 5 weeks (until D41). At D41, the rats were sacrificed by heart puncture under general anesthesia with a mixture of air and 2.5 % isoflurane (Iso-Vet 1000 mg/g, Piramal Healthcare UK Ltd, Morpeth, United-Kingdom), and the blood, spleen and thymus, were collected.

## **Data acquisition and analysis**

### *Blood Count*

One day after the sacrifice, the blood which was left on a wheel overnight, was analyzed by KT-6400 (Genrui Biotech Inc, Shenzhen, China) in order to make general blood count. This analysis gave us White Blood Cell (WBC) number, and leukocytes sub-populations, Red Blood Cells (RBC) number, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), hemoglobin level, hematocrit and platelets numbers.

### *Sample isolation and extraction*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed or exposed animals were separated using gradient separation by Ficoll Pacques Plus© (GE-Healthcare, Little Chalfont, United-Kingdom). Cells were washed in phosphated buffer saline (PBS, Corning, New York, USA) then frozen in fetal bovine serum and dimethylsulfoxide (90% FBS and 10% DMSO) until staining. Splenic and thymic cells were extracted using spleen programs, with M tube, on gentleMACS Octodissociator (Miltenyi Biotec).

### *Flow cytometry analysis*

Before staining, single cells suspensions prepared from the spleen, thymus or PBMC were unfrozen in RPMI medium (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% FBS (Eurobio, Courtaboeuf, France), 2 mM of L-glutamine (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) and 50 U/mL of penicilline-streptomycine (Sigma Aldrich) during three hours. Cells were then stained with fluorochrome-conjugated Antibodies (Abs). The Abs used for flow cytometry analyses were: PE-anti-rat-CD3 (clone REA223), APC-anti-rat-CD4 (clone REA482), FITC-anti-CD8a (clone REA437), FITC-anti-rat-IgM (clone ES26-13D3.4), APC-anti-rat-CD45R (clone REA450), APCVio770-anti-rat-CD45 (clone REA504), FITC-anti-rat-CD161 (clone REA227), APC anti-rat-IgG1 (clone RG11/39.2) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) and CD27-

PE (clone LG3A10) (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). Analyses of lymphoid populations were performed on events gated ( $1 \times 10^5$  viable cells) according to FSC/SSC parameters and values given in percentages of these viable cells. In PBMC, B lymphocytes (activated), T lymphocytes (activated, helper and cytotoxic) and NK cells were studied. B lymphocytes (activated, immature and memory) in spleen and T lymphocytes (naives, double positive, helper and cytotoxic) in thymus were analyzed.

All samples were acquired using a MACSQuantify (Miltenyi Biotec). Cytometry analysis was done on FlowJo v10.2 software.

#### *Statistical analysis*

Data (expressed as the mean  $\pm$  SD) were analyzed using Statview software (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Mann-Whitney tests were applied to probe the effects of RF-EMF and noise exposure parameters. The threshold for statistical significance was set to  $p < 0.05$ .

## Results

### *Effects of RF-EMF on blood parameters*

In order to evaluate the impact of chronic RF-EMF exposure on the homeostasis of blood, a count of leukocytes and various hematological parameters (hemoglobin concentration or red blood cell count, hematocrit...) were realized on blood on exposed and control rats (Table 1). No statistical difference in blood count (white blood cells, lymphocytes, monocytes and neutrophils) has been shown between the control and the RF-EMF exposed groups.

Parameters	Control group	RF-EMF group	Group comparison
Number of WBC ( $10^9/L$ )	11,15±5,76	12,18±5,96	NS
Lymphocytes ( $10^9/L$ )	6,03±3,16	8,77±7,44	NS
Monocytes ( $10^9/L$ )	0,76±0,41	1,05±0,55	NS
Neutrophiles ( $10^9/L$ )	4,35±4,75	4,15±3,05	NS
Number of RBC ( $10^9/L$ )	5,89±0,71	6,00±0,91	NS
Hemoglobin level (g/dL)	14,28±0,66	14,28±2,48	NS
Hematocrit (%)	44,57±3,72	42,34±5,41	NS
RBC volume (fL)	76,22±4,60	73,97±3,19	NS
MCH (pg)	24,86±2,52	23,82±1,70	NS
MCHC (g/dL)	32,62±1,62	32,30±2,08	NS
Blood Platelets ( $10^9/L$ )	1119,58±621,80	1501,97±776,23	NS

Table 1: Blood count parameters (expressed in mean  $\pm$  SD) in the control (n=11) and the RF-EMF (n=11) animals

### *Effects of RF-EMF on blood lymphoid subsets*

In RF-EMF exposed animals, PBMC gated on CD45+ subset, the percentage of activated B lymphocytes (IgG1+) was significantly higher (Figure 1) while the percentage of activated T lymphocytes (CD3+) was lower than in control animals. Mainly on MHC class I subset T

lymphocytes (CD8+) (Figure 1). No variation in the percentage of helper T lymphocytes (CD4+) and the percentage of Natural Killer cells (CD3-/CD161+) was observed.

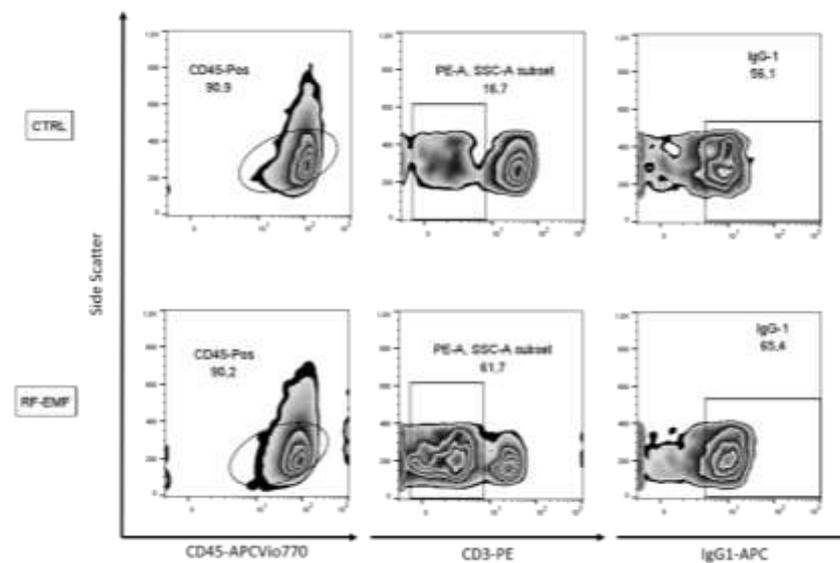


Figure 1: Distributions of active B lymphocytes in rats peripheral blood exposed or non-exposed

	Control group	RF-EMF group	Group comparison
B lymphocytes (CD45+/CD3-/IgG1+ in %)	21.26±8.06	29.91±8.39	*
T lymphocytes (CD45+/CD3+ in %)	59.85±9.79	40.62±18.02	*
Helper T lymphocytes (CD45+/CD3+/MHCII in %)	16.26±5.26	11.98±5.70	NS
Cytotoxic T lymphocytes (CD45+/CD3+/MHCI in %)	35.33±9.59	23.44±11.87	*
Natural Killer (CD45+/CD3-/CD161+%)	9.08±9.41	6.16±3.64	NS

Table 2: Peripheral blood mononuclear cells populations (mean ± SD of CD45 subset) in controls (n=10) and RF-EMF exposed animals (n=9); NS non-significant, \* p≤0.05

### Effects of RF-EMF on spleen B lymphoid subsets

In RF-EMF exposed animals, the percentage of activated B lymphocytes (IgG1+) in spleen was higher than in controls concomitantly with a lower percentage of memory B lymphocytes (CD45R+/CD27+)(Table...et Figure 2). No variation in the percentage of immature B lymphocytes has been observed (IgG1-).

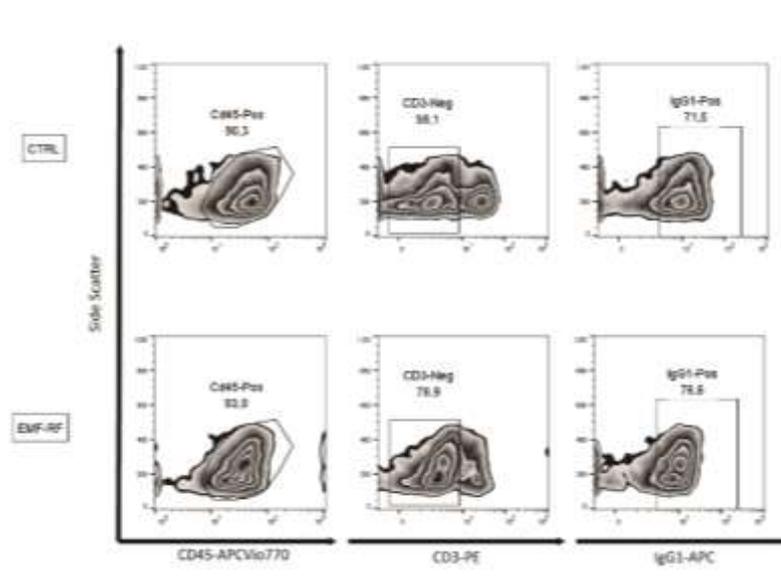


Figure 2: Distributions of activated B lymphocytes in rats spleen exposed or non-exposed

B lymphocytes	Control group	RF-EMF-exposed group	Group comparison
Activated B lymphocytes (CD45+/CD3-/IgG1+, %)	38.16±4.57	51.60±8.68	***
Immatures B lymphocytes (CD45+/CD3-/CD45R+/IgG1-, %)	49.56±3.46	42.58±11.83	NS
Memory B lymphocytes (CD45+/CD3-/CD27+, %)	0.86±0.29	0.25±0.14	***

Table 3: Spleen lymphocytes populations (mean ± SD) in controls (n=) and RF-EMF exposed animals (n=); NS non significant, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

*Effect of RF-EMF on thymus T lymphoid subsets cytometry*

The percentage of naive T lymphocytes in thymus (CD45Ra) was similar in RF-EMF-exposed and control groups. The percentage of double positive cells CD4+/CD8+ T lymphocytes were significantly lower in RF-EMF-exposed group. The percentage of CD4+ committed lymphocytes was higher in RF-EMF-exposed group while CD8+ committed lymphocytes percentage was not significantly modified. (Table 4, Figure 3)

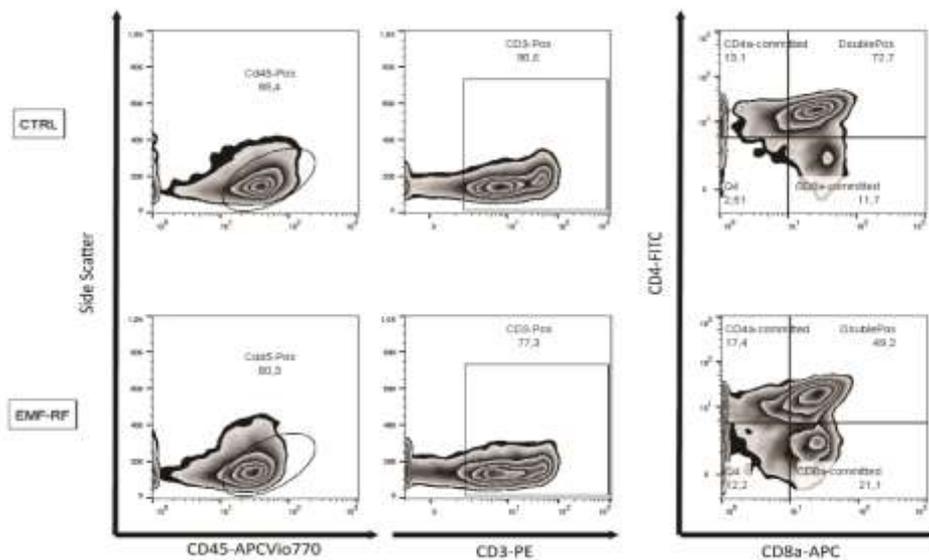


Figure 3: T lymphocytes (CD45+/CD3+), and CD4/CD8 sub population in thymus of exposed or non-exposed.

T lymphocytes	Control group	RF-EMF group	Group comparison
CD4 committed (%)	9.89±1.63	13.09±3.6	* p=0.018
CD8 committed (%)	10.57±1.48	12.05±2.10	NS
Double positive cells CD4+/CD8+ (%)	61.05±4.91	53.27±7.13	* p=0.020
CD45Ra (%)	35.02±4.80	37.51±3.63	NS

Table 4: Thymus lymphocytes populations (mean ± SD) in controls (n=10) and RF-EMF exposed animals (n=9); Mann-Whitney statistical comparisons with control group \* p<0.05

## Discussion

The present study pointed out the effects of chronic exposure to RF-EMF on the main immunological parameters in growing rats. Our results indicate that the 5 weeks long exposure at 900 MHz (1.8 V/m) is associated with either no variation in red blood parameters and innate immunity or disturbances of the adaptive immune system in juvenile rats at 8 weeks of age after 5 weeks of exposure. The exposure was carried out during the juvenile period of the rat during which one the different physiological functions set up. This protocol let us see the effects on the immune system at entry into adulthood.

The hematological parameters and the number of platelets in RF-EMF exposed animals were not modified. These latter results are consistent with previous studies performed in adult mice which show no modification of red blood cells, hemoglobin, mean corpuscular volume, MCH and MCHC after an exposure at 1.9 GHz (6 mW/m<sup>2</sup> for 4 weeks) (Usman et al., 2012). Concerning the platelets, our result contrasted with (Abdel Aziz et al., 2010b) who observed a higher number of platelets in exposed rats (two weeks exposure at 900 MHz). However, their study was performed with a higher intensity (60 to 130 V/m), so that a thermic effect could not be excluded.

Concerning innate immunity, the number of monocytes, neutrophils and Natural Killer cells were not modified, suggesting no affect of the RF-EMF exposure. However, a variation in cellular internal function cannot be excluded. Indeed, an exposure at 900 MHz during 2 hours on *in vitro* leukocyte population rich in monocytes, induced a higher production of Reactive Oxygen Species (Kazemi et al., 2015).

In our study, adaptive sub-populations of lymphocytes were observed. T lymphocytes are in charge of cell immunity. They get mature in the thymus where they will undergo positive and negative selection steps and a commitment into a helper or cytotoxic lineage. In our animals, the percentage of double positive cells (CD4+/CD8+) in the thymus of RF-EMF exposed animals is lower than in control. Concerning the commitment of the T lymphocytes,

a higher percentage of CD4+ T lymphocytes has been observed in RF-EMF exposed animals despite no modification in the CD8+ T lymphocytes. The lower number of double positive cells, accompanied by a higher number of CD4+ committed cells and a non-variation of CD8+ committed cells, indicates that the RF-EMF exposure led to an orientation of the T lymphocytes, with a preferential helper lineage commitment. This caused a variation in the ratio CD4/CD8, in favor of an activation of the immune system. This result and the lower percentage of the T lymphocytes in the thymus could also be one explanation for the lower percentage of the cytotoxic lymphocytes in blood. Indeed, the percentage of activated and cytotoxic T lymphocytes in the blood of the RF-EMF exposed animals was lower than in controls. Compare to literature, the lower percentage CD4+/CD8+ cells in our study was not consistent with a previous study which exposed newborn mice to Wi-Fi (2.45 GHz at 0.08 and 4 W/kg, 2 hr/day, 5 days/week, first five weeks of life) where the number of CD4+/CD8+ cells or mature T lymphocytes did not change (Sambucci et al., 2011). This contrasting result could be due to difference of the “window” of the exposure but also of the measure, our animals being 3-weeks older than this study. Indeed, compared to them, our animals were barely mature, immune maturity being observed after 4-6 weeks (Landreth, 2002). The decrease in the number of T lymphocytes could lead to a lower performance in the management of viral infected cells but also of deviant cells such as cancer cells. However, no tumor was found in the organs of the exposed animals.

The lower number of activated T lymphocytes was found concomitantly with the higher number of activated B lymphocytes and thus explained why in the total number of lymphocytes in general blood count remained unchanged in RF-EMF exposed animals.

Concerning B lymphocytes, naives B lymphocytes are non-specific cells that can be activated by helper T lymphocytes. Memory B lymphocytes are cells that have previously been activated and that are specific for a given antigen. Finally activated B cells are cells specifically activated for an antigen and capable to produce immunoglobulins directed against that antigen. In our results, the percentage of the memory B cells was lower in spleen of RF-EMF animals while the activated B lymphocytes percentage was higher in the spleen and in the blood. This last result coupled with the indirect diminution of the helper T lymphocytes previously mentioned could be an indicator of the activation of the B lymphocytes. The higher

value of the activated B lymphocytes was not consistent with the literature. Indeed, the differentiation of the B cells in the spleen was not altered after a 900 MHz exposure (2 hr/day for 4 consecutive weeks at 2 W/kg) on mice model (Nasta et al., 2006). Moreover, the level of antigen-specific antibody did not change. In another study, a daily whole body exposure to 900 MHz on C57BL/6 mice during 2 h/day (for 1, 2 or 4 weeks) did not show any alteration of the sub-populations of the B lymphocytes in the spleen (Gatta et al., 2003). However, this study was performed on shorter exposure and this could explain the contrasting results. In our protocol, a RF-EMF exposure led to an increase in B lymphocytes activation and so an increase in humoral immunity. This humoral immunity could be the sign of increase pathogen sensitivity, or increase of pathogens defense. To confirm these results, cytokines and immunoglobulins dosage would be interesting to analyze. Transcriptomics studies could also help us to better understand which activation way was impacted.

As shown with our results, RF-EMF exposure during the end of maturation period causes humoral immunity activation and higher helper lymphocytes commitment in adult subjects. Literature showed that environmental factors may influence lymphocyte orientation due to activation or inhibition of genes. In addition, it has been shown that when exposed to 835 MHz (4W/kg, 5 hr/d, 12 weeks), autophagic genes (LC3B-II and Beclin1) were activated (Kim et al., 2017b). It is therefore possible that the alterations observed in our study is the consequence of gene dysregulation.

## Conclusion

Given the results of this study, it appears that chronic exposure to RF-EMF (900 MHz, 1.8 V/m for 5 weeks) during juvenile period causes no variation in red blood and innate immunity parameters while adaptive immunity is impacted. This disturbance in adaptive immunity results in a redistribution of the lymphocyte subpopulations.

T-cells were found at lower propensities in exposed animals and exhibited variation in thymic differentiation with higher helper T lymphocytes commitment. RF-EMF exposure seemed to lead to a predisposition for the helpers lymphocytes but also caused a lower percentage of the cytotoxic lymphocytes and so dysregulate the helper/cytotoxic lymphocytes ratio. A decrease in the amount of cytotoxic T lymphocytes could lead to a poorer response to infected cells or to deviant cells such as cancer cells.

Concerning B lymphocytes, an increase of activated cells in the blood and in the spleen was observed, which was concomitant with a decrease in memory cells. There is thus an activation of humoral immunity. This increase of the humoral activation could be the sign of an increase of pathogen entrance or could predispose to autoimmune diseases. It would be interesting to see in the future what were the antibodies produced by these lymphocytes and what were the activating antigens.

## Bibliography

Abdel Aziz, I., El-Khozondar, H., Shabat, M., Elwasife, K., and Mohamed-Osman, A. (2010). Effect of electromagnetic field on body weight and blood indices in albino rats and the therapeutic action of Vitamin C or E. *20*, 235–244.

Björkstén, B. (1999). Environment and infant immunity. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 729–732.

Bouji, M., Lecomte, A., Hode, Y., de Seze, R., and Villégier, A.-S. (2012). Effects of 900MHz radiofrequency on corticosterone, emotional memory and neuroinflammation in middle-aged rats. *Experimental Gerontology* 47, 444–451.

Chagnaud, J.L., and Veyret, B. (1999). In vivo exposure of rats to GSM-modulated microwaves: flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations and of mitogen stimulation. *Int J Radiat Biol* 75, 111–113.

Dmoch, A., and Moszczyński, P. (1998). Levels of immunoglobulin and subpopulations of T lymphocytes and NK cells in men occupationally exposed to microwave radiation in frequencies of 6-12 GHz. *Med Pr* 49, 45–49.

Gangi, S., and Johansson, O. (2000). A theoretical model based upon mast cells and histamine to explain the recently proclaimed sensitivity to electric and/or magnetic fields in humans. *Medical Hypotheses* 54, 663–671.

Gatta, L., Pinto, R., Ubaldi, V., Pace, L., Galloni, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2003). Effects of in vivo exposure to GSM-modulated 900 MHz radiation on mouse peripheral lymphocytes. *Radiat. Res.* 160, 600–605.

Genuis, S.J., and Lipp, C.T. (2012). Electromagnetic hypersensitivity: fact or fiction? *Sci. Total Environ.* 414, 103–112.

Hancı, H., Türedi, S., Topal, Z., Mercantepe, T., Bozkurt, I., Kaya, H., Ersöz, Ş., Ünal, B., and Odacı, E. (2015). Can prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field affect the morphology of the spleen and thymus, and alter biomarkers of oxidative damage in 21-day-old male rats? *Biotech Histochem* 90, 535–543.

Holt, P.G. (2000). Key Factors in the Development of Asthma: Atopy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161, S172–S175.

Kazemi, E., Mortazavi, S.M.J., Ali-Ghanbari, A., Sharifzadeh, S., Ranjbaran, R., Mostafavi-pour, Z., Zal, F., and Haghani, M. (2015). Effect of 900 MHz Electromagnetic Radiation on the Induction of ROS in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Biomed Phys Eng* 5, 105–114.

Kim, J.H., Yu, D.-H., Huh, Y.H., Lee, E.H., Kim, H.-G., and Kim, H.R. (2017). Long-term exposure to 835 MHz RF-EMF induces hyperactivity, autophagy and demyelination in the cortical neurons of mice. *Sci Rep* 7.

Knave, B.G., Wibom, R.I., Voss, M., Hedstrom, L.D., and Bergqvist, U.O. (1985). Work with video display terminals among office employees. I. Subjective symptoms and discomfort. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 11, 457–466.

Landreth, K. (2002). Critical Windows in the Development of the Rodent immune system. *Human & Experimental Toxicology* 493–498.

Lantow, M., Lupke, M., Frahm, J., Mattsson, M.-O., Kuster, N., and Simko, M. (2006). ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics* 45, 55–62.

Laudisi, F., Sambucci, M., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Altavista, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2012). Prenatal exposure to radiofrequencies: effects of WiFi signals on thymocyte development and peripheral T cell compartment in an animal model. *Bioelectromagnetics* 33, 652–661.

Nasta, F., Prisco, M.G., Pinto, R., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2006). Effects of GSM-modulated radiofrequency electromagnetic fields on B-cell peripheral differentiation and antibody production. *Radiat. Res.* 165, 664–670.

Prescott, S.L., Macaubas, C., Smallacombe, T., Holt, B.J., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1999). Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *The Lancet* 353, 196–200.

Prisco, M.G., Nasta, F., Rosado, M.M., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2008). Effects of GSM-Modulated Radiofrequency Electromagnetic Fields on Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 170, 803–810.

Sambucci, M., Laudisi, F., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Altavista, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2010). Prenatal Exposure to Non-ionizing Radiation: Effects of WiFi Signals on Pregnancy Outcome, Peripheral B-Cell Compartment and Antibody Production. *Radiation Research* 174, 732–740.

Sambucci, M., Laudisi, F., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Lopresto, V., Altavista, P., Marino, C., and Pioli, C. (2011). Early life exposure to 2.45GHz WiFi-like signals: Effects on development and maturation of the immune system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 393–398.

Santini, R., Santini, P., Danze, J.M., Le Ruz, P., and Seigne, M. (2002). Investigation on the health of people living near mobile telephone relay stations: I/Incidence according to distance and sex. *Pathol. Biol.* 50, 369–373.

Seitz, H., Stinner, D., Eikmann, T., Herr, C., and Röösl, M. (2005). Electromagnetic hypersensitivity (EHS) and subjective health complaints associated with electromagnetic fields of mobile phone communication—a literature review published between 2000 and 2004. *Science of The Total Environment* 349, 45–55.

Tuschl, H., Novak, W., and Molla-Djafari, H. (2006). In vitro effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells. *Bioelectromagnetics* 27, 188–196.

Usman, A.D., Ahmad, W.W., Ab Kadir, M.Z.A., Mokhtar, M., and Ariffin, R. (2012). Effect of radiofrequency electromagnetic field exposure on hematological parameters of mice. *World Applied Sciences Journal* 16, 656–664.

Wiert, J., Hadjem, A., Varsier, N., and Conil, E. (2011). Numerical dosimetry dedicated to children RF exposure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 421–427.

Yuan, Z.-Q., Li, F., Wang, D.-G., Wang, Y., and Zhang, P. (2004). Effect of low intensity and very high frequency electromagnetic radiation on occupationally exposed personnel. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 22, 267–269.

Etude 4 : Impacts d'une co-exposition entre les champs électromagnétiques de type radio fréquence et une contrainte sonore de haute intensité sur le système immunitaire de rats juvéniles

## Résumé

Une co-exposition entre les champs électromagnétiques de type radiofréquence (900 MHz) et une contrainte sonore de haute intensité induit des modifications de l'immunité innée et de l'immunité adaptative à travers une redistribution des sous-populations de lymphocytes

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire Hématim (UPJV – Amiens).

### ***Introduction***

L'exposition aux champs électromagnétiques a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. Cependant, les impacts d'une telle contrainte restent incertains sur le système immunitaire. Dans un tel contexte, les effets de l'exposition chronique aux champs électromagnétiques pendant la période de développement de l'organisme sont encore sujets à débat. Pour cela, une deuxième contrainte environnementale, le bruit, a été ajoutée afin de voir une exacerbation possible des effets des CEM.

### ***Matériel et méthodes***

48 rats Wistar, répartis en quatre groupes de 12 ont été (ou non selon leur groupe) exposés à un champ électromagnétique et/ou à une nuisance sonore pendant 5 semaines. L'exposition, d'une durée de 23 heures par jour, avait une fréquence de 900 MHz, une intensité de 1,8 V/m et un DAS de 30 mW/kg. La contrainte sonore était de 11 heures par jour pendant la période diurne, à une intensité de 87,5 dB. A la suite des 5 semaines d'exposition, les animaux ont été sacrifiés par ponction intracardiaque afin de récupérer le sang. Le jour suivant, une numération de la formule sanguine était réalisée avant que les PBMC ne soient séparés à l'aide d'un gradient de Ficoll. La rate et le thymus ont également été collectés, puis les cellules dissociées avant d'être congelées. Suite à leur décongélation, les cellules ont été marquées et comptées par cytométries en flux.

### ***Résultats***

Lors d'une exposition aux CEM, les paramètres sanguins des globules rouges (pourcentage, hémocrite, taux d'hémoglobine...) et des globules blancs (pourcentage des neutrophiles, monocytes et lymphocytes) ne sont pas impactés. Les lymphocytes T activés et les lymphocytes T cytotoxiques étaient diminués au niveau du sang tandis que les lymphocytes T helper ne présentaient pas de variation. Dans le thymus des rats exposés aux CEM, le

pourcentage de cellules double positif (CD4+/CD8+) était plus petit, tandis que les pourcentages de cellules CD4+ était plus grand. Les pourcentages de cellules CD8+ et de cellules naïves étaient inchangés. Les lymphocytes B activés étaient augmentés, aussi bien dans le sang qu'au niveau de la rate, le pourcentage de lymphocytes B activé était plus élevé, tandis que les lymphocytes B mémoires étaient moins nombreux et les lymphocytes B immatures inchangés par l'exposition aux CEM.

Les animaux exposés au bruit présentaient une augmentation du pourcentage de monocytes tandis que l'ensemble des autres paramètres sanguins restait inchangé. Au niveau des PBMC, le pourcentage de lymphocytes T et celui de lymphocytes T cytotoxiques étaient plus petit sans variation du pourcentage de lymphocytes T helper. Le thymus ne présentait pas de variation dans des sous-populations lymphocytaires T. Au niveau de la rate, seul le pourcentage de lymphocytes B immatures était plus faible, le pourcentage de lymphocytes B ne montrant pas de variation.

Enfin les animaux co-exposés présentaient au niveau sanguin, un nombre plus important de globules blanc ainsi que de neutrophiles. Le nombre de plaquettes était également plus important. Les lymphocytes B des PBMC étaient significativement plus nombreux tandis que le nombre de lymphocytes B mémoire était plus faible dans les rates des animaux exposés aux CEM. Les pourcentages des lymphocytes T, toute population confondue (activés, helper et cytotoxiques), étaient plus faibles dans les PBMC des animaux exposés aux CEM par rapport aux animaux contrôles. Aucune variation n'était observable au niveau des sous-populations lymphocytaires T du thymus.

### ***Discussion***

Aucune variation des globules rouges n'a été observée quelque soit le type d'exposition. Les résultats des animaux exposés au bruit sont en contradiction avec la littérature dans laquelle une exposition professionnelle (85 dB pendant quatre ans) ou expérimentale (20 dB, 1100 Hz pendant 20 jours), a entraîné une augmentation du nombre de globules rouges et d'hématocrite (Mohammadi et al., 2016; Sabahi and Moradi, 2002).

De même, les animaux exposés aux CEM avaient des résultats contradictoires avec la littérature où une exposition chronique aux CEM avait induit des variations hématologiques (Abdel Aziz et al., 2010a). Lors d'une exposition chronique l'exposition aux CEM entraîne une

variation transitoire avant de revenir à une valeur basale un mois après le début de l'exposition (Usman et al., 2012). Dans notre étude, l'absence d'effet pourrait être due au renouvellement des globules rouges (estimée entre 30 et 60 jours chez les Wistar). Les effets de la CEM et/ou du bruit sur les globules rouges pourraient ainsi être atténués après la première génération.

Concernant l'immunité innée, le nombre de monocytes était plus élevé dans le groupe exposé au bruit que dans le groupe contrôle alors que le nombre de globules blancs, de cellules NK et de neutrophiles demeurait inchangé. Ces résultats ont indiqué une altération de l'immunité innée suite à une exposition au bruit. Comme indiqué dans l'étude précédente, l'immunité innée n'est pas impactée lors d'une exposition aux CEM, comme l'indique l'absence de variation du nombre de cellules NK, de monocytes et de neutrophiles.

Enfin, dans le groupe co-exposé, le nombre de globules blancs était plus élevé que dans le groupe témoin. Cette augmentation était due à un plus grand nombre de neutrophiles. En revanche, les cellules NK et les monocytes n'étaient pas été modifiés. Sur la base de ces résultats, il apparaît que la co-exposition modifie l'immunité innée. Cette augmentation du nombre de neutrophiles pourrait entraîner une augmentation de l'activité phagocytaire ou du chimiotactisme. Des analyses complémentaires seraient à effectuer afin de déterminer la nature de ces changements.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'immunité adaptative. Pour cela, nous avons examiné les différentes sous-populations de lymphocytes, à la fois au niveau central avec la rate et le thymus, et au niveau périphérique.

Les animaux exposés au bruit n'ont montré aucune variation des lymphocytes B activés dans le sang et la rate. Seul le nombre de lymphocytes B immature était diminué. Cependant, les pourcentages de lymphocytes T activés et de lymphocytes T cytotoxiques au niveau périphérique étaient plus faibles que chez les animaux témoins. Aucun changement dans les lymphocytes T n'a été observé au niveau du thymus. Ainsi, il semble dans notre étude que l'exposition au bruit induise uniquement des variations périphériques sans effet sur les sous-populations des organes lymphoïdes.

Dans le groupe exposé aux CEM, le plus petit nombre de lymphocytes B mémoires et le plus grand nombre de lymphocytes B activés dans la rate et le sang indiquaient une plus

grande activation des lymphocytes. Le nombre de lymphocytes T activés est la conséquence de la moins grande quantité de lymphocytes T cytotoxiques au niveau sanguin chez les animaux exposés aux CEM. Au niveau central, les animaux exposés aux CEM avaient un plus faible pourcentage de cellules double positif (CD4+/CD8+) et un nombre de cellules CD4+ plus important. Ainsi, l'exposition CEM semble favoriser l'engagement des lymphocytes T vers les lymphocytes T helpers. Il semble donc que l'exposition aux CEM conduise à une modification de l'immunité adaptative à la fois au niveau périphérique et central.

Enfin, dans le groupe co-exposé, un plus grand pourcentage de lymphocytes B activés périphériques a été observé. Ceci pourrait être la conséquence du petit nombre de lymphocytes B mémoire qui ont été réactivés. Bien que ces résultats semblaient être des effets liés aux CEM, il est également apparu que la co-exposition induisait des atteintes périphériques et non au niveau centrale. En ce qui concerne les lymphocytes T, un effet synergique des expositions au bruit et RF-EMF a été observé chez les animaux co-exposés, avec une plus faible valeur du pourcentage de lymphocytes T (activés, helper et cytotoxiques) par rapport au groupe contrôle. D'autre part, aucune variation des lymphocytes T n'a été trouvée au niveau central. Comme le montrent les lymphocytes B, il semble que seule la co-exposition ait conduit à des variations périphériques.

**Authors:**

BOSQUILLON de JENLIS Aymar<sup>1\*</sup>, COLLET Louison<sup>2\*</sup>, DELANAUD Stéphane<sup>1</sup>, OULED-HADDOU Hakim<sup>2</sup>, GARCON Loic<sup>2</sup>, BACH Véronique<sup>1</sup>, MAROLLEAU Jean-Pierre<sup>2\*</sup>, PELLETIER Amandine <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>PériTox, Périnatalité & Risques Toxiques, UMR-I 01 INERIS, Picardie Jules Verne University, Amiens, France

<sup>2</sup>Hématim, Picardie Jules Verne University, Amiens, France

\* authors worked equivalently on this work

**Keywords:** RF-EMF, noise, chronic exposure, juvenile rat, immunity

## Abstract

**Objective:** the electromagnetic fields exposure significantly increased over the past few decades. However, the impact of such constraint remain uncertain on immune system despite the first elements of research. In such context, the effects of chronic RF-EMF exposure during the developing period of the organism are still subject to debate. For this a second environmental constraint, the noise, was added to see a possible exacerbation of RF-EMF effects.

**Methods:** Forty-eight 3-week-old male Wistar rats were exposed to electromagnetic fields (900 MHz, 1.8 V/m 23hr/day) and/or high level noise (87.5 dB) for 5 weeks. After the exposure protocol, blood, spleen and thymus were collected in order to analyze blood count and lymphocytes sub-populations.

**Results:** Red blood parameters were not altered by RF-EMF and/or noise exposure. Platelets number which was not modified by single exposure, was significantly higher in co-exposed group. White blood cells, which were modified in RF-EMF-exposed group and which presented only monocytes increase in noise-exposed group were higher in co-exposed group due to higher number of neutrophils. Whatever the type of exposure, lower T lymphocytes due to lower cytotoxic lymphocytes were observed in blood cytometry. Lower T lymphocytes compensate higher B lymphocytes in RF-EMF-exposed groups. Conversely to RF-EMF-exposed group which present CD4+ commitment and B lymphocytes activation in spleen, co-exposed thymus and spleen were not impacted.

**Conclusion:** Red blood cells parameters had no variation whatever the type of exposure. The number of platelets was higher in the co-exposed group. Innate immune system, which was not impacted in RF-EMF group had higher monocytes for noise-exposed group and higher neutrophils for co-exposed.

In adaptive immunity, RF-EMF induced lower cytotoxic T lymphocyte while helper commitment was higher and B lymphocytes were activated. Noise exposed group had similar results but only on peripheral blood without impacts on lymphoid organs. Finally, co-exposed animals had higher activated B lymphocytes, lower helper and cytotoxic T lymphocytes indicating humoral immunity activation.

## Introduction

Electromagnetic fields have seen their development and democratization over the past century. With the discoveries allowing the use of these electromagnetic fields for the industry, for the communications or for the medical examinations, the sources of electromagnetic fields radiofrequency type (RF-EMF) have multiplied. The most concrete example is mobile telephony, which uses RF-EMF when connecting the telephone and the phone base station. These phone base stations generate, by the large number of them distributed on the territory, an electromagnetic. However, the electromagnetic fields have not yet been incriminated as responsible for direct effects on the body. This link would explain the symptoms of two distinct populations, the electro-hypersensitive people and the neighborhood of phone base stations (Santini et al., 2002). These populations complain of various symptoms (sleep disturbances, headache, skin itching...), which they attribute to RF-EMF in the case of electro-hypersensitive people syndrome (Knave et al., 1985; Seitz et al., 2005). Among various hypotheses, studies finding mastocytes degranulation or using Toxicant-Induced-Loss-of-Tolerance logic, questioned about immune system (Gangi and Johansson, 2000; Genuis and Lipp, 2012b). Thereby, a 6 to 12 GHz exposure led to higher concentration of IgG and IgA but also to higher number of lymphocytes and cytotoxic lymphocytes in exposed adults (Dmoch and Moszczyński, 1998). Another professional exposure at 170 MHz presented higher levels of IgM and IgG were significantly higher while no variation in IgA level (Yuan et al., 2004b). However other human studies, working on blood, did not find modification in cytokines, antibody and reactive oxygen species after acute RF-EMF exposure (Lantow et al., 2006; Tuschl et al., 2006). In rodents, acute or chronic exposure (respectively 2 hours and 5 weeks, at 900 MHz) did not show immune alteration especially in lymphocyte populations (Gatta et al., 2003; Laudisi et al., 2012; Sambucci et al., 2010, 2011).

Due to the lack of consensus on the effects of the RF-EMF exposure on the immune system, our hypothesis is to combine this exposure with a second environmental constraint, the noise, in order to exacerbate the effects.

Regarding noise impacts, apart their auditory effects on hearing, it has been proved a number of extra-auditory effects, on sleep (Ohrstrom, 2000), on cardiovascular system (Babisch, 2011)... It has also been shown that noise can act on the immune system. Thus people working in airports have shown an increased in the prevalence of viral and bacterial

infections (Branco Castelo, 1999) and increase of cytokines such as IL-12 and IL-6 (Kim et al., 2017a; Münzel et al., 2017). In rodent model, a 8 months 90 dB exposure lead to a decrease of T cells, involving both helper and cytotoxic lymphocytes, but also a decrease of IgM+ B lymphocytes (Aguas et al., 1999).

However, these studies are working on the effects that these constraints may have separately, without looking at the effects of a co-exposure of the two. To our knowledge, only one epidemiological study has studied these two parameters (Martens et al., 2018) but presented no effect of RF-EMF exposure. In addition, studies were conducted on adult subjects. However, the juvenile population is a vulnerable population due to the establishment and maturation of physiological functions making its immune system less effective to respond at pathogens entrance. Moreover, a child's Specific Absorption Rate of RF-EMF is greater than that of an adult for a similar exposure (Wiert et al., 2011).

The objective of the present study was to analyzing the effects of long term chronic exposure to co-exposure RF-EMF and noise constraints on immunologic parameters during the juvenile period. General blood count, peripheral mononuclear blood cells (PBMC), cytometry and lymphoid organs were analyzed.

## **Mterial and methods**

### **Animals**

Experiments were conducted on 48 male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) weighing between 55 and 85 g and aged 3 weeks at the time of their arrival in our facility (day (D)1). Four groups of animals were formed: a RF-EMF-exposed group (n=12), a noise-exposed group (n=12), a co-exposed to noise and RF-EMF group (n=12) and a control, non-exposed group (n=12). Each group was housed in a separate anechoic chamber with a controlled thermoneutral air temperature ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), 12 hr:12 hr dark/light cycle (lights on at 6 am and off at 6 pm), relative air humidity (mean  $\pm$  standard deviation (SD):  $39\pm 12\%$ ) and air velocity ( $<0.2$  m/s). Rats were individually housed in plastic cages (425 mm x 266 mm x 185 mm) within the chamber. Food (3436EXF12, Serlab, Montataire, France) and water were available *ad libitum*. Daily animal care was performed between 5 pm and 6 pm without exposure. Experiments were performed in accordance with the European guidelines (2010/63/EU) and the French governmental decree 2013-118 on the care and use of laboratory animals. The study protocol was approved by the nationally accredited Regional Directorate for Health, Animal and Environment Protection (Amiens, France) and the French Ministry of Research (license number: APAFIS#3735-2016012017118094 v3).

### **RF-EMF exposure**

The climatic chambers were equipped with RF-EMF antennas powered by a generator (model RFS 900–64, RFPA, Artigues-près-Bordeaux, France) emitting a continuous-wave 900 MHz electromagnetic field. Antennas (model 800–10465, KATHREIN-Werke KG, Rosenheim, Germany) were horizontally located in the climatic chamber, 80 cm above the exposed rats' boxes. The power of the generator was set in order to obtain a field intensity of 1.8 V/m. The Specific Absorption Rate of the animals was estimated at 30 mW/kg. The level of EMF-RF exposure was checked with a radiofrequency dosimeter (PMM EP600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA) and monitor on computer software (Win EP 600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA). The RF-EMF exposure was running for 23 hours per day (6 pm to 5 pm), starting 3 days after the animals' arrival and ending on the day of euthanasia.

## **Noise exposure**

Exposed animals were subjected to a 24 hr soundtrack divided into two main periods: a noise-free dark period from 5 pm to 6 am, and a noisy light period (the rat's rest period) from 6 am to 5 pm. The high-level noise exposure was therefore temporarily interrupted during handling and during plethysmographic measurements (between 5 pm and 6 pm, when the intensity of the background noise was 65 dB).

The noise exposure period was split into 10 min segments, each of which had a unique combination of noise type, frequency and intensity. The noise types were urban sounds (traffic, roadworks, sirens, etc.), music, and artificial sounds (white noise, red noise, sinusoids, etc.). The mean  $\pm$  SD (range) sound level was  $87.5 \pm 3.7$  dB (59–111). The frequencies ranged from 50 to 20,000 Hz. To avoid habituation, four different 24 hr noise exposure files were built out of 10-minute segments arranged in a pseudo-random order. Each day's noise exposure file was chosen in a pseudo-random manner. The noise was regulated by an amplifier (Combo 130, Audiophony Hit Music SAS, Fontanes, France) and delivered through loudspeakers (K50-8 Ohm, JBSsystems, Groot-Bijgaarden, Belgium).

## **Protocol**

After 4 days of habituation to housing conditions, animals were exposed (or not) to RF-EMF and/or noise for 5 weeks (until D41). At D41, the rats were sacrificed by heart puncture under general anesthesia with a mixture of air and 2.5% isoflurane (Iso-Vet 1000 mg/g, Piramal Healthcare UK Ltd, Morpeth, United-Kingdom), and the blood, spleen and thymus were collected.

## **Data acquisition and analysis**

### *Blood Count*

One day after the sacrifice, the blood which was left on a wheel overnight and was analyzed by KT-6400 (Genrui Biotech Inc, Shenzhen, China) in order to make general blood count (White Blood Cell (WBC) number, leukocytes sub-populations, Red Blood Cells (RBC) number, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), hemoglobin level, hematocrit and platelets numbers).

### ***Sample isolation and extraction***

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from non-exposed or exposed were separated using gradient separation by Ficoll Pacques Plus® (GE-Healthcare, Little Chalfont, United-Kingdom). Cells were washed in phosphated buffer saline (PBS, Corning, New York, USA) then frozen in fetal bovine serum and dimethylsulfoxide (90% FBS and 10% DMSO) until staining. Splenic and thymic cells were extracted for spleen or thymus using spleen programs, with M tube, on gentleMACS Octodissociator (Miltenyi Biotec).

### ***Flow cytometry analysis***

Before staining single cells suspension prepared from the spleen, thymus, or PBMC were unfrozen in RPMI medium (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) supplemented with 10% FBS (Eurobio, Courtaboeuf, France), 2mM L-glutamine (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) and 50U/mL of penicillin-streptomycin (Sigma Aldrich) for three hours. Cells were then stained with fluorochrome-conjugated Abs. The following Abs were used for flow cytometry analysis: PE-anti-rat-CD3 (clone REA223), APC-anti-rat-CD4 (clone REA482), FITC-anti-CD8a (clone REA437), FITC-anti-rat-IgM (clone ES26-13D3.4), APC-anti-rat-CD45R (clone REA450), APCVio770-anti-rat-CD45 (clone REA504), FITC-anti-rat-CD161 (clone REA227), APC, anti-rat-IgG1 (clone RG11/39.2) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) and CD27-PE (clone LG3A10) (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). All sample were acquired using a MACSQuantify (Miltenyi Biotec). Cytometry analysis was performed on FlowJo v10.2 software.

PBMC cytometry was performed on 10 of 12 animals and only 9 of RF-EMF-exposed group was usable. Spleen cytometry was performed on 10 of the 12 animals of each group. Thymus cytometry was performed on 10 of the 12 animals but only 9 of RF-EMF-exposed and 6 of noise exposed group were usable.

### ***Statistical analysis***

Data (expressed as the mean  $\pm$  SD) were analyzed using Statview software (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Mann-Whitney statistical test were performed. The threshold for statistical significance was set to  $p < 0.05$ .

## Results

### Results

#### *General Blood Count (Table 2)*

In the **noise-exposed** group, animals had a higher monocytes count compared to controls, while the other parameters (neutrophils, lymphocytes and red blood cells parameters and platelets) were unchanged.

**RF-EMF**-exposed animals had no variation in general blood count parameters.

In contrast, **co-exposed** animals had a higher number of WBC compare to controls and noise-exposed group. This higher number was due to a higher number of neutrophils compared to controls and RF-EMF and noise groups while lymphocytes and monocytes number were unchanged. The co-exposed group had a higher number of platelets compare to controls. No variation in red blood cells parameters in co-exposed animals has been observed.

Parameters	Control group	RF-EMF-exposed group	Noise-exposed group	Co-exposed group
Number of WBC ( $10^9/L$ )	11.15±5.76	12.18±5.96#	13.53±3.63 ##	16.74±3.26 *
Lymphocytes ( $10^9/L$ )	6.03±3.16	8.77±7.44	7.29±2.06	7.11±4.27
Monocytes ( $10^9/L$ )	0.76±0.41	1.05±0.55	1.28±0.41 **	1.24±0.60
Neutrophiles ( $10^9/L$ )	4.35±4.75	4.15±3.05#	4.99±2.75 ##	8.39±3.40 *
Number of RBC ( $*10^9/L$ )	5.89±0.71	6.00±0.91	5.70±1.08	5.58±0.80
Hemoglobin level (g/dL)	14.28±0.66	14.28±2.48	15.20±1.16	14.78±0.95
Hematocrit (%)	44.57±3.72	42.34±5.41	42.56±6.85	43.14±3.59
RBC volume (fL)	76.22±4.60	73.97±3.19	75.43±7.51	78.47±7.88
MCH (pg)	24.86±2.52	23.82±1.70	27.72±7.28	26.91±3.24
MCHC (g/dL)	32.62±1.62	32.30±2.08	36.57±7.25	34.42±2.72
Blood Platelets ( $10^9/L$ )	1119.58±621.80	1501.97±776.23 #	1180.27±710.91	1974.35±473.42 **

Table 1: Blood count parameters (mean ± SD) in controls (n=11), RF-EMF exposed (n=11) noise-exposed (n=12) and co-exposed (n=12) animals. Statistical comparisons with control group: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $0.5 < p < 0.01$ , \*\*\*  $0.01 < p < 0.001$ ; statistical comparisons with co-exposed group: #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ ; WBC: white blood cells, RBC: red blood cells, MCH: mean corpuscular hemoglobin MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration

*PBMC cytometry* (Table 2 and Figure 1)

**Noise-exposed** animals had a lower percentage of T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes. The percentage of B lymphocytes and NK cells were stable in the noise exposed animals compared to controls.

In **RF-EMF exposed** group compare to controls, the percentage of B lymphocytes was higher while the percentages of T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes were lower than in control animals. The percentage of NK cells was not modified by a single RF-EMF exposure.

In the **co-exposed** group, a higher percentage of B lymphocyte percentages and a lower percentage of T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes were observed without modification of the percentage of NK cells. However, unlike animals exposed only to RF-EMF, the animals exposed to noise and RF-EMF had a lower percentage of helper lymphocytes compare to controls.

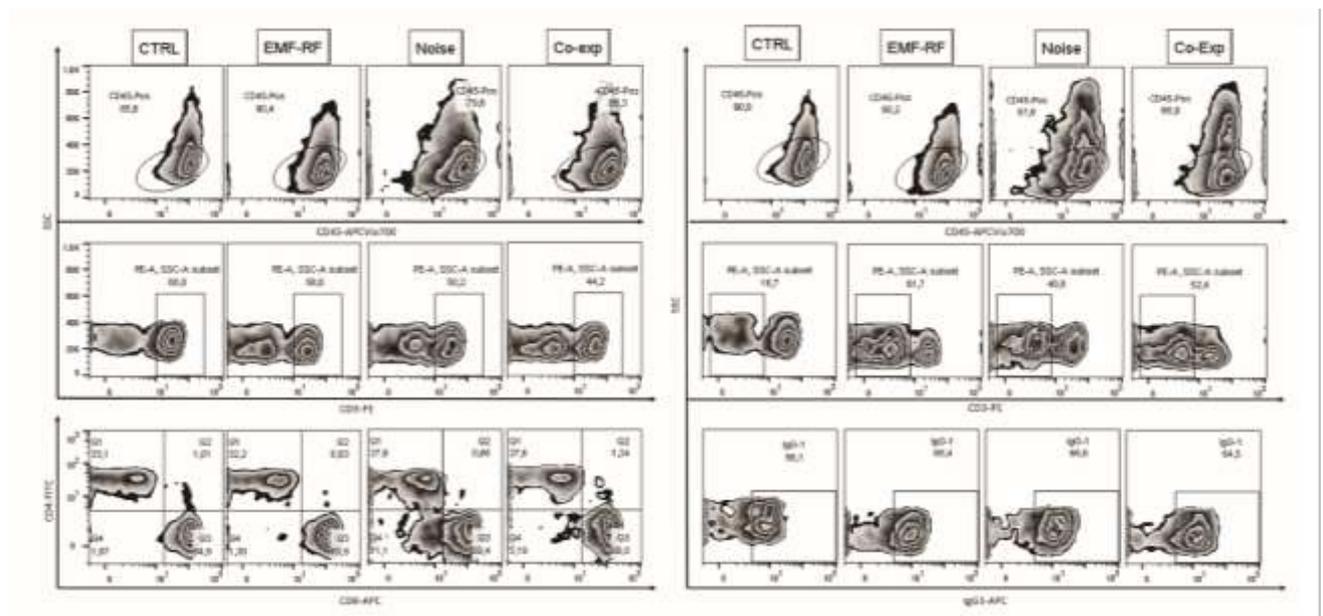


Figure 1 : Representation of populations of T (left) and B (right) lymphocytes (mean  $\pm$  SD) of CD45 subset for one rat of each group

	Control group	RF-EMF-exposed group	Noise-exposed group	Co-exposed group
B lymphocytes (CD45+/CD3-/IgG1+, %)	21.3±8.1	29.9±8.4 *	28.3±7.0	30.3±6.5 *
T lymphocytes (CD45+/CD3+, %)	59.9±9.8	40.6±18.0 *	43.7±14.5 *	36.5±12.4 ***
Helper T lymphocytes (CD45+/CD3+/HCMII, %)	16.3±5.3	12.0±5.7	11.3±4.6	10.4±2.9 *
Cytotoxic T lymphocytes (CD45+/CD3+/HCMI, %)	35.353±9.6	23.5±11.9 *	21.1±11.3 *	18.3±10.9 **
Natural Killer (CD45+/CD3-/CD161+, %)	9.1±9.4	6.2±3.6	5.0±2.3	10.9±10.0

Table 2: PBMC populations (mean ± SD) of CD45 subset in controls (n=10), RF-EMF exposed (n=9), noise exposed (n=10) and co-exposed (n=10) animals. Statistical comparisons with control group \* p<0.05, \*\* 0.5<p<0.01, \*\*\* 0.01<p<0.001, statistical comparisons with co-exposed group: # p<0.05; ## p<0.01; ### p<0.001

### *Spleen cytometry (Figure 2)*

In the **noise-exposed** group, the percentage of immature B lymphocytes was lower than in controls while the percentage of the memory and activated B lymphocytes were not modified.

In the **RF-EMF exposed** group, a higher value of activated B lymphocytes (figure 2) and a lower value of memory B lymphocytes compared to controls were observed. The percentage of immature B lymphocytes was not modified.

In the **co-exposed** group, only the percentage of the memory B lymphocytes was lower compared to controls and the RF-EMF group. The other parameters of spleen cytometry were not modified by the co-exposure.

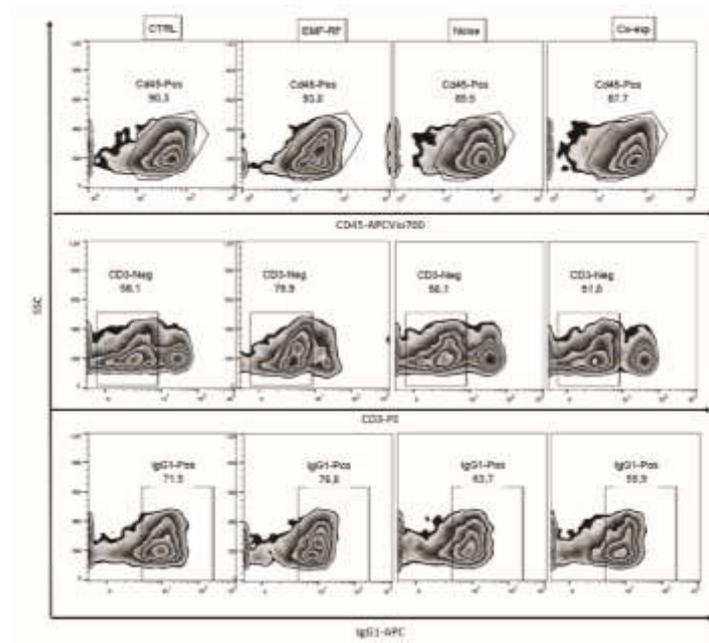


Figure 2 : The populations of B lymphocytes in spleen for one rat of each group

	Control group	RF-EMF-exposed group	Noise-exposed group	Co-exposed group
Activated B lymphocytes (CD45+/CD3-/IgG1+, %)	38.2±4.6	51.6±8.7 ***###	39.8±9.1	36.6±5.4
Immatures B lymphocytes (CD45+/CD3-/CD45R+/IgG1-, %)	49.6±3.5	42.6±11.8	40.6±10.0 *	45.6±5.1
Memory B lymphocytes (CD45+/CD3-/CD27, %)	0.9±0.3	0.35±0.1 ***#	0.8±0.4	0.4±0.1 ***##

Table 3: spleen lymphocytes populations (mean ± SD) in controls (n=10), RF-EMF exposed (n=10) noise-exposed (n=10) and co-exposed (n=10) animals; statistical comparisons with control group \* p<0.05, \*\* 0.5<p<0.01, \*\*\* 0.01<p<0.001; statistical comparisons with co-exposed group # p<0.05; ## p<0.01; ### p<0.001

*Thymus cytometry (Table 4, Figure 3)*

The **noise-exposed** groups had no significant difference of thymus cytometry parameters compared to controls.

In the **RF-EMF-exposed** group, the percentage of double positive CD4+/CD8+ cells was lower than in control group. Moreover, the animals had a higher percentage of CD4+ committed cells than controls while the percentage of CD8+ committed cells was not changed.

The **co-exposed** groups had no significant difference of thymus cytometry parameters compare to controls.

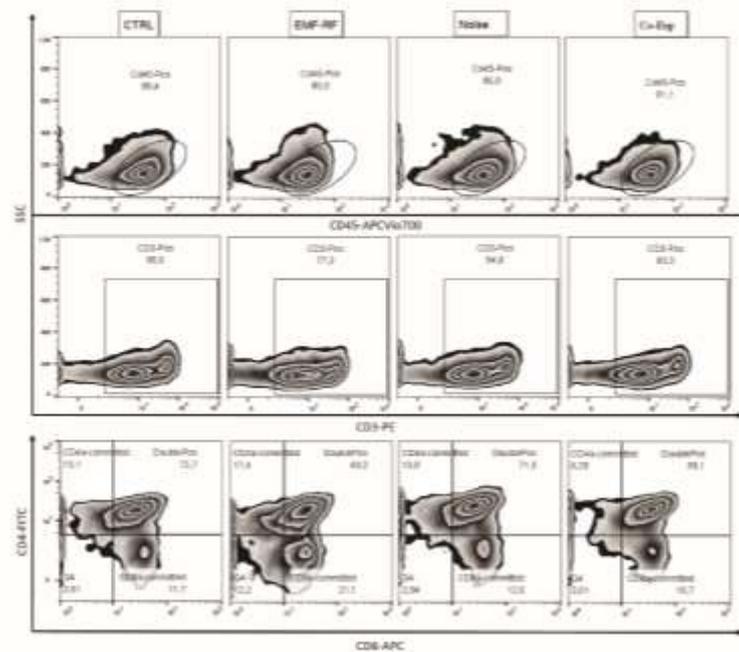


Figure 3 : The populations of T lymphocytes in thymus for one rat of each group

	Control group	RF-EMF-exposed group	Noise-exposed group	Co-exposed group
CD4 committed (%)	9.89±1.63	13.09±3.6 *#	10.4±4.71	9.50±2.39
CD8 committed (%)	10.57±1.48	12.05±2.10 #	11.53±4.91	10.08±0.93
Double positive cells CD4+/CD8+ (%)	61.05±4.91	53.27±7.13 *##	59.55±11.40	63.95±4.98
CD45Ra (%)	35.02±4.80	37.51±3.63 #	33.28±2.62	33.91±2.14

Table 4: Thymus lymphocytes populations (mean ± SD) in controls (n=10), RF-EMF exposed (n=9) noise-exposed (n=6) and co-exposed (n=10) animals; statistical comparisons with control group \* p<0.05, \*\* 0.5<p<0.01, \*\*\* 0.01<p<0.001; statistical comparisons with co-exposed group # p<0.05; ## p<0.01; ### p<0.001

## Discussion

The purpose of this study was to evaluate the impact of chronic exposure to RF-EMF and/or to noise on blood parameters and sub-populations of lymphocytes in the blood, spleen and thymus. To the best of our knowledge, this study is the first to conduct experiment on juvenile organisms under such co-exposure.

First, we did not observed variation of the red blood cells regardless of the type of exposure. Surprisingly, our results did not show any variation on red blood cells due to the noise exposure. In fact, in the literature, exposure to noise, whether professional (85 dB for four years) or experimental (20 dB, 1100 Hz for 20 days), led to increased number of red blood cells and hematocrit (Mohammadi et al., 2016; Sabahi and Moradi, 2002).

Our results for RF-EMF-exposed groups were contrary compare to the literature about the effects of RF-EMF exposure because a single exposure to RF-EMF during 2 weeks (900 MHz, 60–130 V/m, DAS 1.2 W/kg) induced hematological variations (Abdel Aziz et al., 2010a). But another study, working on a longer chronic period, showed transient variations but values returned to a control-like value after 4 weeks of exposure (Usman et al., 2012) In our study, the absence of effect could be due to the lifetime of red blood cells in Wistar rats, which is estimated between 30 and 60 days (Derelanko, 1987; Van Putten, 1958). The effects of RF-EMF and/or noise on these cells may have faded after the first generation or the organism may set up physiological responses to compensate for the effects. To the best of our knowledge, only one study on rodent showed that a chronic exposure on adult during 21 months (970 MHz, 2 W/m<sup>2</sup> 2 hr/day) induced a higher number of red blood cells (+3 %) and a higher concentration of hemoglobin (+ 3 %) (Adang et al., 2009). However, in this latter study, animals were much more aged than ours and aging impacts cannot be excluded.

A single exposure to RF-EMF or noise did not change the number of platelets whereas a co-exposure between RF-EMF and noise induced a greater number of platelets than in control animals. The platelet aggregation is a parameter that has been previously observed during a professional exposure to RF-EMF (Khamidova, 2014). This study did not specify whether the kind of professional position and if a noise constraint was present. After 24 days of a professional noise exposure (sewing machine, no level indicated) platelets number was increased (Marita et al., 2012).

First, the evaluation of the innate immunity indicated that the number of monocytes in noise-exposed group was greater than in the control group while the number of WBC, NK cells and neutrophils remained unchanged. Twenty-four hours after an acute noise exposure on humans (45 times during 5 sec at 90 dB), an increase of monocytes was observed while the activity of NK cells decreased (Sieber et al., 1992). These results indicated an impairment of the innate immunity. We hypothesize that the empowerment of cells of the myeloid lineage could be induced by a release of corticosterone led by an intensive stress effect (Kollet et al., 2013). Unfortunately, in our study, the concentration of the corticosterone was not evaluated. However, our study is the first one to evaluate the chronic impact of noise exposure on innate immunity.

The total number of WBC and specifically the number of monocytes, neutrophils and NK cells were not changed by the RF-EMF exposure indicating no variation in innate immunity.

Finally, in the co-exposed group, the number of WBC was greater than in the control group. This increase was due to a larger number of neutrophils. In contrast, the NK cells and the monocytes were not modified. Based on these results, it appears that the co-exposure did not alter the innate immunity but it seems that the RF-EMF exposure potentiate the effect of noise on the innate immunity by a significant increase of the number of neutrophils. This massive implementation of protective mechanism can affect the sensibility of non-specific peripheral immunity and auto-immunity reactions and may increase either phagocytic activity or chemoattractant phenomenon.

Subsequently, this study got interested in the adaptive immunity. For this, we looked at the different lymphocytes sub-populations, both at the central level with the spleen and the thymus, and at the peripheral level.

The noise-exposed animals did not show any variation in the population of B lymphocytes. However, the percentage of activated T lymphocytes and lower percentage of cytotoxic T lymphocytes at the peripheral level was lower than in control animals. No changes in T lymphocytes were observed at the central thymus level. The lower value of the percentage of cytotoxic T lymphocytes is consistent with the literature in which a 90 dB exposure ( $\geq 90$ dB,

≤500 Hz, for 8 hr/d, 5 d/week for 8 months) induced a lower number of both helper and cytotoxic lymphocytes (Aguas et al., 1999). On the contrary, a 90 dB white noise exposure (5 hr/day, 4 weeks) induced a higher splenic lymphocyte proliferation rate (Zheng and Ariizumi, 2007). The literature shows, following an exposure to noise, both central and peripheral alterations. Thus, it seems in our study that exposure to noise only induced peripheral variations without effect on the central subpopulations.

In the RF-EMF exposed group, the smaller number of memory B cells and the larger number of activated B cells in both spleen and blood indicated a potential greater cell activation. Similarly, the higher percentage of B lymphocytes, linked to the lower value of T lymphocytes, led to the non-variation of the total number of lymphocytes in the general blood count. The lower percentage of T cells is the consequence of the lower number of peripheral cytotoxic T lymphocytes. At the central level, RF-EMF exposed animals showed a lower percentage of double positive cells and higher CD4-committed cells. Thus, the RF-EMF exposure promoted the helper and the cytotoxic commitment in favor of helper T lymphocytes. Previous studies on the effects of RF-EMF exposure (900 MHz or 2.14 GHz for 5 to 9 weeks) on the immune system had not shown any variation at the central or peripheral level (Ohtani et al., 2015; Sambucci et al., 2011). In conclusion, we showed that the RF-EMF exposure led to a modification of the adaptive immunity in both peripheral and central levels.

Finally, in the co-exposed group, a larger percentage of peripheral B lymphocytes was observed. This higher value was due to lower value in memory B lymphocytes which got reactivated in spite of the non-variation in the number of central activated B lymphocytes. Although the first two elements were the result of the RF-EMF exposure, as shown by the single RF-EMF-exposed group, it also appeared that the co-exposure induced a shift of cells from central to peripheral zones.

With regard to T lymphocytes, a synergistic effect of the exposures of noise and RF-EMF was observed in the co-exposed animals, with a lower value of the percentage of T lymphocytes than the control group which was the consequence of a general lower values of the different sub-populations, just as well helper than cytotoxic lymphocytes. On the other hand, surprisingly, no variation of T lymphocytes was found at the central level. As shown in B lymphocytes, it appears that only the co-exposure led to peripheral variations.

## Conclusion

In conclusion, our study highlight that, red blood cells parameters had no variation whatever the type of exposure while the number of platelets was higher in the co-exposed group.

On the innate immune system, the RF-EMF exposure induced no variation, while a noise exposure and a co-exposure resulted in cell number variations, on monocytes for noise-exposed group and neutrophils for co-exposed groups indicating a potential increase of phagocytosis.

Finally, the adaptive immune system is the one that presented the most sensitivity to the different stress submitted during this protocol. While exposure to RF-EMF caused variations, both at the central and peripheral levels, the alterations induced by the noise exposure were visible only on peripheral T lymphocytes. During the co-exposure, there was an increase in the activation of B cells present in the blood while the number of T lymphocytes, whether helper or cytotoxic were decreased. Looking overall, the co-exposure seemed having a mostly peripheral impact, as seen with the noise, but with the alteration modalities observed in the RF-EMF-exposed group. Thus, the co-exposure entails a joint effect mixing the effects of the two constraints indicating a reliance of these two constraints or a joint action on a parameter not evaluated here.

## Bibliography

Abdel Aziz, I., El-Khozondar, H., Shabat, M., Elwasife, K., and Mohamed-Osman, A. (2010). Effect of electromagnetic field on body weight and blood indices in albino rats and the therapeutic action of Vitamin C or E. *20*, 235–244.

Adang, D., Remacle, C., and Vorst, A.V. (2009). Results of a Long-Term Low-Level Microwave Exposure of Rats. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 57, 2488–2497.

Aguas, A.P., Esaguy, N., Grande, N., Castro, A.P., and Castelo Branco, N.A. (1999). Effect low frequency noise exposure on BALB/c mice splenic lymphocytes. *Aviat Space Environ Med* 70, A128-131.

Babisch, W. (2011). Cardiovascular effects of noise. *Noise and Health* 13, 201.

Branco Castelo, N.A. (1999). The clinical stages of vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70, A32-39.

Derelanko, M.J. (1987). Determination of erythrocyte life span in F-344, Wistar, and Sprague-Dawley rats using a modification of the [3H]diisopropylfluorophosphate ([3H]DFP) method. *Fundamental and Applied Toxicology* 9, 271–276.

Dmoch, A., and Moszczyński, P. (1998). Levels of immunoglobulin and subpopulations of T lymphocytes and NK cells in men occupationally exposed to microwave radiation in frequencies of 6-12 GHz. *Med Pr* 49, 45–49.

Gangi, S., and Johansson, O. (2000). A theoretical model based upon mast cells and histamine to explain the recently proclaimed sensitivity to electric and/or magnetic fields in humans. *Medical Hypotheses* 54, 663–671.

Gatta, L., Pinto, R., Ubaldi, V., Pace, L., Galloni, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2003). Effects of in vivo exposure to GSM-modulated 900 MHz radiation on mouse peripheral lymphocytes. *Radiat. Res.* 160, 600–605.

Genuis, S.J., and Lipp, C.T. (2012). Electromagnetic hypersensitivity: fact or fiction? *Sci. Total Environ.* 414, 103–112.

Khamidova, G. (2014). The Influence of Radiofrequency Electromagnetic Radiation on the Platelet Aggregation. *International Journal of Biomedicine* 4, 155–158.

Kim, A., Sung, J.H., Bang, J.-H., Cho, S.W., Lee, J., and Sim, C.S. (2017). Effects of self-reported sensitivity and road-traffic noise levels on the immune system. *PLOS ONE* 12, e0187084.

Knave, B.G., Wibom, R.I., Voss, M., Hedstrom, L.D., and Bergqvist, U.O. (1985). Work with video display terminals among office employees. I. Subjective symptoms and discomfort. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 11, 457–466.

Kollet, O., Vagima, Y., D'Uva, G., Golan, K., Canaani, J., Itkin, T., Gur-Cohen, S., Kalinkovich, A., Caglio, G., Medaglia, C., et al. (2013). Physiologic corticosterone oscillations regulate murine hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and CXCL12 expression by bone marrow stromal progenitors. *Leukemia* 27, 2006–2015.

Lantow, M., Lupke, M., Frahm, J., Mattsson, M.-O., Kuster, N., and Simko, M. (2006). ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics* 45, 55–62.

Laudisi, F., Sambucci, M., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Altavista, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2012). Prenatal exposure to radiofrequencies: effects of WiFi signals on thymocyte development and peripheral T cell compartment in an animal model. *Bioelectromagnetics* 33, 652–661.

Marita, K.G., Kandregula, S., and Rao, L.N. (2012). Acute noise exposure effect on certain hematological parameters in tailors: a pilot study. 3.

Martens, A.L., Reedijk, M., Smid, T., Huss, A., Timmermans, D., Strak, M., Swart, W., Lenters, V., Kromhout, H., Verheij, R., et al. (2018). Modeled and perceived RF-EMF, noise and air pollution and symptoms in a population cohort. Is perception key in predicting symptoms? *Science of The Total Environment* 639, 75–83.

Mohammadi, H., Alimohammadi, I., Roshani, S., Pakzad, R., Abdollahi, M.B., and Dehghan, S.F. (2016). The Effect of Occupational Noise Exposure on Blood and Biochemical Parameters: A Case Study of an Insulator Manufacturer in Iran. *Electron Physician* 8, 1740–1746.

Münzel, T., Daiber, A., Steven, S., Tran, L.P., Ullmann, E., Kossmann, S., Schmidt, F.P., Oelze, M., Xia, N., Li, H., et al. (2017). Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice. *Eur Heart J* 38, 2838–2849.

Ohrstrom, E. (2000). Sleep disturbances caused by road traffic noise - studies in laboratory and field. *Noise and Health* 2, 71.

Ohtani, S., Ushiyama, A., Maeda, M., Ogasawara, Y., Wang, J., Kunugita, N., and Ishii, K. (2015). The effects of radio-frequency electromagnetic fields on T cell function during development. *J. Radiat. Res.* 56, 467–474.

Sabahi, A.R., and Moradi, I. (2002). The Effects of Noise Exposure on Rat's Hematologic Parameters and Red Cell Indices. 2.

Sambucci, M., Laudisi, F., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Altavista, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2010). Prenatal Exposure to Non-ionizing Radiation: Effects of WiFi Signals on Pregnancy Outcome, Peripheral B-Cell Compartment and Antibody Production. *Radiation Research* 174, 732–740.

Sambucci, M., Laudisi, F., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Lopresto, V., Altavista, P., Marino, C., and Pioli, C. (2011). Early life exposure to 2.45GHz WiFi-like signals: Effects on development and maturation of the immune system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 393–398.

Santini, R., Santini, P., Danze, J.M., Le Ruz, P., and Seigne, M. (2002). Investigation on the health of people living near mobile telephone relay stations: I/Incidence according to distance and sex. *Pathol. Biol.* 50, 369–373.

Seitz, H., Stinner, D., Eikmann, T., Herr, C., and Röösl, M. (2005). Electromagnetic hypersensitivity (EHS) and subjective health complaints associated with electromagnetic fields

of mobile phone communication—a literature review published between 2000 and 2004. *Science of The Total Environment* 349, 45–55.

Sieber, W.J., Rodin, J., Larson, L., Ortega, S., Cummings, N., Levy, S., Whiteside, T., and Herberman, R. (1992). Modulation of human natural killer cell activity by exposure to uncontrollable stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 6, 141–156.

Tuschl, H., Novak, W., and Molla-Djafari, H. (2006). In vitro effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells. *Bioelectromagnetics* 27, 188–196.

Usman, A.D., Ahmad, W.W., Ab Kadir, M.Z.A., Mokhtar, M., and Ariffin, R. (2012). Effect of radiofrequency electromagnetic field exposure on hematological parameters of mice. *World Applied Sciences Journal* 16, 656–664.

Van Putten, L.M. (1958). The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 in vivo. *Blood* 13, 789–794.

Wiert, J., Hadjem, A., Varsier, N., and Conil, E. (2011). Numerical dosimetry dedicated to children RF exposure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 421–427.

Yuan, Z.-Q., Li, F., Wang, D.-G., Wang, Y., and Zhang, P. (2004). Effect of low intensity and very high frequency electromagnetic radiation on occupationally exposed personnel. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 22, 267–269.

Zheng, K.-C., and Ariizumi, M. (2007). Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *J Occup Health* 49, 32–38.

Etude 5 : Impacts d'une co-exposition entre les champs électromagnétiques de type radio fréquence et une contrainte sonore de haute intensité sur le comportement et la microcirculation cutanée

## 1. Comportement

L'étude du comportement a été faite grâce à l'Open Field Test. Ce test, d'une durée de 10 min, a été effectué à trois reprises, les 3èmes jours des trois premières semaines du protocole. Ce test comportemental était effectué dans la chambre climatique au cours de la période exposée pour les groupes concernés.

### 1.1. Résultats

La vitesse moyenne de déplacement était inférieure chez les animaux exposés aux **CEM** (seuls ou en co-exposition) comparés aux animaux non exposés (groupes contrôle et bruit seul) ( $7,4 \pm 1,6$  vs  $5,8 \pm 1,8$  cm/s,  $p < 0,001$ ) (Tableau 9). Cette diminution de la vitesse moyenne était une conséquence de la diminution des mouvements rapides ( $42,8 \pm 8,7$  vs  $33,6 \pm 10,2$  %,  $p < 0,001$ ). En parallèle, les animaux exposés aux CEM présentaient moins de changements d'une zone à une autre que les animaux non-exposés aux CEM ( $337,1 \pm 85,0$  vs  $262,5 \pm 88,1$  changements,  $p < 0,001$ ). De plus, les animaux restaient majoritairement dans les coins de l'Open Field ( $51,1 \pm 12,6$  vs  $59,6 \pm 12,6$  %,  $p = 0,014$ ) et moins longtemps près des murs ( $42,7 \pm 10,5$  vs  $35,6 \pm 10,3$  %,  $p = 0,013$ ). Ainsi, la distance parcourue était plus petite ( $4429,9 \pm 963,0$  vs  $3500,5 \pm 1086,7$  cm,  $p < 0,001$ ). La vitesse maximale, les distances parcourues par zones, les temps passés dans une zone ainsi que le temps passé dans la zone centrale et périphérique n'étaient pas impactés par une exposition aux CEM.

Les animaux exposés au **bruit**, qu'il soit seul ou en co-exposition, ne présentaient aucune variation quant aux paramètres étudiés par ce test. De même, les animaux **co-exposés** n'avaient pas d'effet significativement différent du groupe exposé aux CEM.

Concernant les fèces produites, une exposition simple, qu'il s'agisse du **bruit** ou des **CEM**, entraînait une diminution du nombre de fèces sans pour autant varier leur poids total (respectivement  $46,9 \pm 6,6$  vs  $42,8 \pm 7,8$  fèces  $p = 0,018$  et  $46,9 \pm 6,6$  vs  $43,5 \pm 7,9$  fèces  $p = 0,054$ ). Lors de la **co-exposition**, le nombre de fèces produites était inférieur à celui des animaux contrôles ( $46,9 \pm 6,6$  vs  $50,5 \pm 6,6$  fèces,  $p = 0,001$ ) sans modification du poids total. (Tableau 10)

	Control groupe	RF-EMF exposed group	Noise exposed group	Co-exposed group	RF-EMF effect	Noise effect	RF-EMF*Noise interaction
Max Speed (cm/s)	59,58±10,62	56,52±11,21	54,89±10,74	57,39±12,69			
Mean Speed (cm/s)	7,86±1,65	6,24±1,66	6,97±1,46	5,42±1,88	***		
Number of zone changement	360,12±83,22	282,17±82,19	316,08±82,25	242,75±90,52	***		
Slow movement (%)	21,59±1,71	22,38±2,62	21,94±2,56	21,57±4,05			
Fast movement (%)	44,68±8,59	36,58±9,37	41,04±8,54	30,68±10,32	***		
Time central zone (%)	1,12±0,80	1,00±0,85	0,87±0,51	0,66±0,63			
Time peripheric zone (%)	5,39±2,90	4,90±2,97	5,06±2,95	3,03±2,24			
Time corner zone (%)	49,62±12,71	56,77±11,58	53,37±12,46	62,39±13,10	*		
Time wall zone (%)	43,89±10,51	37,32±9,10	41,72±10,51	33,93±11,33	*		
Total distance (cm)	4710,04±989,23	3747,44±1003,93	4173,05±875,04	3253,45±1123,54	***		
Distance central zone (%)	2,54±1,38	2,50±1,69	2,28±0,93	1,65±0,95			
Distance corner zone (%)	27,07±6,11	27,41±4,91	26,69±5,19	30,63±5,95			
Distance peripheric zone (%)	11,57±4,35	11,70±4,14	12,09±5,01	8,07±3,66			
Distance wall zone (%)	58,83±3,65	58,40±4,24	58,92±4,39	59,63±4,76			
Time central+peripheric (%)	6,50±3,35	5,90±3,36	5,92±3,29	3,69±2,60			
Time wall+corner (%)	93,50±3,35	94,09±3,37	94,09±3,30	96,32±2,61			

Tableau 9: paramètres évalués par l'Open Field Test (moyenne±écart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : \* p<0.05, \*\* 0.5<p<0.01, \*\*\* 0.01<p<0.001

					RF-EMF effect	Noise effect	RF-EMF * Noise	tests post RF-EMF*Noise			
	Control group	RF-EMF exposed group	Noise exposed group	Co- exposed group				Control vs RF- EMF	Noise vs co- exposur e	Control vs Noise	RF-EMF vs co- exposure
Number of Feces	46,9±6,6	42,8±7,8	43,5±7,9	50,5±6,6	NS	NS	**	*	***	ind 0,0545	***
Weight of Feces (g) Mean	3,95±1,01	3,98±1,0	3,94±0,91	4,45±1,06	NS	NS	NS				
Weight of Feces (g)	0,09±0,03	0,09±0,02	0,09±0,02	0,09±0,02	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS

Tableau 10 : Paramètres fécaux (moyenne±ecart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : ind 0.1<p<0.05, \* p<0.05, \*\* 0.5<p<0.01, \*\*\* 0.01<p<0.001

## 1.2. Discussion

A ce jour, aucune étude n'a analysé sur la co-exposition entre le bruit et les CEM.

Le comportement des animaux exposés au **bruit** ne présentait pas d'altération. Ce résultat, au vu de l'intensité sonore utilisée, n'est pas cohérent avec la littérature. En effet, une exposition chronique 80 dB (bruit aéroportuaires pendant 65 jours) a montré une augmentation de la mobilité du rat dans l'enceinte de l'Open Field, une intensité inférieure au bruit n'induisant pas de variation (Di et al., 2011). De même, une exposition à 85 dB (2h/j pendant 2 semaines) a induit une augmentation de la mobilité de l'animal (Pan et al., 2006). Toutefois, (Eraslan et al., 2015) ont montré qu'une exposition chronique pouvait avoir des effets radicalement différents d'une exposition aiguë à une même intensité sonore (100 dB, 4h/j pendant 1 ou 30 jours). Dans cette étude, les animaux en exposition aiguë avaient un comportement anxieux alors que les animaux chroniquement exposés étaient moins anxieux. Cette habitude au bruit pourrait être à l'origine de l'absence de résultats observés au cours de notre protocole.

Les animaux exposés aux **CEM** qu'ils soient seuls ou en co-exposition avaient en revanche un comportement différent des animaux non-exposés. Cette altération du comportement se traduisait par une diminution de la quantité de mouvements effectués par l'animal, une diminution de la vitesse moyenne de déplacement et surtout une plus grande propension à rester dans les coins de l'OFT. Ces éléments étaient le signe que l'animal évite les zones exposées afin de se réfugier dans un environnement moins anxiogène au lieu d'avoir une activité exploratoire. Il semblerait donc que les animaux exposés aux CEM soient plus anxieux que les animaux non-exposés aux CEM. De plus, le fait que l'animal se déplaçait moins pourrait également indiquer soit une mise à l'abri soit une logique d'économie d'énergie. Dans la littérature, des études montraient une altération du comportement par les CEM alors que d'autres non. Ainsi, des rats exposés à 800 MHz et 2 GHz (20 h/j pendant 6 semaines) avait un comportement comparable aux animaux contrôles (Shirai et al., 2017). En revanche, des rats exposés à un signal Wi-Fi (5 GHz pendant 4 à 8 semaines) avaient un comportement significativement plus anxieux et une locomotion plus faible que les animaux contrôles (Obajuluwa et al., 2017).

La **co-exposition** n'induisait aucun effet différent d'une exposition simple à propos des paramètres comportementaux mesurés. L'exposition conjointe aux deux contraintes bruit et CEM n'entraînait ni effet synergique ni effet antagoniste.

Les animaux de notre protocole présentaient des variations quant au nombre de fèces produites sur 20 heures. Lors d'une exposition simple (**CEM** ou **bruit**), les animaux produisaient plus de fèces alors que la **co-exposition** conduisait à une diminution de leur nombre par rapport au groupe contrôle. Quelque soit le groupe considéré, le poids total des fèces restait inchangé. Une variation dans le nombre de défécations est signe de stress chez les animaux (Brinda and Thompson, 1953) et confirme le stress observé grâce à l'OFT.

L'augmentation des fèces lors d'une exposition au bruit était cohérente avec la littérature. En effet, une exposition au bruit dès 63 dB entraînait une augmentation de la production de fèces de l'animal (Hirsjärvi and Junnila, 1986). De même, une étude menée sur le rat âgé de 6 à 8 semaines et exposé à une fréquence de 900 MHz (1 h/j pendant 28 jours, 1,15 W/kg) a montré une augmentation de la défécation des animaux exposés par rapport aux animaux contrôles (Narayanan et al., 2013). Ce dernier résultat était en contradiction avec celui observé chez les animaux exposés aux CEM dans notre étude mais cohérent avec l'augmentation observée chez les animaux co-exposés. D'autre part, le compte des déjections était effectué sur celles produites pendant le test comportemental tandis que dans notre protocole, il s'agissait des fèces produites sur une durée de 20 heures. Or il a été montré que la défécation dans un OFT devait être, corrélée à une augmentation des déjections dans la cage courante pour pouvoir effectivement montrer un effet stress (Lindzey et al., 1964).

Une exposition aux CEM et au bruit entraîne donc un état de stress chez l'animal. Il se pourrait que cet état de stress soit la conséquence d'un effet sur l'amygdale. En effet, il existe des preuves que le stress ou un état d'anxiété sont liés à des parties bien précises du cerveau telles que le cortex préfrontal médian, l'hippocampe et l'amygdale, (Canteras et al., 2009). Or, l'augmentation de l'anxiété chez les rats exposés aux CEM (900 MHz 1h/j pendant 4 semaines) est liée à une altération de la structure de l'amygdale de ces rats (Narayanan et al., 2010). L'amygdale est également impactée lors d'une exposition au bruit entraînant une altération

de la régulation de CRH-R1 et CRH-R2, altération dépendante de la durée et de l'intensité sonore (Eraslan et al., 2015).

Comme indiqué précédemment, la co-exposition du bruit et des CEM entraînait une diminution du nombre de fèces par rapport aux animaux contrôles. Le stress pouvait être la cause de cette diminution de la défécation comme indiqué précédemment. Toutefois, le poids total des fèces produites étant comparable à celle des animaux contrôles, le phénomène observé était donc une condensation des fèces. Celle-ci pourrait être due à des variations de la motilité du tractus digestif qui est altérée par différents stress. Cette motilité peut alors être accrue (Young et al., 1987) ou être diminuée (Stacher et al., 1979).

Les différents éléments comportementaux, qu'il s'agisse de l'OFT ou des fèces, pointent une anxiété des animaux lors d'une exposition aux CEM, qu'elle soit simple ou double. Toutefois, cette anxiété se traduit différemment sur les fèces en fonction du type de stress.

## 2. Microcirculation sous-cutanée

La microcirculation cutanée des animaux a été évaluée la veille du sacrifice en utilisant un Doppler. Cette microcirculation sous-cutanée des animaux, alors placés sous anesthésie générale, était faite à deux localisations, la patte et le pavillon de l'oreille. Après l'enregistrement de la condition basale, une chauffe à 44°C a été effectuée pendant 2 minutes.

### 2.1. Résultats

Aucun effet spécifique du bruit ou de la co-exposition n'avait été observé sur la perfusion sanguine et la température cutanée pendant la période basale et la période de chauffe à 44°C.

Pendant l'enregistrement de l'état de base, une exposition aux CEM (seuls ou en co-exposition) entraînait, comparée aux animaux non exposés, la diminution de la valeur moyenne de perfusion sanguine de base au niveau de l'oreille gauche ( $123,4 \pm 119,5$  vs  $61,1 \pm 36,5$  U ;  $p=0,042$ ). Cet effet n'était pas observé au niveau de la patte droite. Cette diminution entraînait une absence de différence de la perfusion sanguine entre l'oreille gauche et la patte droite alors que chez les animaux non exposés aux CEM, la valeur moyenne de perfusion de l'oreille gauche était supérieure à celle de la patte droite ( $123,4 \pm 119,5$  vs  $61,1 \pm 36,5$  U ;  $p=0,019$ ). L'analyse de l'aire sous la courbe montrait les mêmes modifications de la perfusion sanguine que celles décrites ci-dessus.

Concernant la température cutanée, il n'y avait pas d'effet des CEM (seuls ou en co-exposition). Le seul effet était une température cutanée plus élevée au niveau de l'oreille gauche comparée à celle de la patte droite, quel que soit le type d'exposition (oreille gauche :  $29,0 \pm 1,5$  °C vs patte droite :  $27,2 \pm 1,2$  °C ;  $p<0,001$ ).

Lorsque les électrodes du Doppler induisaient une augmentation locale de la température à 44°C, les animaux étant exposés aux CEM (en exposition simple ou en co-exposition) avaient une valeur moyenne de perfusion sanguine inférieure à celle des animaux non exposés au niveau de l'oreille gauche ( $225,3 \pm 193,7$  vs  $120,4 \pm 82,0$  U ;  $p= 0,023$ ). Cette différence n'était pas observée au niveau de la patte droite. Cette diminution entraînait une valeur inférieure de la perfusion sanguine de l'oreille gauche comparée à celle de la patte droite (respectivement  $225,3 \pm 193,8$  vs  $151,1 \pm 85,4$  U ;  $p= 0,059$  et  $120,4 \pm 80,0$  vs  $180,7 \pm 96,6$  U ;  $p= 0,031$ ). Chez les animaux non-exposés aux CEM, la perfusion de l'oreille gauche présentait une tendance à l'accroissement par rapport à la patte droite ( $225,3 \pm 193,7$  vs  $151,1 \pm 85,4$ ,

p=0.059). L'analyse de l'aire sous la courbe montrait les mêmes modifications de la perfusion sanguine que celles décrites ci-dessus.

		Control group		RF-EMF-exposed group		Noise-exposed group		Co-exposed group		RF-EMF effect	Noise effect	Localization effect	Interactions RF-EMF * Localization
		LE	RP	LE	RP	LE	RP	LE	RP				
PU	Mean value in basal period (U)	125,3 ± 143,6	48,7 ± 23,8	53,67 ± 46,6	85,6 ± 43,7	121,3 ± 96,2	73,4 ± 43,4	69,0 ± 86,8	62,6 ± 23,7	NS	NS	NS	*
	Mean value in heating period (U)	236,5 ± 248,6	129,9 ± 82,6	104,2 ± 59,8	204,8 ± 117,1	214,2 ± 128,1	172,3 ± 86,3	133,9 ± 97,4	160,6 ± 75	NS	NS	NS	*
	Aera under the curve in basal period	74401,7 ± 47773,7	28931,3 ± 14171,0	32721,5 ± 27798,5	52511,0 ± 25862,3	71519,0 ± 58511,3	42839,4 ± 27409,8	43728,0 ± 60520,1	37821,6 ± 14962,9	NS	NS	NS	*
	Aera under the curve in heating period	26932,8 ± 28508,4	14811,3 ± 9575,5	12009,7 ± 6990,8	23596,3 ± 13672,7	22638,8 ± 13927,3	18043,5 ± 8806,1	14858,5 ± 10872,3	17627,7 ± 7977,4	NS	NS	NS	*

Tableau 11 : Perfusion unitaire (PU) (moyenne±écart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : \* p<0.05, \*\* 0.5<p<0.01, \*\*\* 0.01<p<0.001 ; LE left ear/oreille gauche, RP right paw/patte froite

		Control group		RF-EMF-exposed group		Noise-exposed group		Co-exposed group					
		LE	RP	LE	RP	LE	RP	LE	RP				
Temperature	Mean value in basal period (°C)	28,7 ± 1,1	26,9 ± 0,7	28,5 ± 1,2	27,3 ± 1,4	29,5 ± 1,4	27,4 ± 1,4	29,0 ± 1,9	27,4 ± 1,2	NS	NS	***	NS

*Tableau 12 Température (moyenne±écart-type) pour les animaux contrôles (n=12), exposés aux CEM (n=12), exposés au bruit (n=12) et co-exposés (n=12) ; Comparaison statistique et seuils de significativité : \* p<0.05, \*\* 0.5<p<0.01, \*\*\* 0.01<p<0.001 ; LE left ear/oreille gauche, RP right paw/patte froite*

## 2.2. Discussion

La technique du laser Doppler permet d'évaluer la microcirculation, ici dans notre étude celle du premier millimètre de la peau. Afin d'évaluer ce paramètre ainsi que la capacité maximale vasodilatatrice, deux localisations ont été évaluées, la patte droite et le pavillon de l'oreille gauche. Les mesures ont été effectuées en présence de bruit (dans le cas du groupe bruit et co-exposition) et en absence de CEM (quelque soit le groupe).

Le premier résultat notable est une température plus importante au niveau du pavillon de l'oreille qu'au niveau de la patte. Cette diminution de la température au niveau de la patte est une conséquence de l'anesthésie. Cette diminution n'est pas constante entre l'oreille et la patte car l'organisme garde une certaine constance au niveau des organes vitaux dont le cerveau qui est à proximité directe de l'oreille.

Dans notre étude, les animaux exposés au **bruit** n'avaient pas de variation au niveau des paramètres de microcirculation observés comparés aux animaux non-exposés au bruit. Bien que la majorité des études portant sur les effets du bruit sur la microcirculation se soient portées sur la cochlée, nos résultats sont contradictoires. En effet, une exposition à 113 dB pendant 13 min (bruit blanc continu) entraînait une augmentation du flux sanguin au niveau de l'oreille interne de la gerbille (Prazma et al., 1983). De même, des cochons d'Inde exposés pendant une heure à une contrainte sonore (tonalité unique à 2, 4, 12 kHz ou un ensemble de 10 à 40 kHz, avec des intensités de 90 à 100 dB) présentaient une diminution du flux sanguin dans le premier tour de la cochlée si l'exposition était de 12 kHz ou de 10 à 40 kHz et des intensités supérieures à 103 dB. Le flux sanguin des animaux n'était pas modifié dans le second tour de la cochlée (Thorne and Nuttall, 1987). Ces premiers résultats tendaient à indiquer qu'une stimulation à haute intensité, peut-être la cause d'altérations au niveau de l'oreille interne. Toutefois, ces études portaient sur l'étude de la vascularisation de la cochlée et donc de l'oreille interne et non sur le pavillon. De plus, (Wright et al., 1985) ont montré qu'une exposition à 120 dB pendant 30 min conduisait à une augmentation de la production d'angiotensine II qui a pour rôle la vasoconstriction. Dans cette même étude, des animaux anesthésiés ont reçu en intra-artériel la quantité d'angiotensine produite lors d'une stimulation sonore. Cette angiotensine provoquait une augmentation du flux sanguin au niveau systémique, puis dans un second temps, une augmentation du flux sanguin au niveau de la cochlée, montrant une interdépendance de ces flux. De plus, les variations de la

microcirculation au niveau de la cochlée ont été montrées comme étant identiques aux variations centrales dans la majorité des cas (Miller et al., 1983). Toutefois, l'ensemble de ces différentes études ne prennent pas en compte l'aspect chronique et se sont portées pour la plupart sur des expositions aiguës. En effet, l'organisme étant soumise quotidiennement à ces contraintes et le laser Doppler ayant été fait à la fin du protocole, soit 6 semaines après le début de l'exposition, les variations dues à une exposition au bruit étaient peut-être présentes les premiers temps de cette exposition avant qu'un phénomène d'habituation vasculaire soit mis en place et dissipe les effets. D'autre part, la plupart des études menées dans la littérature, l'ont été avec des intensités supérieures à 90 dB alors que celle de notre protocole était de 87,5 dB.

Dans notre étude, les animaux exposés aux **CEM** (seuls ou en co-exposition) avaient une perfusion unitaire plus faible au niveau de l'oreille gauche par rapport aux animaux non-exposés. Cette diminution n'était pas observée au niveau de la patte droite. Les résultats présents dans la littérature sont controversés à ce sujet. Des études ont montré que des expositions à 900 et 1439 MHz pendant 10 à 20 min n'induisaient pas de variation au niveau de la circulation cérébrale (Ghosn et al., 2012; Masuda et al., 2007) ou faciale (Lindholm et al., 2011) alors que des études montraient une augmentation de la perfusion unitaire au niveau de la peau de la joue dans le cas d'une exposition à un téléphone portable (Loos et al., 2013; Monfrecola et al., 2003). Cette altération de la microcirculation était inversée lorsque le téléphone mobile était de nouveau éteint, la perfusion revenait à une valeur égale à celle pré-exposition. Ces études sont donc contradictoires avec la nôtre, car présentant une augmentation de la perfusion unitaire alors que nos résultats sont en faveur d'une diminution. En revanche, le type d'exposition varie fortement entre une exposition au téléphone et aux antennes relais, notamment par la distance et l'intensité du champ. Au cours de notre protocole, les CEM n'étaient pas diffusés au cours de l'enregistrement et les altérations vues sont donc des effets indirects des CEM. De même, les études passées portaient sur des expositions aiguës alors que notre protocole évaluait une exposition chronique.

La perfusion dépend de la vitesse des globules rouges et de la concentration en globules rouges circulants. Ainsi nous avons observé (partie immunologie) que la concentration en globules rouges des animaux exposés aux CEM n'était significativement pas différente des animaux non-exposés. Nous en déduisons que l'élément expliquant les effets observés sont

donc liés à la vitesse de circulation. Le signal responsable de cette diminution dans la vitesse des globules rouges est une combinaison entre l'activation du système sympathique noradrénergique et une inhibition du système sympathique non-adrénergique. En effet, une vasoconstriction peut être la conséquence d'une activation du système sympathique noradrénergique (Charkoudian, 2010). D'autres hypothèses, telle qu'une ischémie locale ou une diminution de la fréquence cardiaque pourrait expliquer cette vasoconstriction. En revanche, à l'heure actuelle, les éléments dont nous disposons actuellement ne permettent pas de déterminer quels pourraient être le mécanisme sous-jacents à cette vasoconstriction. Toute fois cet élément est cohérent avec les résultats de (Pelletier et al., 2014) qui étaient en faveur d'un accroissement du froid ressenti.

En conclusion, la microcirculation n'a pas montré d'altération sur les paramètres observés au moment de l'enregistrement suite à une exposition au bruit. La **co-exposition** n'a présenté aucun effet spécifique ni aucune exacerbation des effets observés chez les animaux exposés uniquement aux CEM. ces derniers avaient une vasoconstriction localisée au niveau de l'oreille malgré l'absence de CEM pendant l'enregistrement. Cette vasoconstriction est cohérente avec une étude préalablement effectuée dans notre laboratoire et au cours de laquelle les animaux exposés aux CEM avaient une température caudale inférieure aux animaux exposés. De plus, l'ajout de la prazosine n'entraînait pas de diminution de la température. Il s'agissait donc d'un phénomène de vasoconstriction périphérique. Dans une seconde étude, les animaux placés dans un thermopréféréndum (enceinte proposant deux environnements thermiques distincts) dormaient préférentiellement dans la partie chaude. Ces éléments sont donc en faveur d'une perception de froid par les animaux exposés aux CEM (Pelletier et al., 2014).

L'hypothèse d'une exacerbation des effets lors d'une co-exposition entre les CEM et le bruit n'est donc pas valide dans le cadre de la micro-circulation.

## DISCUSSION GENERALE

L'objectif de mon travail de thèse était d'évaluer les effets des ondes électromagnétiques sur différentes fonctions physiologiques d'un organisme juvénile. Mon hypothèse était que la combinaison entre les CEM avec un autre facteur environnemental provoquerait une exacerbation des effets des CEM. Pour cela, nous avons choisi comme seconde contrainte environnementale le bruit, contrainte ubiquitairement rencontrée dans notre société.

Nous faisons l'hypothèse que le bruit et/ou les CEM lors d'une exposition chronique de faible niveau pourraient provoquer des altérations du sommeil qui engendreraient (ou seraient liées) à d'éventuelles répercussions sur le poids, le comportement, l'immunité... En effet, de nombreuses études de la littérature ont mis en évidence que des modifications du sommeil et/ou du rythme circadien pouvaient conduire (i) à des altérations du métabolisme glucidique ou lipidique, du comportement alimentaire et d'une prise de poids, (ii) à une augmentation de l'anxiété et (iii) à des modifications du système immunitaire.

### *Le poids et la prise alimentaire*

Une perturbation du sommeil peut entraîner une augmentation du stress qui peut conduire à des variations dans le poids (von Kries et al., 2002; Spiegel et al., 1999) et donc à des variations de la prise alimentaire.

Au cours de cette étude, nous avons montré qu'une exposition aux **CEM** entraînait une augmentation du gain de poids quelque soit l'exposition (mono ou co-exposition). En parallèle, nous montrons que les effets sur la prise alimentaire varient selon l'exposition : hyperphagie dans le cas du bruit et hypophagie (paradoxalement) dans le cas d'une exposition aux CEM. Il est connu que la prise alimentaire est un des premiers symptômes visibles du stress d'un individu et peut, selon le stress subi, entraîner une augmentation ou, au contraire, une diminution de la quantité totale, voire une altération plus subtile du pattern alimentaire (Ulrich-Lai et al., 2015). Il semble donc que l'effet induit lors d'une exposition aux CEM diffère dans ses modalités. Nous pouvons faire l'hypothèse que l'exposition aux CEM favorise les molécules anorexigènes et non les molécules orexigènes comme le ferait le bruit.

Toutefois, cette diminution des apports énergétiques quotidiens n'est pas un facteur limitant à la prise de poids de l'animal qui, paradoxalement, augmente. Lors d'une exposition

aux CEM, il est possible que le corps mette en place des mécanismes d'économie d'énergie, nécessitant un apport énergétique plus faible. Toutefois, cette augmentation de la prise de poids et la réduction (ou l'absence de variation) de la prise alimentaire interrogent quant au métabolisme de ces animaux et mériterait des études plus approfondies. Cependant nous avons observés que les animaux exposés aux CEM avaient une diminution de leurs mouvements et de leur vitesse de déplacement. Cet aspect nous donne un nouvel élément de compréhension quant à la diminution de la prise alimentaire qui pourrait être liée à cette limitation de leurs activités physiques et donc des besoins nutritifs. Mais même si les besoins diminuent et les apports alimentaires diminuent, il n'en reste pas moins que le gain de poids est supérieur à celui des animaux contrôles.

Dans le cas d'une **co-exposition**, la prise alimentaire revient à une quantité totale similaire à celle des animaux contrôles (bien que le pattern soit altéré). L'augmentation du gain de poids des animaux co-exposés est peut-être un signe d'altération du fonctionnement du métabolisme alors que les mouvements effectués par les animaux co-exposés sont réduits. Toutefois, le gain de poids étant plus important, un déséquilibre métabolique serait intéressant à chercher.

Dans la littérature, une exposition aux CEM de type radiofréquence a montré une élévation de la concentration d'hémoglobine glyquée, qui est un des symptômes du diabète de type II (Meo et al., 2015). Bien que ce dernier élément n'ait pas été évalué dans ma thèse, les symptômes observés chez nos animaux exposés aux CEM (seuls ou en co-exposition) pourraient être les signes avant-coureurs de maladies métaboliques qui pourraient se développer par la suite chez ces individus. Malheureusement nos analyses de la glycémie, lipidémie... n'ont pas pu être exploitables. Elles auraient peut-être permis d'apporter des éléments sur cette réflexion.

#### *Fèces et comportement*

Les variations du pattern alimentaire qui ont été observées peuvent également être mises en relation avec le nombre de fèces produites par l'animal. Ainsi dans notre étude, un rat exposé aux **CEM** produit moins de fèces. En revanche, contrairement aux résultats observés lors des expositions simples, les animaux **co-exposés** avaient un nombre de fèces plus important que les contrôles.

Il est ainsi possible que selon le type de contrainte à laquelle l'organisme est confronté, la digestion ne s'opère pas de la même manière. En effet, le poids total des matières fécales produites par l'animal restant constant, il semble que les altérations proviennent soit de la modification du péristaltisme intestinal, soit de variations dans la réabsorption de l'eau au niveau du colon. Cette réabsorption de l'eau permet d'équilibrer les concentrations en électrolytes. Une première hypothèse qui pourrait expliquer une variation de la réabsorption d'eau pourrait être une modification des concentrations en électrolytes circulants lors de la co-exposition. En effet, il a été montré que les CEM étaient impliqués dans l'ouverture de canaux ioniques (par stimulation de la membrane plasmique), ces ouvertures pourraient être la conséquence d'une dérégulation ionique (Pall, 2013). Cette dérégulation qui a été montrée de manière générale, pourrait être localisée au niveau de l'intestin. Nos résultats montrant une augmentation de la consommation hydrique des animaux exposés aux **CEM** pourraient aller dans ce sens en permettant de diluer les électrolytes trop concentrés. Ceci n'est cependant pas retrouvé chez les animaux **co-exposés**.

Une autre hypothèse serait l'implication du système immunitaire. En effet, l'absorption hydrique de l'intestin grêle peut être également perturbée par des pathogènes (virus, bactéries, toxines...) d'origine alimentaire. Ainsi les modifications immunitaires qui seront discutées dans la suite de cette discussion pourraient entraîner un défaut dans l'élimination de ces agents pathogènes. La production altérée de fèces serait ainsi un symptôme indirect d'altération au niveau du système immunitaire comme nous le suspectons (cf. ci-dessous). Afin d'étayer cette hypothèse, l'étude de la flore microbienne intestinale apparaîtrait comme un élément complémentaire. Cette fonction est actuellement en cours d'évaluation. De plus, la flore bactérienne pourrait également être une des causes de la variation de la production des fèces.

De manière générale, la variation du nombre de fèces est un bon indicateur du stress d'un individu, les variations digestives pouvant être la conséquence d'un stress comportemental ou cognitif (Mayer, 2000). Or nous avons montré au cours de cette étude que les animaux exposés aux CEM présentaient un caractère plus anxieux par rapport à leurs congénères non-exposés.

Cette anxiété chez les rats exposés aux **CEM** était marquée par la diminution de la locomotion, comme discuté précédemment. Cette diminution de la locomotion pourrait

également être la conséquence du fait que les rats trouvaient plus rapidement leur zone de confort. Toutefois, une fois trouvée, cette zone de confort, les animaux avaient une activité exploratoire diminuée par rapport aux animaux contrôles. Or l'activité exploratoire fait partie du comportement normal du rat et l'anxiété peut être la cause d'une diminution de cette activité.

Le second aspect comportemental observé était la localisation de l'animal dans l'OFT. Les animaux exposés aux **CEM** passaient la majorité du temps dans un coin de la cage signe de stress car les rongeurs évitent les zones libres (zone potentiellement exposées aux prédateurs). Les CEM semblent donc entraîner un sentiment d'anxiété plus important que chez les animaux non-exposés.

Les animaux **co-exposés** ont un comportement similaire aux animaux exposés au CEM.

Le troisième élément comportemental provient de la comparaison inter-contrainte. En effet, et de manière surprenante, les animaux exposés au **bruit** ne semblaient pas présenter d'effets comportementaux majeurs et ce, malgré le fait que la littérature soit en faveur de tels effets. Du fait de la chronicité de l'exposition au bruit auquel les animaux étaient soumis, un phénomène d'habituation a pu se mettre en place, phénomène largement décrit, tant au niveau hormonal que comportemental (Masini et al., 2008). Dans le cas spécifique du bruit, une habituation comportementale a ainsi été observée chez le poisson (Samson et al., 2014) mais également chez le rongeur (Sousa et al., 2006). Nos résultats comportementaux semblent donc indiquer que si nos rats ont été aptes à mettre en place des phénomènes d'habituation lors de l'exposition au bruit de notre protocole, cette habituation ne semble pas possible (ou du moins pas suffisante) dans le cas de la co-exposition que nous avons étudiés.

### *Sommeil*

L'anxiété observée chez nos animaux peut être un élément en lien avec une perturbation du sommeil. Effectivement, les personnes souffrant d'anxiété peuvent présenter une augmentation de la latence d'endormissement et une qualité subjective de sommeil insuffisante, voire souffrir d'insomnie (Staner, 2003). Cependant les effets d'une contrainte environnementale sur le sommeil et l'anxiété peuvent également être indépendantes.

L'étude du sommeil que nous avons réalisé, s'est portée sur deux fenêtres d'observation, une première de 24 heures pendant l'exposition aux CEM et/ou au bruit et au cours de laquelle

nous avons distingué la période diurne (exposée, effet directs des expositions) et la période nocturne (non exposée au bruit, permettant d'étudier les effets indirects, ou effets de trace, de l'exposition au bruit) et une seconde fenêtre d'une heure pendant le test pléthysmographique (sans bruit ni CEM) qui a permis de voir les effets de trace d'un arrêt brusque des expositions pendant la période diurne.

Les animaux qui avaient été exposés au **bruit** présentaient pendant la période nocturne une modification du ratio NREM/REM sans que la durée totale de sommeil ne soit modifiée. Lors du test pléthysmographique, des variations importantes du sommeil étaient observées, allongeant ce dernier au détriment du temps d'éveil. L'animal augmentait également plus particulièrement la durée du REM (au détriment du NREM), le REM étant souvent considéré comme étant associé à la récupération psychique, bien que nous n'ayons observé aucune augmentation significative de l'anxiété dans ce groupe. Dans la littérature, il a été montré qu'une perturbation du sommeil a des impacts sur le comportement et l'état émotionnel de l'individu, notamment des sujets juvéniles (Gregory et al., 2004; Johnson et al., 2000). Cette observation n'est pas corroborée par nos résultats comportementaux malgré une augmentation de la production des fèces.

Il n'est toutefois pas exclu que ce phénomène de rebond ait eu lieu pendant les premiers jours de l'exposition au bruit pendant la période de 24h mais que l'exposition ait eu raison de cet effet, ne le laissant s'exprimer que lors de l'arrêt brutal. D'autre part, entre la fin de la perturbation sonore et le début de l'enregistrement du sommeil pour les 24 heures, une latence d'une heure existait en raison de soins prodigués, période sans aucune exposition pendant laquelle les animaux n'étaient pas empêchés de dormir. Il n'est donc pas exclu qu'une partie de ces effets soit masquée par la période de soins. De plus, les perturbations du sommeil pourraient avoir lieu dans les premiers temps après l'arrêt de l'exposition et être « dilués » quand la période nocturne est analysée dans sa globalité. Il est ainsi possible que l'animal ait déplacé son temps de sommeil mais que ce déplacement ne soit pas visible avec l'analyse actuelle.

Si l'on considère l'étude hypnique sur 24 heures, l'exposition aux **CEM** n'entraînait que de faibles variations hypniques, avec une fragmentation de l'éveil ainsi qu'une augmentation de la durée moyenne des épisodes de NREM. Toutefois, contrairement à l'étude menée dans notre laboratoire par Pelletier et al. en 2013, lors de la **co-exposition** avec une autre contrainte

simultanée (thermique), ni une exacerbation des effets ni des effets spécifiques de la co-exposition n'ont été observés. Dans notre étude, les animaux co-exposés avaient un sommeil comparable à ceux du groupe exposé au bruit seul. Il ne semble donc pas que la co-exposition entre les CEM et le bruit engendre d'effet synergique sur ces paramètres.

Dans un second temps, les paramètres hypniques ont également été analysés après un arrêt brutal de l'exposition pendant la période diurne. Les animaux exposés aux **CEM**, qu'il s'agisse d'une exposition simple ou combinée avec le bruit, ne présentaient pas de variation de sommeil attribuable aux CEM. Il semble donc que les effets hypniques observés (fragmentation de l'éveil, augmentation de la durée des épisodes de NREM) soient dûs uniquement à un effet direct sans que des effets indirects ne soient apparents, du moins sur les paramètres étudiés ici.

Au vu des faibles effets observés sur les différents paramètres hypniques, il ne semble pas que cette fonction physiologique soit altérée de manière importante lors d'une exposition aux CEM. Les faibles variations ne semblent pas non plus, au vu de leur importance, être liés aux variations du poids et de la prise alimentaire vues précédemment, ni aux résultats comportementaux obtenus par ailleurs chez les animaux exposés aux CEM. Il est toutefois possible que les effets comportementaux ou sur le poids soient la conséquence d'une perturbation hypnique ayant eu lieu au début du protocole (au début de l'exposition) et agissant de manière rémanente. En effet, les effets rémanents d'altération du sommeil sur le métabolisme ont déjà été montrés, notamment via la fragmentation du sommeil de la mère pendant la fin de la gestation qui induisait des perturbations métaboliques chez la descendance (Khalyfa et al., 2014). Malgré ces éléments, et au vu des éléments dont nous disposons, les altérations du poids et de la prise alimentaire ne semblent pas être liées aux modifications du sommeil.

### *Immunité*

Une perturbation du sommeil ou du rythme circadien ont également été mis en relation avec l'apparition d'un état pro-inflammatoire au niveau du colon, pouvant même induire l'apparition de maladies gastro-intestinales chroniques (Ali et al., 2013; Brager et al., 2013; Polidarová et al., 2017). Cet état pro inflammatoire est marqué par l'élévation de cytokines

(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ...) qui sont les responsables de l'activation des cascades inflammatoires (Kinnucan et al., 2013).

Pour étudier cela, nous nous sommes intéressés à l'état immunitaire de nos animaux. Nous avons ainsi pu voir qu'une exposition aux **CEM** ne semblait pas impacter l'immunité innée. Lors d'une exposition au **bruit**, le nombre de monocytes était plus important que chez les animaux contrôles indiquant un potentiel besoin accru de défense contre les pathogènes. Lors d'une **co-exposition**, les effets étaient différents de ceux d'une exposition seule au bruit et étaient caractérisés par une augmentation du nombre de neutrophiles, qui est le signe d'un état infectieux chez l'individu. De plus, une exposition à une contrainte environnementale (pollution de l'air) a déjà été la cause d'une élévation du nombre de ces neutrophiles (Jacobs et al., 2010) Dans le cadre de notre étude, le doublement de leur nombre montre que cet état infectieux serait de nature importante. De manière contradictoire, les soins prodigués quotidiennement n'ont pas révélés d'état infectieux visible. De même, à la suite de la chirurgie, les infections ne semblaient pas plus importantes dans les groupes exposés aux CEM. Toutefois à cette étape du projet, il n'est pas possible de discriminer quelle est la fonction de ces cellules activées (chimiotactisme, phagocytose...) mise en avant et qui a engendré cette augmentation. Ainsi les CEM semblent avoir un impact sur l'immunité innée dans le cadre spécifique d'une co-exposition avec le bruit.

Cette activation du système immunitaire inné pourrait être dûe à différents phénomènes. Tout d'abord, en raison de la co-exposition, l'organisme pourrait développer une plus grande vulnérabilité et ainsi laisser plus facilement pénétrer les pathogènes. En effet, parmi les symptômes retrouvés chez les personnes souffrant d'EHS, se trouvent les atteintes dermiques telles que l'eczéma (Seitz et al., 2005). Ces atteintes dermiques pourraient fragiliser la barrière cutanée et entraîner une entrée plus importante des pathogènes. De même cette fragilité des barrières anatomiques pourrait également être retrouvée pour la barrière intestinale. Pour vérifier cet élément, une étude de la translocation bactérienne est actuellement en cours et pourrait donner une indication quant à l'état infectieux de l'animal. L'augmentation de l'activation du système immunitaire inné pourrait également être due à une diminution de la tolérance du système immunitaire à l'égard des pathogènes, entraînant une réaction exagérée. Cette hypothèse a déjà été formulée en se basant sur le fonctionnement du syndrome TILT (Toxicant-Induced Loss of Tolerance) (Genuis and Lipp, 2012b). Toutefois, à la

différence de ce syndrome pour lequel l'exposition et la sensibilisation se font en deux temps, au cours de notre protocole, les animaux étaient exposés simultanément aux deux contraintes. De plus, au vu des modalités d'évaluation des paramètres immunologiques de notre protocole, il n'est pas possible de savoir si la variation observée s'est faite en plusieurs phases. La troisième hypothèse permettant d'expliquer une activation du système immunitaire inné serait une activation artificielle par la co-exposition, qui pourrait être la conséquence, soit d'une activation spécifique des neutrophiles (potentiellement sensibles aux CEM), soit de manière indirecte par l'intermédiaire de cytokines. En effet, comme la plupart des cellules immunitaires, les fonctions des neutrophiles sont sous l'influence des cytokines (Kato and Kitagawa, 2006) et il a déjà été montré qu'une exposition aux CEM induisait une augmentation de la production de cytokines (Ohtani et al., 2015).

A la suite de cette activation de l'immunité innée, nous nous sommes intéressés à l'immunité acquise. Ainsi lors d'une exposition au **bruit**, les lymphocytes B ne semblaient pas être impactés, mise à part une diminution du nombre de lymphocytes B immatures qui n'avait pas l'air d'avoir de répercussions significatives sur les autres sous-populations. Concernant les lymphocytes T, le nombre de lymphocytes T activés et de lymphocytes T cytotoxiques était diminué dans le sang sans que les organes lymphoïdes ne soient impactés.

Lors d'une exposition aux **CEM**, des modifications ont été observées aussi bien au niveau central que périphérique. Une augmentation de l'activation des lymphocytes B était observée ainsi qu'une diminution du nombre des lymphocytes T (en raison d'une augmentation de leur maturation et de leur différenciation). De plus, l'exposition aux CEM entraîne une redistribution des sous-populations lymphocytaires T conduisant à une différenciation en faveur des cellules helper et une diminution des cellules cytotoxiques. Une exposition aux CEM entraînerait donc l'activation de l'immunité humorale et potentiellement la production d'immunoglobulines.

Lors de la **co-exposition**, la redistribution des sous-populations lymphocytaires B et T (augmentation des lymphocytes B activés et diminution des lymphocytes T activés et cytotoxiques) est également observée. Mais contrairement aux animaux exposés aux CEM, aucune altération immunologique au niveau des organes lymphoïdes n'a pas été retrouvée. Il semblerait donc que la co-exposition entre les CEM et le bruit ne conduise pas à une exacerbation des effets au niveau du système immunitaire acquis.

## *Plaquettes*

Concernant les plaquettes, alors qu'une exposition seule au CEM ou au bruit n'entraînaient pas de modification dans leur nombre, lors de la co-exposition, une augmentation significative était observée. Les plaquettes avaient déjà été montrées comme pouvant être impactées par les CEM, notamment au niveau de leur agrégation et il est donc fortement probable que la co-exposition ait révélé l'altération de ce paramètre engendré par les CEM. Plusieurs hypothèses permettraient de mieux comprendre ce phénomène. La première est une atteinte directe des CEM sur les mégacaryocytes. Toutefois, à notre connaissance, l'étude d'une telle population cellulaire lors d'une exposition aux CEM n'a pas été étudiée. En sus de cet effet direct des CEM, l'effet pourrait être indirect. En effet, l'augmentation du nombre de plaquettes pourrait être mise en parallèle avec la perturbation du comportement de l'animal. Il a notamment été montré que l'augmentation du nombre de plaquettes pouvait être le signe d'un « stress mental » (Koudouovoh-Tripp and Sperner-Unterweger, 2012; Malkoff et al., 1993). Ainsi les signes d'anxiété observés chez nos animaux pourraient avoir la même origine que le stress entraînant l'augmentation du nombre de plaquettes.

Une autre hypothèse afin d'expliquer l'augmentation du nombre de plaquettes serait un dérèglement de la concentration ferrique. En effet, une carence en fer peut avoir comme conséquence l'augmentation du nombre de plaquettes (Evstatiev et al., 2014). Bien que l'étude du fer circulant n'ait, à notre connaissance, pas été faite, l'exposition de sera humains aux CEM entraînait une diminution de la concentration en ferritine (Fattahi-asl et al., 2012). Cette hypothèse d'une carence en fer pourrait également expliquer les variations comportementales. En effet, une carence en fer peut être un des facteurs entraînant des symptômes anxieux dans les populations juvéniles, chez l'Homme (Lozoff et al., 2000) mais également chez le rongeur (Beard et al., 2002). Une carence en fer pourrait également être à l'origine des perturbations du système immunitaire (Cherayil, 2010). Enfin, la diminution du fer pourrait être à l'origine des variations métaboliques, une carence en fer ayant déjà été reliée avec une augmentation du poids corporel (Aigner et al., 2014). Toutefois, de manière surprenante, les globules rouges des animaux exposés aux CEM ne semblaient pas impactés par une telle exposition et ne présentaient ainsi pas d'anémie. L'anémie, qui est souvent relié à une carence en fer, n'est toutefois pas observée dans l'ensemble des pathologies (Rineau et

al., 2018). Cette carence en fer pourraient être causée par une inflammation chronique induite par l'exposition aux CEM (Agarwal and Prchal, 2009).

### *Respiration*

Dans un autre domaine, nous nous sommes intéressés aux paramètres respiratoires des animaux exposés. Ayant été effectuée en dehors des chambres climatiques, cette étude portait sur des effets de trace des expositions chroniques. Le premier élément est l'absence de variation du nombre et de la durée des apnées. Au vu de nos résultats, une exposition aux CEM ne semble pas influencer sur ce paramètre. D'autre part, l'étude des paramètres respiratoires ne montre pas de variation importante suite à une exposition aux CEM ni d'effet spécifique de la co-exposition. Toutefois, un effet de trace est tout de même observé au niveau du temps inspiratoire. Il ne peut être exclu que les CEM soient susceptibles d'impacter de façon modérée la respiration.

### *Microcirculation*

Concernant la microcirculation, malgré l'arrêt de l'exposition aux CEM pendant l'enregistrement, les animaux ayant été préalablement exposés aux CEM présentaient une vasoconstriction au niveau de l'oreille. Cette vasoconstriction est cohérente avec une étude préalablement effectuée dans notre laboratoire et au cours de laquelle les animaux exposés aux CEM avaient une température caudale inférieure aux animaux exposés. De plus, l'ajout de la prazocine n'entraînait pas de diminution de la température. Il s'agissait donc d'un phénomène de vasoconstriction périphérique. Dans une seconde étude, les animaux placés dans un thermopréféréndum (enceinte proposant deux environnements thermiques distincts) dormaient préférentiellement dans la partie chaude. Ces éléments sont donc en faveur d'une perception de froid par les animaux exposés aux CEM.

## PERSPECTIVES

Au vu des différentes constatations et hypothèses qui ont été formulées dans nos études, il serait intéressant de poursuivre ce travail afin d'évaluer certains mécanismes sous-jacents. Concernant le poids et la prise alimentaire, il serait adéquat d'évaluer si le gain de poids observé chez les animaux est reflété par une augmentation de la masse maigre ou de la masse grasse. De même, cette évaluation des différentes molécules orexigènes et anorexigènes permettrait de voir quelles sont les causes de ces variations. Ces dosages pourraient être accompagnés de dosages de biochimie sanguine afin d'évaluer les concentrations sériques de glucose, de triglycérides et de LDH et le bilan martial et d'étayer ainsi nos hypothèses (notamment l'hypothèse ferrique avancée).

Les résultats présentés ici confortent les preuves d'une altération du système immunitaire suite à une exposition aux CEM. La première chose à évaluer dans la suite de ce projet serait la fonctionnalité des cellules qui ont été impactées. Ceci permettrait de distinguer si les CEM entraînent uniquement une réaction plus importante ou si le fonctionnement de cette réaction est modifié. D'un point de vue *in vitro*, il serait intéressant de voir si la peau devient perméable à l'entrée des pathogènes lors d'une exposition aux CEM, pouvant conduire ainsi à l'activation du système immunitaire inné. A notre connaissance, des études en ce sens existent par ailleurs. L'étude spécifique des neutrophiles permettrait de déterminer pour quelles fonctions ceux-ci ont été produits en plus grande quantité mais également de voir si la phagocytose est modifiée par une telle exposition. Dans la suite de l'étude de l'immunité acquise, le dosage des immunoglobulines, mais également la détermination du pathogène (s'il est confirmé) entraînant l'activation indiquerait si les CEM entraînent une sensibilité plus importante à l'ensemble des pathogènes ou si cette sensibilité est concentrée sur un type particulier de pathogènes.

## CONCLUSION

Mes travaux de thèse sont les premiers à lier une exposition aux CEM (900 MHz, 1,8 V/m pendant 5 semaines) dans le cadre d'une co-exposition avec le bruit avec des modifications du sommeil, du système immunitaire ou du comportement alimentaire ou moteur chez de rats juvéniles.

Cette exposition aux CEM entraînait une augmentation du poids combinée avec une variation du pattern alimentaire. Cette altération du comportement alimentaire était également accompagnée d'une augmentation de l'anxiété. Ce dernier point a permis de montrer qu'aucun phénomène d'habituation de cette anxiété ne se mettait pas en place contrairement aux animaux exposés au bruit. Les paramètres hypniques ont permis de montrer qu'une exposition aux CEM présentaient d'une part de faibles variations (fragmentation de l'éveil, et augmentation de la durée moyenne d'un épisode de NREM) et d'autre part que ces effets n'étaient visibles que lors de l'exposition et disparaissaient quand les animaux n'étaient plus exposés. Ainsi les CEM ne semblent pas avoir d'effet trace sur le sommeil ni la respiration.

Les analyses sanguines et les organes lymphoïdes ne présentaient pas de variation de concentration des globules rouges. Lors d'une exposition aux CEM seuls, l'immunité innée ne semble pas être modifiée bien que l'immunité acquise soit impactée, avec une redistribution des sous-populations lymphocytaires et une augmentation de l'activation des lymphocytes B. Cette dernière activation semble donc en faveur d'une augmentation de l'immunité humorale.

Lors de la co-exposition entre les CEM et le bruit, les résultats qui ont été obtenus ne nous permettent pas de confirmer mon hypothèse de travail. En effet, si la co-exposition permet de visualiser les effets des CEM sur l'immunité innée, dans la plupart des paramètres, les animaux co-exposés présentent des effets attribuables soient aux CEM, soit au bruit sans exacerbation majeur de ces effets quand les deux expositions existaient simultanément.

Ce travail permet donc d'apporter des éléments supplémentaires dans la compréhension des effets des CEM sur un système biologique et principalement sur les effets qu'ils peuvent avoir sur un modèle juvénile.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abdel Aziz, I., El-Khozondar, H., Shabat, M., Elwasife, K., and Mohamed-Osman, A. (2010a). Effect of electromagnetic field on body weight and blood indices in albino rats and the therapeutic action of Vitamin C or E. *20*, 235–244.
- Abdel Aziz, I., El-Khozondar, H., Shabat, M., Elwasife, K., and Mohamed-Osman, A. (2010b). Effect of electromagnetic field on body weight and blood indices in albino rats and the therapeutic action of Vitamin C or E. *20*, 235–244.
- Adam, K., and Oswald, I. (1977). Sleep is for tissue restoration. *J R Coll Physicians Lond* *11*, 376–388.
- Adang, D., Remacle, C., and Vorst, A.V. (2009). Results of a Long-Term Low-Level Microwave Exposure of Rats. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* *57*, 2488–2497.
- Adolph, E.F. (1947). Urges to eat and drink in rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content* *151*, 110–125.
- Afsset (2009). *Les Radiofréquences*.
- Agarwal, N., and Prchal, J.T. (2009). Anemia of chronic disease (anemia of inflammation). *Acta Haematol.* *122*, 103–108.
- Aguas, A.P., Esaguy, N., Grande, N., Castro, A.P., and Castelo Branco, N.A. (1999). Effect low frequency noise exposure on BALB/c mice splenic lymphocytes. *Aviat Space Environ Med* *70*, A128-131.
- Aigner, E., Feldman, A., and Datz, C. (2014). Obesity as an Emerging Risk Factor for Iron Deficiency. *Nutrients* *6*, 3587–3600.
- Aitken, R.J., Bennetts, L.E., Sawyer, D., Wiklendt, A.M., and King, B.V. (2005). Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *International Journal of Andrology* *28*, 171–179.
- Åkerstedt, T., Arnetz, B., Ficca, G., Paulsson, L.-E., and Kallner, A. (1999). A 50-Hz electromagnetic field impairs sleep. *Journal of Sleep Research* *8*, 77–81.
- Alario, P., Gamallo, A., Beato, M.J., and Trancho, G. (1987). Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol. Behav.* *40*, 29–32.
- Ali, T., Choe, J., Awab, A., Wagener, T.L., and Orr, W.C. (2013). Sleep, immunity and inflammation in gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* *19*, 9231–9239.
- Amici, R., Domeniconi, R., Jones, C.A., Morales-Cobas, G., Perez, E., Tavernese, L., Tortorolo, P., Zamboni, G., and Parmeggiani, P.L. (2000). Changes in REM sleep occurrence due to rhythmical auditory stimulation in the rat. *Brain Res.* *868*, 241–250.

- Amici, R., Morales-Cobas, G., Jones, C.A., Perez, E., Torterolo, P., Zamboni, G., and Parmeggiani, P.L. (2001). REM sleep enhancement due to rhythmical auditory stimulation in the rat. *Behav. Brain Res.* *123*, 155–163.
- Anaclet, C., and Fuller, P.M. (2017). Brainstem regulation of slow-wave-sleep. *Current Opinion in Neurobiology* *44*, 139–143.
- ANFR (2017). L'observatoire en carte.
- ANSES (2013). Radiofréquences et santé (Maison-Alfort France: ANSES).
- ANSES (2018). Hypersensibilité électromagnétique ou intolérance environnementale idiopathique attribuée aux champs électromagnétiques.
- Anticaglia, J.R., and Cohen, A. (1970). Extra-auditory effects of noise as a health hazard. *Am Ind Hyg Assoc J* *31*, 277–281.
- ARCEP (2018). Services Mobiles - Observatoire des marchés des communications électroniques - 4ème trimestre 2017.
- Axelsson, A., and Lindgren, F. (1985). Is there a relationship between hypercholesterolaemia and noise-induced hearing loss? *Acta Otolaryngol.* *100*, 379–386.
- Ayas, N.T., White, D.P., Al-Delaimy, W.K., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Speizer, F.E., Patel, S., and Hu, F.B. (2003). A Prospective Study of Self-Reported Sleep Duration and Incident Diabetes in Women. *Diabetes Care* *26*, 380–384.
- Babbitt, J.T., Kharazi, A.I., Taylor, J.M.G., Bonds, C.B., Zhuang, D., Mirell, S.G., Frumkin, E., and Hahn, T.J. (2001). Increased body weight in C57BL/6 female mice after exposure to ionizing radiation or 60Hz magnetic fields. *International Journal of Radiation Biology* *77*, 875–882.
- Babisch, W. (2011). Cardiovascular effects of noise. *Noise and Health* *13*, 201.
- Bach, V., Libert, J.P., Tassi, P., Wittersheim, G., Johnson, L.C., and Ehrhart, J. (1991). Cardiovascular responses and electroencephalogram disturbances to intermittent noises: effects of nocturnal heat and daytime exposure. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* *63*, 330–337.
- Baliatsas, C., Van Kamp, I., Lebrecht, E., and Rubin, G.J. (2012). Idiopathic environmental intolerance attributed to electromagnetic fields (IEI-EMF): A systematic review of identifying criteria. *BMC Public Health* *12*, 643.
- Barbier, E., Veyret, B., and Dufy, B. Stimulation of Ca<sup>2+</sup> influx in rat pituitary cells under exposure to a 50 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* *17*, 303–311.
- Basner, M. (2008). Nocturnal aircraft noise exposure increases objectively assessed daytime sleepiness. *Somnologie* *12*, 110–117.
- Basner, M., Samel, A., and Isermann, U. (2006). Aircraft noise effects on sleep: application of the results of a large polysomnographic field study. *J. Acoust. Soc. Am.* *119*, 2772–2784.

- Baud, M.O., Magistretti, P.J., and Petit, J.-M. (2012). Sustained sleep fragmentation affects brain temperature, food intake and glucose tolerance in mice. *Journal of Sleep Research* 22, 3–12.
- Beard, J.L., Erikson, K.M., and Jones, B.C. (2002). Neurobehavioral analysis of developmental iron deficiency in rats. *Behavioural Brain Research* 134, 517–524.
- Benedict, C., Dimitrov, S., Marshall, L., and Born, J. (2007). Sleep enhances serum interleukin-7 concentrations in humans. *Brain, Behavior, and Immunity* 21, 1058–1062.
- Berg, M. (1988). Skin problems in workers using visual display terminals A study of 201 patients. *Contact Dermatitis* 19, 335–341.
- Berg-Beckhoff, G., Blettner, M., Kowall, B., Breckenkamp, J., Schlehofer, B., Schmiedel, S., Bornkessel, C., Reis, U., Potthoff, P., and Schüz, J. (2009). Mobile phone base stations and adverse health effects: phase 2 of a cross-sectional study with measured radio frequency electromagnetic fields. *Occupational and Environmental Medicine* 66, 124–130.
- Bergdahl, J. (1995). Psychologic aspects of patients with symptoms presumed to be caused by electricity or visual display units. *Acta Odontol. Scand.* 53, 304–310.
- Bernabò, N., Tettamanti, E., Pistilli, M.G., Nardinocchi, D., Berardinelli, P., Mattioli, M., and Barboni, B. (2007). Effects of 50Hz extremely low frequency magnetic field on the morphology and function of boar spermatozoa capacitated in vitro. *Theriogenology* 67, 801–815.
- Besedovsky, L., Lange, T., and Born, J. (2012). Sleep and immune function. *Pflugers Arch* 463, 121–137.
- Bès-Houtmann, S., Roche, R., Hoareau, L., Gonthier, M.-P., Festy, F., Caillens, H., Gasque, P., d’Hellencourt, C.L., and Cesari, M. (2007). Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem Cell Biol* 127, 131–137.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Grace, M., and Levine, A.S. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 260, R321–R327.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Harker, S., Grace, M., and Levine, A.S. (1994). Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 266, R1765–R1770.
- Bin-Meferij, M.M., and El-kott, A.F. The radioprotective effects of *Moringa oleifera* against mobile phone electromagnetic radiation-induced infertility in rats. 11.
- Björkstén, B. (1999). Environment and infant immunity. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 729–732.
- Bjorvatn, B., Fagerland, S., and Ursin, R. (1998). EEG Power Densities (0.5–20 Hz) in Different Sleep–Wake Stages in Rats. *Physiology & Behavior* 63, 413–417.
- Blois, R., Debilly, G., and Mouret, J. (1980). Daytime noise and its subsequent sleep effects.

- Bollinger, T., Bollinger, A., Skrum, L., Dimitrov, S., Lange, T., and Solbach, W. (2008). Sleep-dependent activity of T cells and regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology* 155, 231–238.
- Bonhomme-Faivre, L., Marion, S., Bezie, Y., Auclair, H., Fredj, G., and Hommeau, C. (1998). Study of human neurovegetative and hematologic effects of environmental low-frequency (50-Hz) electromagnetic fields produced by transformers. *Arch. Environ. Health* 53, 87–92.
- Bonhomme-Faivre, L., Marion, S., Forestier, F., Santini, R., and Auclair, H. (2003). Effects of electromagnetic fields on the immune systems of occupationally exposed humans and mice. *Arch. Environ. Health* 58, 712–717.
- Bonn, F., and Rochon, G. (1992). *Précis de télé-détection* (Montréal).
- Borbély, A.A., Huber, R., Graf, T., Fuchs, B., Gallmann, E., and Achermann, P. (1999). Pulsed high-frequency electromagnetic field affects human sleep and sleep electroencephalogram. *Neuroscience Letters* 275, 207–210.
- Born, J., and Fehm, H.L. (1998). Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: A coordinating role for the limbic hippocampal system. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106, 153–163.
- Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M., and Fehm, H.L. (1997). Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *The Journal of Immunology* 158, 4454–4464.
- Boscolo, P., Bergamaschi, A., Di Sciascio, M.B., Benvenuti, F., Reale, M., Di Stefano, F., Conti, P., and Di Gioacchino, M. (2001). Effects of low frequency electromagnetic fields on expression of lymphocyte subsets and production of cytokines of men and women employed in a museum. *Science of The Total Environment* 270, 13–20.
- Bosy-Westphal, A., Hinrichs, S., Jauch-Chara, K., Hitze, B., Later, W., Wilms, B., Settler, U., Peters, A., Kiosz, D., and Müller, M.J. (2008). Influence of Partial Sleep Deprivation on Energy Balance and Insulin Sensitivity in Healthy Women. *OFA* 1, 266–273.
- Bouji, M., Lecomte, A., Hode, Y., de Seze, R., and Villégier, A.-S. (2012). Effects of 900MHz radiofrequency on corticosterone, emotional memory and neuroinflammation in middle-aged rats. *Experimental Gerontology* 47, 444–451.
- Bouwens, M., Kleijn, S. de, Ferwerda, G., Cuppen, J.J., Savelkoul, H.F.J., and Kemenade, B.M.L.V. (2012). Low-frequency electromagnetic fields do not alter responses of inflammatory genes and proteins in human monocytes and immune cell lines. *Bioelectromagnetics* 33, 226–237.
- Brager, A.J., Ehlen, J.C., Castanon-Cervantes, O., Natarajan, D., Delisser, P., Davidson, A.J., and Paul, K.N. (2013). Sleep Loss and the Inflammatory Response in Mice Under Chronic Environmental Circadian Disruption. *PLOS ONE* 8, e63752.
- Branco Castelo, N.A. (1999). The clinical stages of vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70, A32-39.

- Braune, S., Riedel, A., Schulte-Mönting, J., and Raczek, J. (2002). Influence of a radiofrequency electromagnetic field on cardiovascular and hormonal parameters of the autonomic nervous system in healthy individuals. *Radiat. Res.* *158*, 352–356.
- Brinda, D., and Thompson, W. (1953). An evaluation of defecation and urination as measures of fearfulness. *J Comp Physiol Psychol* *46*, 43–45.
- Brondel, L., Romer, M.A., Nougues, P.M., Touyarou, P., and Davenne, D. (2010). Acute partial sleep deprivation increases food intake in healthy men. *Am J Clin Nutr* *91*, 1550–1559.
- Buxton, O.M., Pavlova, M., Reid, E.W., Wang, W., Simonson, D.C., and Adler, G.K. (2010). Sleep Restriction for 1 Week Reduces Insulin Sensitivity in Healthy Men. *Diabetes* *59*, 2126–2133.
- Calvin, A.D., Carter, R.E., Adachi, T., G. Macedo, P., Albuquerque, F.N., van der Walt, C., Bukartyk, J., Davison, D.E., Levine, J.A., and Somers, V.K. (2013). Effects of Experimental Sleep Restriction on Caloric Intake and Activity Energy Expenditure. *Chest* *144*, 79–86.
- Campfield, L.A., Brandon, P., and Smith, F.J. (1985). On-line continuous measurement of blood glucose and meal pattern in free-feeding rats: The role of glucose in meal initiation. *Brain Research Bulletin* *14*, 605–616.
- Canteras, N.S., Resstel, L.B., Bertoglio, L.J., de Pádua Carobrez, A., and Guimarães, F.S. (2009). Neuroanatomy of Anxiety. In *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment*, M.B. Stein, and T. Steckler, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 77–96.
- Cantrell, R.W. (1974). Prolonged exposure to intermittent noise: audiometric, biochemical, motor, psychological and sleep effects. *Laryngoscope* *84*, 1–55.
- Cappaert, N.L., Klis, S.F., Muijser, H., Kulig, B.M., and Smoorenburg, G.F. (2000). Noise-induced hearing loss in rats. *Noise and Health* *3*, 23.
- Capuron, L., and Miller, A.H. (2011). Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics* *130*, 226–238.
- de Castro, J.M. (1998). Genes and Environment Have Gender-Independent Influences on the Eating and Drinking of Free-Living Humans. *Physiology & Behavior* *63*, 385–395.
- Cecconi, S. (2000). Evaluation of the effects of extremely low frequency electromagnetic fields on mammalian follicle development. *Human Reproduction* *15*, 2319–2325.
- Chagnaud, J.L., and Veyret, B. (1999). In vivo exposure of rats to GSM-modulated microwaves: flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations and of mitogen stimulation. *Int J Radiat Biol* *75*, 111–113.
- Chaput, J.-P., Després, J.-P., Bouchard, C., and Tremblay, A. (2007). Short Sleep Duration is Associated with Reduced Leptin Levels and Increased Adiposity: Results from the Québec Family Study. *Obesity* *15*, 253–261.
- Charkoudian, N. (2010). Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *J Appl Physiol* (1985) *109*, 1221–1228.

- Cherayil, B.J. (2010). Iron and immunity: immunological consequences of iron deficiency and overload. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 407–415.
- Chin-Chance, C., Polonsky, K.S., and Schoeller, D.A. (2000). Twenty-Four-Hour Leptin Levels Respond to Cumulative Short-Term Energy Imbalance and Predict Subsequent Intake. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2685–2691.
- Costa, A., Branca, V., Minoia, C., Pigatto, P.D., and Guzzi, G. (2010). Heavy metals exposure and electromagnetic hypersensitivity. *Science of The Total Environment* 408, 4919–4920.
- Cox, J.H., and Ford, W.L. (1982). The migration of lymphocytes across specialized vascular endothelium: IV. Prednisolone acts at several points on the recirculation pathways of lymphocytes. *Cellular Immunology* 66, 407–422.
- Crouzier, D., Debouzy, J.C., Bourbon, F., Collin, A., Perrin, A., and Testylier, G. (2007a). Neurophysiologic effects at low level 1.8 GHz radiofrequency field exposure: a multiparametric approach on freely moving rats. *Pathologie Biologie* 55, 134–142.
- Crouzier, D., Testylier, G., Perrin, A., and Debouzy, J.-C. (2007b). Quels effets neurophysiologiques pour un champ électromagnétique de faible puissance à 2,45 GHz? *Pathologie Biologie* 55, 235–241.
- Cubinkova, V., Valachova, B., Uhrinova, I., Brezovakova, V., Smolek, T., Jadhav, S., and Zilka, N. (2018). Alternative hypotheses related to Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy* 119, 210–216.
- Danker-Hopfe, H., Dorn, H., Bahr, A., Anderer, P., and Sauter, C. (2011). Effects of electromagnetic fields emitted by mobile phones (GSM 900 and WCDMA/UMTS) on the macrostructure of sleep. *Journal of Sleep Research* 20, 73–81.
- Dasdag, S., Akdag, M.Z., Aksen, F., Yilmaz, F., Bashan, M., Dasdag, M.M., and Celik, M.S. (2003). Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. *Bioelectromagnetics* 24, 182–188.
- De Vries, J., Strubbe, J.H., Wildering, W.C., Gorter, J.A., and Prins, A.J.A. (1993). Patterns of body temperature during feeding in rats under varying ambient temperatures. *Physiology & Behavior* 53, 229–235.
- Del Signore, A., Boscolo, P., Kouri, S., Martino, G.D., and Giuliano, G. (2000). Combined Effects of Traffic and Electromagnetic Fields on the Immune System of Fertile Atopic Women. *Ind Health* 38, 294–300.
- Derelanko, M.J. (1987). Determination of erythrocyte life span in F-344, Wistar, and Sprague-Dawley rats using a modification of the [3H]diisopropylfluorophosphate ([3H]DFP) method. *Fundamental and Applied Toxicology* 9, 271–276.
- Di, G., Zhou, B., Li, Z., and Lin, Q. (2011). Aircraft noise exposure affects rat behavior, plasma norepinephrine levels, and cell morphology of the temporal lobe. *J Zhejiang Univ Sci B* 12, 969–975.

- Di Giampaolo, L., Di Donato, A., Antonucci, A., Paiardini, G., Travaglini, P., Spagnoli, G., Magrini, A., Reale, M., Dadorante, V., Iannaccone, U., et al. (2006). Follow up study on the immune response to low frequency electromagnetic fields in men and women working in a museum. *Int J Immunopathol Pharmacol* *19*, 37–42.
- Dickstein, J.B., and Moldofsky, H. (1999). Sleep, cytokines and immune function. *Sleep Medicine Reviews* *3*, 219–228.
- Dickstein, J., B Hay, J., Lue, F., and Moldofsky, H. (2000). The Relationship of Lymphocytes in Blood and in Lymph to Sleep/Wake States in Sheep. *Sleep* *23*, 185–190.
- Diekelmann, S., and Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience* *11*, 114–126.
- Diem, E., Schwarz, C., Adlkofer, F., Jahn, O., and Rüdiger, H. (2005). Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* *583*, 178–183.
- Dijk, D.J., Duffy, J.F., and Czeisler, C.A. (2000). Contribution of circadian physiology and sleep homeostasis to age-related changes in human sleep. *Chronobiol. Int.* *17*, 285–311.
- Dimitrov, S., Lange, T., Benedict, C., Nowell, M.A., Jones, S.A., Scheller, J., Rose-John, S., and Born, J. (2006). Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *The FASEB Journal* *20*, 2174–2176.
- Dimitrov, S., Benedict, C., Heutling, D., Westermann, J., Born, J., and Lange, T. (2009). Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* *113*, 5134–5143.
- Dmoch, A., and Moszczyński, P. (1998). Levels of immunoglobulin and subpopulations of T lymphocytes and NK cells in men occupationally exposed to microwave radiation in frequencies of 6-12 GHz. *Med Pr* *49*, 45–49.
- Donnellan, M., McKENZIE, D.R., and French, P.W. (1997). Effects of exposure to electromagnetic radiation at 835 MHz on growth, morphology and secretory characteristics of a mast cell analogue RBL-2H3. *Cell Biology International* *21*, 427–439.
- Eberhardt, J. (1987). The disturbance by road traffic noise of the sleep of prepubertal children as studies in the home.
- Eberhardt, J.L., and Akselsson, K.R. (1987). The disturbance by road traffic noise of the sleep of young male adults as recorded in the home. *Journal of Sound and Vibration* *114*, 417–434.
- Eberhardt, J.L., Strale, L., and Berlin, M. (1987). The influence of continuous and intermittent traffic noise on sleep. *Journal of Sound and Vibration* *116*, 445–464.
- Ehrenstein, W., and Muller-Limroth, W. (1980). Laboratory investigations into effects of noise on human sleep. *American Speech and Hearing Association* 433–441.

- Eltiti, S., Wallace, D., Ridgewell, A., Zougkou, K., Russo, R., Sepulveda, F., Mirshekar-Syahkal, D., Rasor, P., Deeble, R., and Fox, E. (2007). Does Short-Term Exposure to Mobile Phone Base Station Signals Increase Symptoms in Individuals Who Report Sensitivity to Electromagnetic Fields? A Double-Blind Randomized Provocation Study. *Environ Health Perspect* *115*, 1603–1608.
- Eraslan, E., Akyazi, I., Ergül-Ekiz, E., and Matur, E. (2015). Noise stress changes mRNA expressions of corticotropin-releasing hormone, its receptors in amygdala, and anxiety-related behaviors. *Noise Health* *17*, 141–147.
- Everson, C.A. (1993). Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am. J. Physiol.* *265*, R1148-1154.
- Everson, C.A., M. Bergmann, B., and Rechtschaffen, A. (1989). Sleep Deprivation in the Rat: III. Total Sleep Deprivation. *Sleep* *12*, 13–21.
- Evstatiev, R., Bukaty, A., Jimenez, K., Kulnigg-Dabsch, S., Surman, L., Schmid, W., Eferl, R., Lippert, K., Scheiber-Mojdehkar, B., Michael Kvasnicka, H., et al. (2014). Iron deficiency alters megakaryopoiesis and platelet phenotype independent of thrombopoietin. *Am J Hematol* *89*, 524–529.
- Eze, I.C., Imboden, M., Foraster, M., Schaffner, E., Kumar, A., Vienneau, D., Héritier, H., Rudzik, F., Thiesse, L., Pieren, R., et al. (2017). Exposure to Night-Time Traffic Noise, Melatonin-Regulating Gene Variants and Change in Glycemia in Adults. *Int J Environ Res Public Health* *14*.
- Faggioni, R., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2001). Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J.* *15*, 2565–2571.
- Fattahi-asl, J., Baradaran-Ghahfarokhi, M., Karbalae, M., Baradaran-Ghahfarokhi, M., and Baradaran-Ghahfarokhi, H.R. (2012). Effects of Radiofrequency Radiation on Human Ferritin: An In Vitro Enzymun Assay. *J Med Signals Sens* *2*, 235–240.
- Feldman, L.R., Eaglstein, W.H., and Johnson, R.B. (1985). Terminal illness. *Journal of the American Academy of Dermatology* *12*, 366.
- Ferrara, M., and De Gennaro, L. (2001). How much sleep do we need? *Sleep Medicine Reviews* *5*, 155–179.
- Frei, P., Mohler, E., and Rössli, M. (2014). Effect of nocturnal road traffic noise exposure and annoyance on objective and subjective sleep quality. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* *217*, 188–195.
- Frick, U., Rehm, J., and Eichhammer, P. (2002). Risk perception, somatization, and self report of complaints related to electromagnetic fields – A randomized survey study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* *205*, 353–360.
- Fruhstorfer, B., Fruhstorfer, H., and Grass, P. (1984). Daytime noise and subsequent night sleep in man. *Europ. J. Appl. Physiol.* *53*, 159–163.

- Fruhstorfer, B., Pritsch, M.G., and Fruhstorfer, H. (1988). Effects of daytime noise load on the sleep-wake cycle and endocrine patterns in man: I. 24 hours neurophysiological data. *Int. J. Neurosci.* *39*, 197–209.
- Gallopín, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P.-H., Rossier, J., Audinat, E., Mühlethaler, M., and Serafin, M. (2000). Identification of sleep-promoting neurons *in vitro*. *Nature* *404*, 992–995.
- Gallopín, T., Luppi, P.-H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambolez, B., and Fort, P. (2005). The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* *134*, 1377–1390.
- Gamallo, A., Alario, P., Villanúa, M.A., and Nava, M.P. (1988). Effect of chronic stress in the blood pressure in the rat: ACTH administration. *Horm. Metab. Res.* *20*, 336–338.
- Gangi, S., and Johansson, O. (2000). A theoretical model based upon mast cells and histamine to explain the recently proclaimed sensitivity to electric and/or magnetic fields in humans. *Medical Hypotheses* *54*, 663–671.
- Gatta, L., Pinto, R., Ubaldi, V., Pace, L., Galloni, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2003). Effects of *in vivo* exposure to GSM-modulated 900 MHz radiation on mouse peripheral lymphocytes. *Radiat. Res.* *160*, 600–605.
- Gaztelu, J.M., Romero-Vives, M., Abraira, V., and Garcia-Austt, E. (1994). Hippocampal EEG theta power density is similar during slow-wave sleep and paradoxical sleep. A long-term study in rats. *Neuroscience Letters* *172*, 31–34.
- Genius, S.J., and Lipp, C.T. (2012a). Electromagnetic hypersensitivity: fact or fiction? *Sci. Total Environ.* *414*, 103–112.
- Genius, S.J., and Lipp, C.T. (2012b). Electromagnetic hypersensitivity: fact or fiction? *Sci. Total Environ.* *414*, 103–112.
- Ghezel-Ahmadi, D., Engel, A., Weidemann, J., Budnik, L.T., Baur, X., Frick, U., Hauser, S., and Dahmen, N. (2010). Heavy metal exposure in patients suffering from electromagnetic hypersensitivity. *Science of The Total Environment* *408*, 774–778.
- Ghosn, R., Thuróczy, G., Loos, N., Brenet-Dufour, V., Liabeuf, S., de Seze, R., and Selmaoui, B. (2012). Effects of GSM 900 MHz on Middle Cerebral Artery Blood Flow Assessed by Transcranial Doppler Sonography. *Radiation Research* *178*, 543–550.
- Gobba, F., Bargellini, A., Scaringi, M., Bravo, G., and Borella, P. (2009). Extremely Low Frequency-Magnetic Fields (ELF-EMF) occupational exposure and natural killer activity in peripheral blood lymphocytes. *Science of The Total Environment* *407*, 1218–1223.
- Goines, L., and Hagler, L. (2007). Noise pollution: a modern plague. *South. Med. J.* *100*, 287–294.

- Golbach, L.A., Philippi, J.G.M., Cuppen, J.J.M., Savelkoul, H.F.J., and Kemenade, B.M.L.V. (2015). Calcium signalling in human neutrophil cell lines is not affected by low-frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 36, 430–443.
- Gomez, P., and Danuser, B. (2004). Affective and physiological responses to environmental noises and music. *International Journal of Psychophysiology* 53, 91–103.
- Goodman, R., and Blank, M. (2002). Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *Journal of Cellular Physiology* 192, 16–22.
- Graham, C., and Cook, M.R. (1999). Human sleep in 60 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 20, 277–283.
- Green, J.D., and Arduini, A.A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *Journal of Neurophysiology* 17, 533–557.
- Gregory, A.M., Eley, T.C., O'Connor, T.G., and Plomin, R. (2004). Etiologies of Associations Between Childhood Sleep and Behavioral Problems in a Large Twin Sample. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 43, 744–751.
- Griefahn, B., and Jansen, G. (1975). Disturbances of sleep by sonic booms. *Science of The Total Environment* 4, 107–112.
- Griefahn, B., and Muzet, A. (1978). Noise-induced sleep disturbances and their effects on health. *Journal of Sound and Vibration* 59, 99–106.
- Guney, M., Ozguner, F., Oral, B., Karahan, N., and Mungan, T. (2007). 900 MHz radiofrequency-induced histopathologic changes and oxidative stress in rat endometrium: protection by vitamins E and C. *Toxicol Ind Health* 23, 411–420.
- Haas, F., Distenfeld, S., and Axen, K. (1986). Effects of perceived musical rhythm on respiratory pattern. *Journal of Applied Physiology* 61, 1185–1191.
- Hagström, M., Auranen, J., and Ekman, R. (2013). Electromagnetic hypersensitive Finns: Symptoms, perceived sources and treatments, a questionnaire study. *Pathophysiology* 20, 117–122.
- Hancı, H., Türedi, S., Topal, Z., Mercantepe, T., Bozkurt, I., Kaya, H., Ersöz, Ş., Ünal, B., and Odacı, E. (2015). Can prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field affect the morphology of the spleen and thymus, and alter biomarkers of oxidative damage in 21-day-old male rats? *Biotech Histochem* 90, 535–543.
- Harvey, P.W., and Sutcliffe, C. (2010). Adrenocortical hypertrophy: establishing cause and toxicological significance. *J Appl Toxicol* 30, 617–626.
- Haus, E. (2007). Chronobiology in the endocrine system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 985–1014.
- Heffner, H.E., Heffner, R.S., Contos, C., and Ott, T. (1994). Audiogram of the hooded Norway rat. *Hearing Research* 73, 244–247.

Hetherington, A.W., and Ranson, S.W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record* 78, 149–172.

Hillert, L., Berglind, N., Arnetz, B.B., and Bellander, T. (2002). Prevalence of self-reported hypersensitivity to electric or magnetic fields in a population-based questionnaire survey. *Scand J Work Environ Health* 28, 33–41.

Hirsjärvi, P.A., and Junnila, M.A. (1986). Effects of light and noise test stimuli on the open-field behavior of Wistar rats. *Scandinavian Journal of Psychology* 27, 311–319.

Hobson, J.A. (1989). *Sleep* (Scientific American Library).

Hocking, B. (1998). Preliminary report: symptoms associated with mobile phone use. *Occup Med (Lond)* 48, 357–360.

Hogenkamp, P.S., Nilsson, E., Nilsson, V.C., Chapman, C.D., Vogel, H., Lundberg, L.S., Zarei, S., Cedernaes, J., Rångtell, F.H., Broman, J.-E., et al. (2013). Acute sleep deprivation increases portion size and affects food choice in young men. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1668–1674.

Holt, P.G. (2000). Key Factors in the Development of Asthma: Atopy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161, S172–S175.

House, R.V., and McCormick, D.L. (2000). Modulation of natural killer cell function after exposure to 60 Hz magnetic fields: confirmation of the effect in mature B6C3F1 mice. *Radiat. Res.* 153, 722–724.

House, R.V., Ratajczak, H.V., Gauger, J.R., Johnson, T.R., Thomas, P.T., and McCormick, D.L. (1996). Immune function and host defense in rodents exposed to 60-Hz magnetic fields. *Fundam Appl Toxicol* 34, 228–239.

Howard, J.K., Lord, G.M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M.A., Ritter, M.A., Lechler, R.I., and Bloom, S.R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest* 104, 1051–1059.

Huang, P.-C., Li, K.-H., and Guo, H.-R. (2018). Association between media coverage and prevalence of idiopathic environmental intolerance attributed to electromagnetic field in Taiwan. *Environmental Research* 161, 329–335.

Hutter, H., Moshammer, H., Wallner, P., and Kundi, M. (2006). Subjective symptoms, sleeping problems, and cognitive performance in subjects living near mobile phone base stations. *Occup Environ Med* 63, 307–313.

IARC (2011). IARC classifies Radiofrequency Electromagnetic Fields as possibly carcinogenic to humans. 6.

Imai, N., Kawabe, M., Hikage, T., Nojima, T., Takahashi, S., and Shirai, T. (2011). Effects on rat testis of 1.95-GHz W-CDMA for IMT-2000 cellular phones. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 57, 204–209.

INRS (2017). Champs électromagnétiques. Effets des champs électromagnétiques sur la santé - Risques - INRS.

INRS (2018). Les mécanisme d'interaction avec le corps humain.

Ising, H., and Kruppa, B. (2004). Health effects caused by noise: evidence in the literature from the past 25 years. *Noise Health* 6, 5–13.

Iurina, N.A., Radostina, A.I., Savin, B.M., Remizova, V.A., and Kosova, I.P. (1997). Mast cells as a test of body state during electromagnetic exposure of varying intensity. *Aviakosm Ekolog Med* 31, 43–47.

Jacobs, L., Nawrot, T.S., de Geus, B., Meeusen, R., Degraeuwe, B., Bernard, A., Sughis, M., Nemery, B., and Panis, L.I. (2010). Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: an intervention study. *Environmental Health* 9, 64.

Johansson, A., Nordin, S., Heiden, M., and Sandström, M. (2010a). Symptoms, personality traits, and stress in people with mobile phone-related symptoms and electromagnetic hypersensitivity. *Journal of Psychosomatic Research* 68, 37–45.

Johansson, A., Nordin, S., Heiden, M., and Sandström, M. (2010b). Symptoms, personality traits, and stress in people with mobile phone-related symptoms and electromagnetic hypersensitivity. *Journal of Psychosomatic Research* 68, 37–45.

Johansson, O., Gangi, S., Liang, Y., Yoshimura, K., Jing, C., and Liu, P.-Y. (2001). Cutaneous mast cells are altered in normal healthy volunteers sitting in front of ordinary TVs/PCs – results from open-field provocation experiments. *Journal of Cutaneous Pathology* 28, 513–519.

Johnson, E.O., Chilcoat, H.D., and Breslau, N. (2000). Trouble sleeping and anxiety/depression in childhood. *Psychiatry Research* 94, 93–102.

Jouvet, M. (1972). The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 64, 166–307.

Jung, K.-A., Ahn, H.-S., Lee, Y.-S., and Gye, M.-C. (2007). Effect of a 20 kHz sawtooth magnetic field exposure on the estrous cycle in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 398–402.

Kalra, S.P., Clark, J.T., Sahu, A., Dube, M.G., and Kalra, P.S. Control of feeding and sexual behaviors by neuropeptide Y: Physiological implications. *Synapse* 2, 254–257.

Kantar TNS (2013). Les Français et les nuisances sonores.

Kato, T., and Kitagawa, S. (2006). Regulation of Neutrophil Functions by Proinflammatory Cytokines. *International Journal of Hematology* 84, 205–209.

Kawada, T., and Suzuki, S. (1999). Change in rapid eye movement (REM) sleep in response to exposure to all-night noise and transient noise. *Arch. Environ. Health* 54, 336–340.

Kazemi, E., Mortazavi, S.M.J., Ali-Ghanbari, A., Sharifzadeh, S., Ranjbaran, R., Mostafavi-pour, Z., Zal, F., and Haghani, M. (2015). Effect of 900 MHz Electromagnetic Radiation on the

Induction of ROS in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Biomed Phys Eng* 5, 105–114.

Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G.D., Herzog, E.D., Volk, H.-D., Kramer, A., and Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21407–21412.

Khalyfa, A., Mutskov, V., Carreras, A., Khalyfa, A.A., Hakim, F., and Gozal, D. (2014). Sleep Fragmentation During Late Gestation Induces Metabolic Perturbations and Epigenetic Changes in Adiponectin Gene Expression in Male Adult Offspring Mice. *Diabetes* 63, 3230–3241.

Khamidova, G. (2014). The Influence of Radiofrequency Electromagnetic Radiation on the Platelet Aggregation. *International Journal of Biomedicine* 4, 155–158.

Khazan, N., and Sawyer, C.H. (1963). “Rebound” Recovery from Deprivation of Paradoxical Sleep in the Rabbit. *Experimental Biology and Medicine* 114, 536–539.

Khazen, W., M’Bika, J.-P., Collinet, M., Tramoni, M., Chany, C., Achour, A., and Forest, C. (2007). Differentiation-dependent expression of interferon gamma and toll-like receptor 9 in 3T3-F442A adipocytes. *Biochimie* 89, 669–675.

Kim, A., Sung, J.H., Bang, J.-H., Cho, S.W., Lee, J., and Sim, C.S. (2017a). Effects of self-reported sensitivity and road-traffic noise levels on the immune system. *PLOS ONE* 12, e0187084.

Kim, J.H., Yu, D.-H., Huh, Y.H., Lee, E.H., Kim, H.-G., and Kim, H.R. (2017b). Long-term exposure to 835 MHz RF-EMF induces hyperactivity, autophagy and demyelination in the cortical neurons of mice. *Sci Rep* 7.

Kim, Y.-W., Kim, H.-S., Lee, J.-S., Kim, Y.-J., Lee, S.-K., Seo, J.-N., Jung, K.-C., Kim, N., and Gimm, Y.-M. (2009). Effects of 60 Hz 14  $\mu$ T magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics* 30, 66–72.

Kinnucan, J.A., Rubin, D.T., and Ali, T. (2013). Sleep and Inflammatory Bowel Disease: Exploring the Relationship Between Sleep Disturbances and Inflammation. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 9, 718–727.

Knave, B., Bergqvist, U., and Wibom, R. (1992). “Hypersensitivity to electricity” - a workplace phenomenon related to low-frequency electric and magnetic fields. 8. International Congress of the International Radiation Protection Association (IRPA8).

Knave, B.G., Wibom, R.I., Voss, M., Hedstrom, L.D., and Bergqvist, U.O. (1985). Work with video display terminals among office employees. I. Subjective symptoms and discomfort. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 11, 457–466.

Koivisto, M., Haarala, C., Krause, C.M., Revonsuo, A., Laine, M., and Hämäläinen, H. (2001). GSM phone signal does not produce subjective symptoms. *Bioelectromagnetics* 22, 212–215.

Kollet, O., Vagima, Y., D’Uva, G., Golan, K., Canaani, J., Itkin, T., Gur-Cohen, S., Kalinkovich, A., Caglio, G., Medaglia, C., et al. (2013). Physiologic corticosterone oscillations regulate murine

hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and CXCL12 expression by bone marrow stromal progenitors. *Leukemia* 27, 2006–2015.

Koudouovoh-Tripp, P., and Sperner-Unterweger, B. (2012). Influence of mental stress on platelet bioactivity. *World J Psychiatry* 2, 134–147.

Krichagin, V.J. (1978). Health effects of noise exposure. *Journal of Sound and Vibration* 59, 65–71.

von Kries, R., Toschke, A.M., Wurmser, H., Sauerwald, T., and Koletzko, B. (2002). Reduced risk for overweight and obesity in 5- and 6-y-old children by duration of sleep--a cross-sectional study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 710–716.

Krueger, J., J Obál, F., Fang, J., Kubota, T., and Taishi, P. (2001). The role of cytokines in physiological sleep regulation. 933.

Kuby, J. (1997). *Immunology* (New York: W.H. Freeman).

Kumar, S., Jain, S., Behari, J., Avelev, V.D., and Mathur, R. (2010). Effect of magnetic field on food and water intake and body weight of spinal cord injured rats. *SPINAL CORD INJURY* 5.

Kuroiwa, M., Xin, P., Suzuki, S., Sasazawa, Y., Kawada, T., and Tamura, Y. (2002). Habituation of sleep to road traffic noise observed not by polygraphy but perception. *Journal of Sound and Vibration* 250, 101–106.

Kwon, M.K., Choi, J.Y., Kim, S.K., Yoo, T.K., and Kim, D.W. (2012). Effects of radiation emitted by WCDMA mobile phones on electromagnetic hypersensitive subjects. *Environmental Health* 11, 69.

Landgrebe, M., Frick, U., Hauser, S., Hajak, G., and Langguth, B. (2009). Association of Tinnitus and Electromagnetic Hypersensitivity: Hints for a Shared Pathophysiology? *PLoS One* 4.

Landreth, K. (2002). Critical Windows in the Development of the Rodent immune system. *Human & Experimental Toxicology* 493–498.

Lange, T., Perras, B., Fehm, H.L., and Born, J. (2003). Sleep Enhances the Human Antibody Response to Hepatitis A Vaccination. *Psychosomatic Medicine* 65, 831–835.

Lange, T., Dimitrov, S., Fehm, H.-L., Westermann, J., and Born, J. (2006). Shift of Monocyte Function Toward Cellular Immunity During Sleep. *Arch Intern Med* 166, 1695–1700.

Lange, T., Dimitrov, S., and Born, J. (2010). Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system: Sleep, rhythms, and immune functions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1193, 48–59.

Lange, T., Dimitrov, S., Bollinger, T., Diekelmann, S., and Born, J. (2011). Sleep after Vaccination Boosts Immunological Memory. *The Journal of Immunology* 187, 283–290.

Lantow, M., Lupke, M., Frahm, J., Mattsson, M.-O., Kuster, N., and Simko, M. (2006). ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic

fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics* 45, 55–62.

Laudisi, F., Sambucci, M., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Altavista, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2012). Prenatal exposure to radiofrequencies: effects of WiFi signals on thymocyte development and peripheral T cell compartment in an animal model. *Bioelectromagnetics* 33, 652–661.

de Lecea, L. (2012). Chapter 3 - Hypocretins and the neurobiology of sleep–wake mechanisms. In *Progress in Brain Research*, A. Shekhar, ed. (Elsevier), pp. 15–24.

Leibel, R.L., Rosenbaum, M., and Hirsch, J. (1995). Changes in Energy Expenditure Resulting from Altered Body Weight. *New England Journal of Medicine* 332, 621–628.

Leitgeb, N. (1994). Electromagnetic Hypersensitivity. Quantitative Assessment of an ill-defined problem. *Cost 244 Workshop EHS Graz* 68–74.

Leszczynski, D., Joenväärä, S., Reivinen, J., and Kuokka, R. (2002). Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70, 120–129.

Levallois, P., Neutra, R., Lee, G., and Hristova, L. (2002). Study of self-reported hypersensitivity to electromagnetic fields in California. *Environ Health Perspect* 110, 619–623.

Liden, C., and Wahlberg, J.E. (1985). Does visual display terminal work provoke rosacea? *Contact Dermatitis* 13, 235–241.

Lin, Y., Lee, H., Berg, A.H., Lisanti, M.P., Shapiro, L., and Scherer, P.E. (2000). The Lipopolysaccharide-activated Toll-like Receptor (TLR)-4 Induces Synthesis of the Closely Related Receptor TLR-2 in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 24255–24263.

Linden, V., and Rolfsen, S. (1981). Video computer terminals and occupational dermatitis. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 7, 62–64.

Lindholm, H., Alanko, T., Rintamäki, H., Kännälä, S., Toivonen, T., Sistonen, H., Tiikkaja, M., Halonen, J., Mäkinen, T., and Hietanen, M. (2011). Thermal effects of mobile phone RF fields on children: A provocation study. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 399–403.

Lindzey, G., Winston, H.D., and Whitney, G.D. (1964). Defecation in stressful and non-stressful situations. *Psychonomic Science* 1, 3–4.

Loos, N., Thuróczy, G., Ghosn, R., Brenet-Dufour, V., Liabeuf, S., Selmaoui, B., Libert, J.-P., Bach, V., Diouf, M., and Seze, R. (2013). Is the Effect of Mobile Phone Radiofrequency Waves on Human Skin Perfusion Non-Thermal? *Microcirculation* 20, 629–636.

Lowden, A., Akerstedt, T., Ingre, M., Wiholm, C., Hillert, L., Kuster, N., Nilsson, J.P., and Arnetz, B. (2011). Sleep after mobile phone exposure in subjects with mobile phone-related symptoms. *Bioelectromagnetics* 32, 4–14.

Lozoff, B., Jimenez, E., Hagen, J., Mollen, E., and Wolf, A.W. (2000). Poorer Behavioral and Developmental Outcome More Than 10 Years After Treatment for Iron Deficiency in Infancy. *Pediatrics* 105, e51–e51.

Lucassen, E.A., Rother, K.I., and Cizza, G. (2012). Interacting epidemics? Sleep curtailment, insulin resistance, and obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1264, 110–134.

Lukas, J.S. (1975). Noise and sleep: a literature review and a proposed criterion for assessing effect. *J. Acoust. Soc. Am.* 58, 1232–1242.

Luukkonen, J., Hakulinen, P., Mäki-Paakkanen, J., Juutilainen, J., and Naarala, J. (2009). Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872MHz radiofrequency radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 662, 54–58.

Lyskov, E., Sandström, M., and Hansson Mild, K. (2001). Neurophysiological study of patients with perceived 'electrical hypersensitivity.' *International Journal of Psychophysiology* 42, 233–241.

Malkoff, S.B., Muldoon, M.F., Zeigler, Z.R., and Manuck, S.B. (1993). Blood platelet responsivity to acute mental stress. *Psychosom Med* 55, 477–482.

Mann, K., and Röschke, J. (1996). Effects of Pulsed High-Frequency Electromagnetic Fields on Human Sleep. *NPS* 33, 41–47.

Mann, K., Röschke, J., Connemann, B., and Beta, H. (1998). No Effects of Pulsed High-Frequency Electromagnetic Fields on Heart Rate Variability during Human Sleep. *NPS* 38, 251–256.

Margonato, V., Nicolini, P., Conti, R., Zecca, L., Veicsteinas, A., and Cerretelli, P. (1995). Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats: II. 50 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 16, 343–355.

Marita, K.G., Kandregula, S., and Rao, L.N. (2012). Acute noise exposure effect on certain hematological parameters in tailors: a pilot study. 3.

Marks, A., and Griefahn, B. (2007). Associations between noise sensitivity and sleep, subjectively evaluated sleep quality, annoyance, and performance after exposure to nocturnal traffic noise. *Noise and Health* 9, 1.

Markwald, R.R., Melanson, E.L., Smith, M.R., Higgins, J., Perreault, L., Eckel, R.H., and Wright, K.P. (2013). Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5695–5700.

Martens, A.L., Reedijk, M., Smid, T., Huss, A., Timmermans, D., Strak, M., Swart, W., Lenters, V., Kromhout, H., Verheij, R., et al. (2018). Modeled and perceived RF-EMF, noise and air pollution and symptoms in a population cohort. Is perception key in predicting symptoms? *Science of The Total Environment* 639, 75–83.

- Maruna, P., Gürlich, R., Fried, M., Frasko, R., Chachkhiani, I., and Haluzik, M. (2001). Leptin as an Acute Phase Reactant after Non-Adjustable Laparoscopic Gastric Banding. *OBES SURG* 11, 609–614.
- Masini, C.V., Day, H.E.W., and Campeau, S. (2008). Long-term habituation to repeated loud noise is impaired by relatively short interstressor intervals in rats. *Behav. Neurosci.* 122, 210–223.
- Masuda, H., Ushiyama, A., Hirota, S., Wake, K., Watanabe, S., Yamanaka, Y., Taki, M., and Ohkubo, C. (2007). Effects of Acute Exposure to a 1439 MHz Electromagnetic Field on the Microcirculatory Parameters in Rat Brain. *In Vivo* 21, 555–562.
- Matsumoto, Y., Mishima, K., Satoh, K., Tozawa, T., Mishima, Y., Shimizu, T., and Hishikawa, Y. (2001). Total Sleep Deprivation Induces an Acute and Transient Increase in NK Cell Activity in Healthy Young Volunteers. *Sleep*.
- Mavanji, V., Teske, J.A., Billington, C.J., and Kotz, C.M. (2013). Partial sleep deprivation by environmental noise increases food intake and body weight in obesity-resistant rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21, 1396–1405.
- Mayer, E.A. (2000). The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 47, 861–869.
- Mayer, J. (1955). Regulation of energy intake and the body weight : the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 63, 15–43.
- McCarthy, D.O., Ouimet, M.E., and Daun, J.M. (1992). The effects of noise stress on leukocyte function in rats. *Res Nurs Health* 15, 131–137.
- Mcdermott, B.M., Mamun, A.A., Najman, J.M., Williams, G.M., O'callaghan, M.J., and Bor, W. (2008). Preschool Children Perceived by Mothers as Irregular Eaters: Physical and Psychosocial Predictors from a Birth Cohort Study. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics* 29, 197–205.
- McEwen, B.S. (2006). Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. *Metabolism* 55, S20–S23.
- Meerlo, P., Sgoifo, A., and Suchecki, D. (2008). Restricted and disrupted sleep: Effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Medicine Reviews* 12, 197–210.
- Meg Tseng, M.-C., Lin, Y.-P., and Cheng, T.-J. (2011). Prevalence and psychiatric comorbidity of self-reported electromagnetic field sensitivity in Taiwan: a population-based study. *J. Formos. Med. Assoc.* 110, 634–641.
- Meo, S.A., Alsubaie, Y., Almubarak, Z., Almutawa, H., AlQasem, Y., and Muhammed Hasanato, R. (2015). Association of Exposure to Radio-Frequency Electromagnetic Field Radiation (RF-EMFR) Generated by Mobile Phone Base Stations with Glycated Hemoglobin (HbA1c) and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Environ Res Public Health* 12, 14519–14528.

- Michel, C., Levin, B.E., and Dunn-Meynell, A.A. (2003). Stress facilitates body weight gain in genetically predisposed rats on medium-fat diet. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285, R791–R799.
- Mild, K.H. (2006). Electromagnetic hypersensitivity: proceedings, International Workshop on EMF Hypersensitivity, Prague, Czech Republic, October 25-27, 2004 (Geneva: World Health Organization).
- Mileykovskiy, B.Y., Kiyashchenko, L.I., and Siegel, J.M. (2005). Behavioral Correlates of Activity in Identified Hypocretin/Orexin Neurons. *Neuron* 46, 787–798.
- Miller, C., Ashford, N., Doty, R., Lamielle, M., Otto, D., Rahill, A., and Wallace, L. (1997). Empirical approaches for the investigation of toxicant-induced loss of tolerance. *Environ Health Perspect* 105, 515–519.
- Miller, J.M., Marks, N.J., and Goodwin, P.C. (1983). Laser Doppler measurements of cochlear blood flow. *Hearing Research* 11, 385–394.
- Mohammadi, H., Alimohammadi, I., Roshani, S., Pakzad, R., Abdollahi, M.B., and Dehghan, S.F. (2016). The Effect of Occupational Noise Exposure on Blood and Biochemical Parameters: A Case Study of an Insulator Manufacturer in Iran. *Electron Physician* 8, 1740–1746.
- Mohler, E., Frei, P., Fröhlich, J., Braun-Fahrländer, C., Rössli, M., and QUALIFEX-team, T. (2012). Exposure to Radiofrequency Electromagnetic Fields and Sleep Quality: A Prospective Cohort Study. *PLOS ONE* 7, e37455.
- Monfrecola, G., Moffa, G., and Procaccini, E.M. (2003). Non-Ionizing Electromagnetic Radiations, Emitted by a Cellular Phone, Modify Cutaneous Blood Flow. *Dermatology* 207, 10–14.
- Moraes, D.A., Venancio, D.P., and Suchecki, D. (2014). Sleep deprivation alters energy homeostasis through non-compensatory alterations in hypothalamic insulin receptors in Wistar rats. *Horm Behav* 66, 705–712.
- Moszczyński, P., Lisiewicz, J., Dmoch, A., Zabiński, Z., Bergier, L., Rucińska, M., and Sasiadek, U. (1999). The effect of various occupational exposures to microwave radiation on the concentrations of immunoglobulins and T lymphocyte subsets. *Wiad. Lek.* 52, 30–34.
- Mullington, J.M., Haack, M., Toth, M., Serrador, J.M., and Meier-Ewert, H.K. (2009). Cardiovascular, Inflammatory, and Metabolic Consequences of Sleep Deprivation. *Progress in Cardiovascular Diseases* 51, 294–302.
- Mullington, J.M., Simpson, N.S., Meier-Ewert, H.K., and Haack, M. (2010). Sleep loss and inflammation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24, 775–784.
- Münzel, T., Daiber, A., Steven, S., Tran, L.P., Ullmann, E., Kossmann, S., Schmidt, F.P., Oelze, M., Xia, N., Li, H., et al. (2017). Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice. *Eur Heart J* 38, 2838–2849.

- Murray, M.J., and Murray, A.B. (1979). Anorexia of infection as a mechanism of host defense. *Am J Clin Nutr* 32, 593–596.
- Muzet, A. (2007). Environmental noise, sleep and health. *Sleep Medicine Reviews* 11, 135–142.
- Muzet, A.G., Naitoh, P., Johnson, L.C., and Townsend, R.E. (1974). Body Movements in Sleep During 30-Day Exposure to Tone Pulse. *Psychophysiology* 11, 27–34.
- Nance, D.M., and Sanders, V.M. (2007). Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). *Brain, Behavior, and Immunity* 21, 736–745.
- Narayanan, S.N., Kumar, R.S., Potu, B.K., Nayak, S., Bhat, P.G., and Mailankot, M. (2010). Effect of radio-frequency electromagnetic radiations (RF-EMR) on passive avoidance behaviour and hippocampal morphology in Wistar rats. *Upsala Journal of Medical Sciences* 115, 91–96.
- Narayanan, S.N., Kumar, R.S., Paval, J., Kedage, V., Bhat, M.S., Nayak, S., and Bhat, P.G. (2013). Analysis of emotionality and locomotion in radio-frequency electromagnetic radiation exposed rats. *Neurol. Sci.* 34, 1117–1124.
- Nasta, F., Prisco, M.G., Pinto, R., Lovisolò, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2006). Effects of GSM-modulated radiofrequency electromagnetic fields on B-cell peripheral differentiation and antibody production. *Radiat. Res.* 165, 664–670.
- Nedeltcheva, A.V., Kilkus, J.M., Imperial, J., Kasza, K., Schoeller, D.A., and Penev, P.D. (2009). Sleep curtailment is accompanied by increased intake of calories from snacks<sup>123</sup>. *Am J Clin Nutr* 89, 126–133.
- Nilsen, A. (1982). Facial rash in visual display unit operators. *Contact Dermatitis* 8, 25–28.
- Nishino, M., Ashiku, S.K., Kocher, O.N., Thurer, R.L., Boisselle, P.M., and Hatabu, H. (2006). The Thymus: A Comprehensive Review. *RadioGraphics* 26, 335–348.
- Obajuluwa, A.O., Akinyemi, A.J., Afolabi, O.B., Adekoya, K., Sanya, J.O., and Ishola, A.O. (2017). Exposure to radio-frequency electromagnetic waves alters acetylcholinesterase gene expression, exploratory and motor coordination-linked behaviour in male rats. *Toxicology Reports* 4, 530–534.
- Obal, F., and Krueger, J.M. (2003). Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep. *Front. Biosci.* 8, d520-550.
- Occelli, F., Lameth, J., Adenis, V., Huetz, C., Lévêque, P., Jay, T.M., Edeline, J.-M., and Mallat, M. (2018). A Single Exposure to GSM-1800 MHz Signals in the Course of an Acute Neuroinflammatory Reaction can Alter Neuronal Responses and Microglial Morphology in the Rat Primary Auditory Cortex. *Neuroscience* 385, 11–24.
- OECD (2001). *OECD Environmental Outlook* (OECD Publishing).
- Ohrstrom, E. (2000). Sleep disturbances caused by road traffic noise - studies in laboratory and field. *Noise and Health* 2, 71.

- Ohtani, S., Ushiyama, A., Maeda, M., Ogasawara, Y., Wang, J., Kunugita, N., and Ishii, K. (2015). The effects of radio-frequency electromagnetic fields on T cell function during development. *J. Radiat. Res.* *56*, 467–474.
- Ottaway, C.A., and Husband, A.J. (1992). Central nervous system influences on lymphocyte migration. *Brain, Behavior, and Immunity* *6*, 97–116.
- Ozgun, E., Güler, G., and Seyhan, N. (2010). Mobile phone radiation-induced free radical damage in the liver is inhibited by the antioxidants n-acetyl cysteine and epigallocatechin-gallate. *International Journal of Radiation Biology* *86*, 935–945.
- Palagini, L., Moretto, U., Dell’Osso, L., and Carney, C. (2017). Sleep-related cognitive processes, arousal, and emotion dysregulation in insomnia disorder: the role of insomnia-specific rumination. *Sleep Medicine* *30*, 97–104.
- Pall, M.L. (2013). Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. *J Cell Mol Med* *17*, 958–965.
- Pall, M.L. (2014). Electromagnetic field activation of voltage-gated calcium channels: role in therapeutic effects. *Electromagnetic Biology and Medicine* *33*, 251–251.
- Pan, F., Lu, C., Song, J., Jing, H., Li, Q., Yu, H., and Chen, X. (2006). Different duration of crowding and noise exposure effects on exploratory behavior, cellular immunity and HSP70 expression in rats. *Stress and Health* *22*, 257–262.
- Park, J., Chung, S., Lee, J., Sung, J.H., Cho, S.W., and Sim, C.S. (2017). Noise sensitivity, rather than noise level, predicts the non-auditory effects of noise in community samples: a population-based survey. *BMC Public Health* *17*, 315.
- Parrish, J.B., and Teske, J.A. (2017). Acute partial sleep deprivation due to environmental noise increases weight gain by reducing energy expenditure in rodents: Acute Partial Sleep Deprivation Reduces Energy Expenditure. *Obesity* *25*, 141–146.
- Pelletier, A., Delanaud, S., Décima, P., Thuroczy, G., de Seze, R., Cerri, M., Bach, V., Libert, J.-P., and Loos, N. (2013). Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy balance in developing rats. *Environ Sci Pollut Res Int* *20*, 2735–2746.
- Pelletier, A., Delanaud, S., de Seze, R., Bach, V., Libert, J.-P., and Loos, N. (2014). Does exposure to a radiofrequency electromagnetic field modify thermal preference in juvenile rats? *PLoS ONE* *9*, e99007.
- Polidarová, L., Houdek, P., and Sumová, A. (2017). Chronic disruptions of circadian sleep regulation induce specific proinflammatory responses in the rat colon. *Chronobiology International* *34*, 1273–1287.
- Porkka-Heiskanen, T. (2013). Sleep homeostasis. *Current Opinion in Neurobiology* *23*, 799–805.
- Prazma, J., Rodgers, G.K., and Pillsbury, H.C. (1983). Cochlear blood flow. Effect of noise. *Arch Otolaryngol* *109*, 611–615.

- Prescott, S.L., Macaubas, C., Smallacombe, T., Holt, B.J., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1999). Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *The Lancet* 353, 196–200.
- Prisco, M.G., Nasta, F., Rosado, M.M., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2008a). Effects of GSM-Modulated Radiofrequency Electromagnetic Fields on Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 170, 803–810.
- Prisco, M.G., Nasta, F., Rosado, M.M., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2008b). Effects of GSM-Modulated Radiofrequency Electromagnetic Fields on Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 170, 803–810.
- Pyko, A., Eriksson, C., Oftedal, B., Hilding, A., Östenson, C.-G., Krog, N.H., Julin, B., Aasvang, G.M., and Pershagen, G. (2015). Exposure to traffic noise and markers of obesity. *Occup Environ Med* 72, 594–601.
- Quiñonez-Flores, C.M., González-Chávez, S.A., Del Río Nájera, D., and Pacheco-Tena, C. (2016). Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res Int* 2016.
- Rabat, A. (2007). Extra-auditory effects of noise in laboratory animals: The relationship between noise and sleep.
- Rabat, A., Bouyer, J.J., Aran, J.M., Courtiere, A., Mayo, W., and Le Moal, M. (2004). Deleterious effects of an environmental noise on sleep and contribution of its physical components in a rat model. *Brain Res.* 1009, 88–97.
- Rabat, A., Bouyer, J.J., Aran, J.M., Le Moal, M., and Mayo, W. (2005). Chronic exposure to an environmental noise permanently disturbs sleep in rats: Inter-individual vulnerability. *Brain Research* 1059, 72–82.
- Rajkovic, V., Matavulj, M., and Lazetic, B. (2003). Extremely low frequency electromagnetic field influence on rat body mass. 6.
- Ramezani, N., Ahmadi, R., Akbari, S., and Mohammadi, S. (2014). Effects of Noise Pollution on Thyroid Function in Rat. *International Conference on Earth, Environment and Life Sciences*.
- Rao, V.S., Titushkin, I.A., Moros, E.G., Pickard, W.F., Thatte, H.S., and Cho, M.R. (2008). Nonthermal Effects of Radiofrequency-Field Exposure on Calcium Dynamics in Stem Cell-Derived Neuronal Cells: Elucidation of Calcium Pathways. *Radiation Research* 169, 319–329.
- Rechtschaffen, A., Hauri, P., and Zeitlin, M. (1966). Auditory Awakening Thresholds in Rem and Nrem Sleep Stages. *Percept Mot Skills* 22, 927–942.
- Rechtschaffen, A., Gilliland, M.A., Bergmann, B.M., and Winter, J.B. (1983). Physiological Correlates of Prolonged Sleep Deprivation in Rats. *Science (New York, N.Y.)* 221, 182–184.
- Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A., and Gilliland, M.A. (2018). Sleep Deprivation in the Rat: X. Integration and Discussion of the Findings. *SLEEP DEPRIVATION* 12, 20.

Reis, E.S., Lange, T., Köhl, G., Herrmann, A., Tschulakow, A.V., Naujoks, J., Born, J., and Köhl, J. (2011). Sleep and circadian rhythm regulate circulating complement factors and immunoregulatory properties of C5a. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 1416–1426.

Renaud, A. (1988). Les différentes étapes du sommeil. *Soins Gyn. Obst. Puer. Ped.*

Renegar, K., Floyd, R., and Krueger, J. (1998). Effect of Sleep Deprivation on Serum Influenza-Specific IgG. *Sleep* 21, 19–24.

Renegar, K.B., Crouse, D., Floyd, R.A., and Krueger, J. (2000). Progression of influenza viral infection through the murine respiratory tract: the protective role of sleep deprivation. *Sleep* 23, 859–863.

République Française (2016). Décret n° 2016-1074 du 3 août 2016 relatif à la protection des travailleurs contre les risques dus aux champs électromagnétiques.

Reynolds, A.C., Dorrian, J., Liu, P.Y., Dongen, H.P.A.V., Wittert, G.A., Harmer, L.J., and Banks, S. (2012). Impact of Five Nights of Sleep Restriction on Glucose Metabolism, Leptin and Testosterone in Young Adult Men. *PLOS ONE* 7, e41218.

Rineau, E., Gaillard, T., Gueguen, N., Procaccio, V., Henrion, D., Prunier, F., and Lasocki, S. (2018). Iron deficiency without anemia is responsible for decreased left ventricular function and reduced mitochondrial complex I activity in a mouse model. *International Journal of Cardiology* 266, 206–212.

Röösli, M., Moser, M., Baldinini, Y., Meier, M., and Braun-Fahrländer, C. (2004). Symptoms of ill health ascribed to electromagnetic field exposure – a questionnaire survey. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207, 141–150.

Röösli, M., Frei, P., Mohler, E., and Hug, K. (2010). Systematic review on the health effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields from mobile phone base stations. *Bull World Health Organ* 88, 887-896F.

Sabahi, A.R., and Moradi, I. (2002). The Effects of Noise Exposure on Rat's Hematologic Parameters and Red Cell Indices. 2.

Sadek, S.H., Khalifa, W.A., and Azoz, A.M. (2017). Pulmonary consequences of hypothyroidism. *Ann Thorac Med* 12, 204–208.

Salehi, I., Sani, K.G., and Zamani, A. (2013). Exposure of rats to extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) alters cytokines production. *Electromagnetic Biology and Medicine* 32, 1–8.

Sambucci, M., Laudisi, F., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Altavista, P., Lovisolò, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2010). Prenatal Exposure to Non-ionizing Radiation: Effects of WiFi Signals on Pregnancy Outcome, Peripheral B-Cell Compartment and Antibody Production. *Radiation Research* 174, 732–740.

Sambucci, M., Laudisi, F., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Lopresto, V., Altavista, P., Marino, C., and Pioli, C. (2011). Early life exposure to 2.45GHz WiFi-like signals: Effects on development

and maturation of the immune system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 393–398.

Samson, J.E., Mooney, T.A., Gussekloo, S.W.S., and Hanlon, R.T. (2014). Graded behavioral responses and habituation to sound in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Biology* 217, 4347–4355.

Sandrey, M.A., Vesper, D.N., Johnson, M.T., Nindl, G., Swez, J.A., Chamberlain, J., and Balcavage, W.X. (2002). Effect of short duration electromagnetic field exposures on rat mass. *Bioelectromagnetics* 23, 2–6.

Sandström, M., Lyskov, E., Berglund, A., Medvedev, S., and Mild, K.H. (1997). Neurophysiological effects of flickering light in patients with perceived electrical hypersensitivity. *J. Occup. Environ. Med.* 39, 15–22.

Sandström, M., Lyskov, E., Hörnsten, R., Hansson Mild, K., Wiklund, U., Rask, P., Klucharev, V., Stenberg, B., and Bjerle, P. (2003). Holter ECG monitoring in patients with perceived electrical hypersensitivity. *International Journal of Psychophysiology* 49, 227–235.

Santini, R., Santini, P., Danze, J.M., Le Ruz, P., and Seigne, M. (2002). Investigation on the health of people living near mobile telephone relay stations: I/Incidence according to distance and sex. *Pathol. Biol.* 50, 369–373.

Schmid, M.R., Loughran, S.P., Regel, S.J., Murbach, M., Grunauer, A.B., Rusterholz, T., Bersagliere, A., Kuster, N., and Achermann, P. (2012). Sleep EEG alterations: effects of different pulse-modulated radio frequency electromagnetic fields. *Journal of Sleep Research* 21, 50–58.

Schooneveld, H., and Kuiper, J. (2008). Electrohypersensitivity (EHS) in the Netherlands—A Questionnaire survey.

Schreier, N., Huss, A., and Rössli, M. (2006). The prevalence of symptoms attributed to electromagnetic field exposure: a cross-sectional representative survey in Switzerland. *Soz Präventivmed* 51, 202–209.

Schröttner, J., and Leitgeb, N. (2008). Sensitivity to electricity – Temporal changes in Austria. *BMC Public Health* 8, 310.

Schüssler, P., Uhr, M., Ising, M., Weikel, J.C., Schmid, D.A., Held, K., Mathias, S., and Steiger, A. (2006). Nocturnal ghrelin, ACTH, GH and cortisol secretion after sleep deprivation in humans. *Psychoneuroendocrinology* 31, 915–923.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671.

Seitz, H., Stinner, D., Eikmann, T., Herr, C., and Rössli, M. (2005). Electromagnetic hypersensitivity (EHS) and subjective health complaints associated with electromagnetic fields of mobile phone communication—a literature review published between 2000 and 2004. *Science of The Total Environment* 349, 45–55.

- Shirai, T., Wang, J., Kawabe, M., Wake, K., Watanabe, S., Takahashi, S., and Fujiwara, O. (2017). No adverse effects detected for simultaneous whole-body exposure to multiple-frequency radiofrequency electromagnetic fields for rats in the intrauterine and pre- and post-weaning periods. *Journal of Radiation Research* 58, 48–58.
- Shoham, S., Davenne, D., Cady, A.B., Dinarello, C.A., and Krueger, J.M. (1987). Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 253, R142–R149.
- Sieber, W.J., Rodin, J., Larson, L., Ortega, S., Cummings, N., Levy, S., Whiteside, T., and Herberman, R. (1992). Modulation of human natural killer cell activity by exposure to uncontrollable stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 6, 141–156.
- Siegel, J.M. (2001). The REM Sleep-Memory Consolidation Hypothesis. *Science* 294, 1058–1063.
- Simon, C., Gronfier, C., Schlienger, J.L., and Brandenberger, G. (1998). Circadian and Ultradian Variations of Leptin in Normal Man under Continuous Enteral Nutrition: Relationship to Sleep and Body Temperature. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1893–1899.
- Smith, A. (1992). *Sleep, Arousal and Performance* (Cambridge: Broughton RJ & Oglivie RD).
- Sommer, A.M., Streckert, J., Bitz, A.K., Hansen, V.W., and Lerchl, A. (2004). No effects of GSM-modulated 900 MHz electromagnetic fields on survival rate and spontaneous development of lymphoma in female AKR/J mice. *BMC Cancer* 4.
- Sørensen, M., Andersen, Z.J., Nordsborg, R.B., Becker, T., Tjønneland, A., Overvad, K., and Raaschou-Nielsen, O. (2013). Long-term exposure to road traffic noise and incident diabetes: a cohort study. *Environ. Health Perspect.* 121, 217–222.
- Sousa, N., Almeida, O.F.X., and Wotjak, C.T. (2006). A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes, Brain and Behavior* 5, 5–24.
- Spaeth, A.M., Dinges, D.F., and Goel, N. (2013). Effects of Experimental Sleep Restriction on Weight Gain, Caloric Intake, and Meal Timing in Healthy Adults. *Sleep* 36, 981–990.
- Spiegel, K., Leproult, R., and Van Cauter, E. (1999). Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 354, 1435–1439.
- Spiegel, K., Leproult, R., L'Hermite-Balériaux, M., Copinschi, G., Penev, P.D., and Van Cauter, E. (2004a). Leptin Levels Are Dependent on Sleep Duration: Relationships with Sympathovagal Balance, Carbohydrate Regulation, Cortisol, and Thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5762–5771.
- Spiegel, K., Tasali, E., Penev, P., and Van Cauter, E. (2004b). Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann. Intern. Med.* 141, 846–850.
- Stacher, G., Schmierer, G., and Landgraf, M. (1979). Tertiary Esophageal Contractions Evoked by Acoustical Stimuli. *Gastroenterology* 77, 49–54.

- Stanchina, M.L., Abu-Hijleh, M., Chaudhry, B.K., Carlisle, C.C., and Millman, R.P. (2005). The influence of white noise on sleep in subjects exposed to ICU noise. *Sleep Medicine* 6, 423–428.
- Staner, L. (2003). Sleep and anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 5, 249–258.
- Stanley, B., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: A powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189–1192.
- Stansfeld, S., and Clark, C. (2015). Health Effects of Noise Exposure in Children. *Curr Envir Health Rpt* 2, 171–178.
- Stellar, E. (1957). Physiological Psychology. *Annual Review of Psychology* 8, 415–436.
- St-Onge, M.-P., Roberts, A.L., Chen, J., Kelleman, M., O’Keeffe, M., RoyChoudhury, A., and Jones, P.J. (2011). Short sleep duration increases energy intakes but does not change energy expenditure in normal-weight individuals<sup>123</sup>. *Am J Clin Nutr* 94, 410–416.
- Szyjkowska, A., Bortkiewicz, A., Szymczak, W., and Makowiec-Dabrowska, T. (2005). Subjective symptoms related to mobile phone use—a pilot study. *Pol. Merkur. Lekarski* 19, 529–532.
- Tafti, Chollet, Valatx, and Franken (1999). Quantitative trait loci approach to the genetics of sleep in recombinant inbred mice. *Journal of Sleep Research* 8, 37–43.
- Taheri, S., Lin, L., Austin, D., Young, T., and Mignot, E. (2004). Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med.* 1, e62.
- Tahvanainen, K., Niño, J., Halonen, P., Kuusela, T., Laitinen, T., Länsimies, E., Hartikainen, J., Hietanen, M., and Lindholm, H. (2004). Cellular phone use does not acutely affect blood pressure or heart rate of humans. *Bioelectromagnetics* 25, 73–83.
- Takahashi, S., Kapa’s, L., Fang, J., and Krueger, J.M. (1995). An anti-tumor necrosis factor antibody suppresses sleep in rats and rabbits. *Brain Research* 690, 241–244.
- Tatone-Tokuda, F., Dubois, L., Ramsay, T., Girard, M., Touchette, E., Petit, D., and Montplaisir, J.Y. (2012). Sex differences in the association between sleep duration, diet and body mass index: a birth cohort study. *Journal of Sleep Research* 21, 448–460.
- Terzano, M.G., Parrino, L., Fioriti, G., Orofiamma, B., and Depoortere, H. (1990). Modifications of sleep structure induced by increasing levels of acoustic perturbation in normal subjects. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 76, 29–38.
- Thiessen, G.J. (1978). Disturbance of sleep by noise. *J. Acoust. Soc. Am.* 64, 216–222.
- Thorne, P.R., and Nuttall, A.L. (1987). Laser doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hearing Research* 27, 1–10.
- Tikhonova, G.I., Rubtsova, N.B., Pokhodzei, L.V., Kur’erov, N.N., Pal’tsev, I.P., Samusenko, T.G., and Lazarenko, N.V. (2004). Evaluation of occupational risk caused by exposure to electromagnetic rays. *Med Tr Prom Ekol* 30–34.

- Tononi, G., and Cirelli, C. (2003). Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Research Bulletin* 62, 143–150.
- Toth, L.A., and Krueger, J.M. (1988). Alteration of sleep in rabbits by *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun* 56, 1785–1791.
- Toth, L.A., and Rehg, J.E. (1998). Effects of sleep deprivation and other stressors on the immune and inflammatory responses of influenza-infected mice. *Life Sciences* 63, 701–709.
- Tuschl, H., Neubauer, G., Schmid, G., Weber, E., and Winker, N. (2000). Occupational exposure to static, ELF, VF and VLF magnetic fields and immune parameters. *Int J Occup Med Environ Health* 13, 39–50.
- Tuschl, H., Novak, W., and Molla-Djafari, H. (2006). In vitro effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells. *Bioelectromagnetics* 27, 188–196.
- Twyver, H.B.V., Levitt, R.A., and Dunn, R.S. (1966). The effects of high intensity white noise on the sleep pattern of the rat. *Psychon Sci* 6, 355–356.
- Ulrich-Lai, Y.M., Fulton, S., Wilson, M., Petrovich, G., and Rinaman, L. (2015). Stress Exposure, Food Intake, and Emotional State. *Stress* 18, 381–399.
- Usman, A.D., Ahmad, W.W., Ab Kadir, M.Z.A., Mokhtar, M., and Ariffin, R. (2012). Effect of radiofrequency electromagnetic field exposure on hematological parameters of mice. *World Applied Sciences Journal* 16, 656–664.
- Vallet, M., Gagneux, J.-M., Blanchet, V., Favre, B., and Labiale, G. (1983). Long term sleep disturbance due to traffic noise. *Journal of Sound and Vibration* 90, 173–191.
- Van Campen, L.E., Murphy, W.J., Franks, J.R., Mathias, P.I., and Toraason, M.A. (2002). Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. *Hear. Res.* 164, 29–38.
- Van Cauter, E., Plat, L., and Copinschi, G. (1998). Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep* 21, 553–566.
- Van Putten, L.M. (1958). The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 in vivo. *Blood* 13, 789–794.
- Vanderstraeten, J. (2009). GSM fields and health: an updated literature review. *Rev Med Brux* 30, 416–424.
- Veyret, B. (2010). Les communications sans fil et les radiofréquences. In *Champs électromagnétiques, environnement et santé*, (Springer, Paris), pp. 69–85.
- Vgontzas, A.N., Bixler, E.O., Chrousos, G.P., and Pejovic, S. (2008). Obesity and sleep disturbances: meaningful sub-typing of obesity. *Arch. Physiol. Biochem.* 114, 224–236.
- Vors, C., Nazare, J.-A., Michalski, M.-C., and Laville, M. (2014). Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'Homme. *Obésité* 9, 31–41.

- Wagner, P., Röschke, J., Mann, K., Hiller, W., and Frank, C. (1998). Human sleep under the influence of pulsed radiofrequency electromagnetic fields: A polysomnographic study using standardized conditions. *Bioelectromagnetics* *19*, 199–202.
- Wang, Y., Carreras, A., Lee, S., Hakim, F., Zhang, S.X., Nair, D., Ye, H., and Gozal, D. (2014). Chronic Sleep Fragmentation Promotes Obesity in Young Adult Mice. *Obesity (Silver Spring)* *22*, 758–762.
- Watanabe, M., Kikuchi, H., Tanaka, K., and Takahashi, M. (2010). Association of Short Sleep Duration with Weight Gain and Obesity at 1-Year Follow-Up: A Large-Scale Prospective Study. *Sleep* *33*, 161–167.
- Watts, C., Zaru, R., Prescott, A.R., Wallin, R.P., and West, M.A. (2007). Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* *19*, 73–78.
- Wesensten, N.J., Balkin, T.J., and Belenky, G. (1999). Does sleep fragmentation impact recuperation? A review and reanalysis. *Journal of Sleep Research* *8*, 237–245.
- Weyde, K.V., Krog, N.H., Oftedal, B., Evandt, J., Magnus, P., Øverland, S., Clark, C., Stansfeld, S., and Aasvang, G.M. (2017). Nocturnal Road Traffic Noise Exposure and Children's Sleep Duration and Sleep Problems. *Int J Environ Res Public Health* *14*.
- Wiert, J., Hadjem, A., Varsier, N., and Conil, E. (2011). Numerical dosimetry dedicated to children RF exposure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* *107*, 421–427.
- Wilén, J., Hörnsten, R., Sandström, M., Bjerle, P., Wiklund, U., Stensson, O., Lyskov, E., and Mild, K.H. (2004). Electromagnetic field exposure and health among RF plastic sealer operators. *Bioelectromagnetics* *25*, 5–15.
- Wilén, J., Johansson, A., Kalezic, N., Lyskov, E., and Sandström, M. (2006). Psychophysiological tests and provocation of subjects with mobile phone related symptoms. *Bioelectromagnetics* *27*, 204–214.
- Wilkinson, R.T., and Campbell, K.B. (1984). Effects of traffic noise on quality of sleep: assessment by EEG, subjective report, or performance the next day. *J. Acoust. Soc. Am.* *75*, 468–475.
- Wilson, B.W., Matt, K.S., Morris, J.E., Sasser, L.B., Miller, D.L., and Anderson, L.E. (1999). Effects of 60 Hz magnetic field exposure on the pineal and hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Bioelectromagnetics* *20*, 224–232.
- Wright, J.W., Dengerink, H.A., Miller, J.M., and Goodwin, P.C. (1985). Potential role of angiotensin II in noise-induced increases in inner ear blood flow. *Hearing Research* *17*, 41–46.
- Wysocki, A.B. (1996). The effect of intermittent noise exposure on wound healing. *Adv Wound Care* *9*, 35–39.
- Xu, S., Zhou, Z., Zhang, L., Yu, Z., Zhang, W., Wang, Y., Wang, X., Li, M., Chen, Y., Chen, C., et al. (2010). Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. *Brain Research* *1311*, 189–196.

Yan, J.-G., Agresti, M., Bruce, T., Yan, Y.H., Granlund, A., and Matloub, H.S. (2007). Effects of cellular phone emissions on sperm motility in rats. *Fertility and Sterility* 88, 957–964.

Yee, K.S. (1966). Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equations in isotropic Media.

Young, L.D., Richter, J.E., Anderson, K.O., Bradley, L.A., Katz, P.O., McElveen, L., Obrecht, W.F., Dalton, C., and Snyders, R.M. (1987). The Effects of Psychological and Environmental Stressors on Peristaltic Esophageal Contractions in Healthy Volunteers. *Psychophysiology* 24, 132–141.

Yuan, Z.-Q., Li, F., Wang, D.-G., Wang, Y., and Zhang, P. (2004a). [Effect of low intensity and very high frequency electromagnetic radiation on occupationally exposed personnel]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 22, 267–269.

Yuan, Z.-Q., Li, F., Wang, D.-G., Wang, Y., and Zhang, P. (2004b). Effect of low intensity and very high frequency electromagnetic radiation on occupationally exposed personnel. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 22, 267–269.

Zeni, O., Di Pietro, R., d'Ambrosio, G., Massa, R., Capri, M., Naarala, J., Juutilainen, J., and Scarfi, M.R. (2007). Formation of Reactive Oxygen Species in L929 Cells after Exposure to 900 MHz RF Radiation with and without Co-exposure to 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone. *Radiation Research* 167, 306–311.

Zheng, K.-C., and Ariizumi, M. (2007). Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *J Occup Health* 49, 32–38.

Zymantiene, J., Zelvyte, R., Pampariene, I., Aniuliene, A., Juodziukyniene, N., Kantautaite, J., and Oberauskas, V. (2017). Effects of long-term construction noise on health of adult female Wistar rats. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 20.

(1997). Possible health implications of subjective symptoms and electromagnetic fields: a report prepared by a European group of experts for the European Commission, DG V (Solna: Arbetslivsinstitutet).

(2009a). Transport at a crossroads: TERM 2008: indicators tracking transport and environment in the European Union (Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities).

(2009b). Night noise guidelines for Europe (Copenhagen, Denmark: World Health Organization Europe).