



HAL
open science

Effets des signaux RF environnementaux de cinquième génération sur l'activité électrique des neurones en culture

Anne Canovi

► **To cite this version:**

Anne Canovi. Effets des signaux RF environnementaux de cinquième génération sur l'activité électrique des neurones en culture. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0257 . tel-04394657

HAL Id: tel-04394657

<https://theses.hal.science/tel-04394657v1>

Submitted on 15 Jan 2024

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Anne CANOVI

**EFFETS DES SIGNAUX RF ENVIRONNEMENTAUX DE
CINQUIÈME GÉNÉRATION SUR L'ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE
DES NEURONES EN CULTURE**

Sous la direction de Yann PERCHERANCIER et Noëlle LEWIS

Soutenue le 25 Octobre 2023

Membres du jury :

M. Yann PERCHERANCIER , Directeur de recherche CNRS	Directeur de thèse
Mme Noëlle LEWIS , Professeure des universités UNIVERSITÉ DE BORDEAUX	Co-directrice de thèse
M. Jean-Marc EDELIN , Directeur de recherche CNRS	Rapporteur
M. Julien MODOLO , Chargé de recherche INSERM	Rapporteur
Mme Anne-Karine BOUZIER-SORE , Directrice de recherche CNRS	Présidente
Mme Claire DALMAY , Maître de conférences UNIVERSITÉ DE LIMOGES	Examinatrice

Membres invités :

Mme Florence POULLETIER DE GANNES , Ingénieure de recherche CNRS	Co-encadrante
M. André GARENNE , Maître de conférences UNIVERSITÉ DE BORDEAUX	Co-encadrant

Thèse réalisée dans le laboratoire **IMS** au sein de l'équipe **SANE**.
Université de Bordeaux
CNRS UMR-5218
351 Cours de la Libération
33405 TALENCE Cedex
France

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Julien Modolo et Jean-Marc Edeline pour le temps et l'expertise qu'ils ont consacrés en tant que rapporteurs de ma thèse. Mes remerciements s'adressent également aux autres membres de mon jury, Claire Dalmay et Anne-Karine Bouzier-Sore, qui ont pris le temps d'assister à ma soutenance de thèse. Merci à chacun d'entre vous pour votre intérêt pour mes travaux de recherche et pour les discussions intéressantes et stimulantes qui ont suivi ma présentation.

Je tiens ensuite à remercier mes directeurs de thèse, Noëlle Lewis et Yann Percherancier, pour la confiance qu'ils m'ont accordée pour mener à bien ce projet de thèse. Merci de m'avoir permis de vivre cette aventure interdisciplinaire, une expérience que je n'échangerais pour rien au monde. Les mots me manquent, mais je tiens sincèrement à vous remercier pour votre présence, vos conseils avisés, et votre soutien constant tout au long de cette thèse. Noëlle, nos longues discussions hebdomadaires en salle de réunion me manqueront. Merci d'avoir toujours été là dans mes moments de doute comme dans mes moments de joie. Merci également pour tes gestes attentionnés, comme les petits chocolats et gâteaux que tu m'apportais de temps en temps. Yann, un grand merci pour ton dynamisme à toute épreuve et ta joie de vivre au quotidien. Merci également pour ta grande disponibilité, une qualité que j'estime particulièrement. Entre Noëlle et toi, je ne pouvais rêver d'un meilleur encadrement.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Florence, celle que j'appelle « ma maman du laboratoire ». Sans toi, cette expérience qu'est la thèse aurait été bien différente. Un immense merci pour ton soutien sans faille, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel. Tu as toujours été à l'écoute et nos discussions quotidiennes me manqueront. Merci pour tous les moments que nous avons partagés, notamment notre voyage au Japon, qui restera l'un de mes meilleurs souvenirs à tes côtés.

Tout naturellement, je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe SANE. C'était un véritable plaisir d'évoluer à vos côtés durant ces trois années. Tout d'abord, merci à Lorenza, mon binôme de thèse, et à Rosa, pour tous les moments partagés en dehors du laboratoire, ainsi que pour avoir toujours été présentes quand j'en avais besoin. Merci également à Alexandre et Yann Chappe, qui ont été d'un grand soutien dans la première partie de ma thèse et qui continuent à prendre régulièrement de mes nouvelles. Nos longues pauses café avec Alexandre, où nous refaisons le monde, et le fameux « Alors ça spike ? » de Yann resteront dans ma mémoire. Merci également à André et Patricia pour leur aide précieuse tout au long de mon parcours de thèse, que ce soit pour l'analyse statistique de mes données ou la réalisation des cultures de neurones. Enfin, un grand merci à Annabelle, Isabelle, Jana, Léna et Emilie, pour leur contribution dans cette belle expérience de ma vie.

Je tiens maintenant à remercier tous les autres membres de l'IMS et du groupe « bioélectronique » pour l'ambiance familiale et chaleureuse qui règne au sein du laboratoire. Je remercie tout particulièrement

certaines de mes collègues qui, au fil du temps, sont devenus des amis : Alexia, Loïc, Marie et Roland. Merci d'avoir toujours été à l'écoute, merci pour nos pauses repas (souvent trop longues) où nous discutons de tout et de rien, merci pour nos afterworks, nos soirées jeux de société ou encore nos soirées cinéma. Merci pour tous ces moments qui m'ont permis de me changer les idées quand j'en avais besoin. Un grand merci également pour votre aide avec Word pendant la rédaction de mon manuscrit, avec une mention spéciale pour Loïc, qui est tout aussi perfectionniste (ou dingue) que moi. J'espère sincèrement que nous resterons en contact et je vous souhaite tout le meilleur pour la suite de vos vies professionnelles et personnelles.

Je remercie également mes collègues du laboratoire XLIM à Limoges, Délia Arnaud-Cormos et Philippe Lévêque, pour les discussions scientifiques et les échanges que nous avons eus, ainsi que pour leur précieuse aide concernant le système d'exposition et sa dosimétrie. Merci aussi à Bernard Veyret, pour son temps et ses précieux conseils tout au long de ma thèse.

Merci à mes amis pour leur grand soutien et leur accompagnement durant ces trois années de thèse. Merci à Léa et Alexia, mes copines bordelaises, d'avoir toujours été là dans les moments importants. Sans vous, ces trois dernières années auraient été bien différentes. J'en profite également pour vous féliciter, car nous sommes maintenant toutes Dr. de l'Université de Bordeaux. Sachez que je suis très fière de vous. Merci à Manon et Felipe, qui malgré la distance, ont toujours été à l'écoute et de bons conseils.

Pour terminer, je voudrais sincèrement remercier l'ensemble de ma famille, qui occupe une place importante dans ma vie. J'ai une pensée particulière pour mes grands-parents (Dad, Mamo, Papi et Mamie). Je suis reconnaissante pour les valeurs que vous m'avez transmises et c'est en partie grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Enfin, je voudrais dire un IMMENSE merci à mes parents, à qui je dois tout. Vous avez toujours été les premiers à croire en moi, à me soutenir dans toutes les épreuves de ma vie, et à m'encourager quel que soit le chemin que je choisisse. Pour toutes ces raisons, c'est à vous que je dédie ce manuscrit de thèse, en espérant que vous en serez fiers. Même si je ne le dis pas souvent, sachez que je vous aime.

Tables des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	9
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE	11
1.1. LES CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES ET LE TELEPHONE PORTABLE	12
1.1.1. Quelques généralités sur les ondes électromagnétiques	12
1.1.2. Évolution de la téléphonie mobile	14
1.1.2.1. Précédentes générations de téléphonie mobile : de la 1G à la 4G.....	14
1.1.2.2. Nouvelle génération de téléphonie mobile : la 5G.....	15
1.1.3. Interaction des champs électromagnétiques radiofréquences avec la matière vivante	17
1.1.3.1. Interaction avec les champs électriques.....	17
1.1.3.2. Interaction avec les champs magnétiques	18
1.1.3.3. Propagation de l'onde électromagnétique, réflexion et absorption	19
1.1.3.4. Synthèse des effets de l'interaction des champs électromagnétiques avec le vivant	20
1.1.3.5. Quantification de l'absorption d'énergie électromagnétique	21
1.1.4. Les normes d'exposition aux ondes électromagnétiques.....	22
1.1.5. Problématiques sociétales liées à l'utilisation du téléphone portable	24
1.2. EFFET DES RADIOFREQUENCES SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC)	26
1.2.1. Cible biologique d'intérêt : le Système Nerveux Central (SNC).....	26
1.2.1.1. Cellules gliales	27
1.2.1.2. Neurons et neurotransmission.....	28
1.2.2. Techniques d'électrophysiologie.....	35
1.2.2.1. L'électroencéphalogramme (EEG).....	35
1.2.2.2. Technique d'enregistrement intracellulaire : exemple du patch-clamp	36
1.2.2.3. Technique d'enregistrement extracellulaire : exemple des matrices de microélectrodes (MEA)	37
1.2.3. État de la recherche sur les effets biologiques des RF sur le système nerveux	40
1.2.3.1. Étude de l'effet des RF chez l'Homme.....	40
1.2.3.2. Étude de l'effet des RF chez les animaux (in vivo)	42
1.2.3.3. Étude de l'effet des RF sur des modèles cellulaires (in vitro)	48
1.2.4. Problématique de ma thèse	55
1.2.4.1. Contexte sociétal et technologique de ma thèse	55
1.2.4.2. Question scientifique.....	55
1.2.4.3. Approche expérimentale.....	56
1.2.4.4. Axes de travail de la thèse	56
1.2.4.5. Cadre du travail et collaborations	56
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS	59
2.1. EFFET D'UNE EXPOSITION AUX SIGNAUX 5G A 3,5 GHz SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE DES NEURONES (ARTICLE).....	60
2.1.1. Introduction à l'article	60
2.1.1.1. Modèle biologique et technique d'électrophysiologie	60
2.1.1.2. Système d'électrophysiologie in vitro sous radiofréquences	62

2.1.2.	Article Canovi et al., 2023	65
2.2.	EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE DES NEURONES.....	80
2.2.1.	Contexte de l'étude	80
2.2.2.	Matériels et méthodes.....	80
2.2.2.1.	Culture de neurones et système de chauffage des cellules par conduction	80
2.2.2.2.	Protocole d'enregistrement.....	84
2.2.2.3.	Acquisition, traitement et analyses des données.....	84
2.2.2.4.	Réglage des profils de température.....	85
2.2.3.	Résultats	89
2.2.3.1.	Effet de la vitesse de montée en température sur l'activité neuronale	90
2.2.3.2.	Effet de l'amplitude de l'augmentation de la température sur l'activité neuronale	91
2.2.4.	Discussion	92
2.2.4.1.	Effet inhibiteur important de la cinétique « lente »	92
2.2.4.2.	Effet inhibiteur moindre de la cinétique « rapide »	92
2.2.4.3.	Comparaison des effets cinétique « lente » et cinétique « rapide »	93
2.2.4.4.	Commentaire sur les expériences avec un saut de température de 2°C et une cinétique « très rapide ».....	93
2.2.4.5.	Comparaison des effets de l'exposition aux RF et du chauffage par conduction des neurones	93
CHAPITRE 3 :	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	95
3.1.	CONCLUSION.....	96
3.2.	PERSPECTIVES A COURT TERME.....	97
3.3.	PERSPECTIVES A LONG TERME.....	98
CHAPITRE 4 :	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	101

Liste des abréviations

1G : Première génération de téléphonie mobile

2G : Deuxième génération de téléphonie mobile

3G : Troisième génération de téléphonie mobile

4G : Quatrième génération de téléphonie mobile

5G : Cinquième génération de téléphonie mobile

ANFR : Agence Nationale des Fréquences

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire

CEM : Champs électromagnétiques

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CW : Continuous Wave

DAS : Débit d'Absorption Spécifique

DIV : Days In Vitro

DPI : Densité de Puissance Incidente

EDGE : Enhanced Data Rate for GSM Evolution

EEG : Électroencéphalogramme

FDTD : Finite Difference Time Domain

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

Gbps : Gigabits par seconde

GPRS : General Packet Radio Service

GSM : Global System for Mobile

ICNIRP : International Commission on Non-Ionizing radiation Protection

iGluR : Récepteurs ionotropiques du glutamate

ITO : Oxyde d'indium-étain

Kbps : Kilobits par seconde

LPS : Lipopolysaccharide

LTE : Long Term Evolution

MBD : Mean Burst Duration

Mbps : Mégabits par seconde

MBR : Mean Bursting Rate

MCS : Multi-Channel Systems

MEA : Matrices de Microélectrodes ou Microelectrodes Arrays

MFR : Mean Firing Rate

MGluR : Récepteurs métabotropiques du glutamate

MIMO : Multiple Input Multiple Output

MMS : Multimedia Message Service

M_{OB}FR : Mean Outside Burst Firing Rate

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

PCB : Carte de circuits imprimés

PPS : Potentiels Post-Synaptiques

PPSE : Potentiels Post-Synaptiques Excitateurs

PPSI : Potentiels Post-Synaptiques Inhibiteurs

RF : Radiofréquences

SiN : Nitrure de Silicium

SMS : Short Message Service

SNC : Système Nerveux Central

SSM : Autorité Suédoise de Radioprotection

TEM : Transverse électromagnétique

TETRA : Terrestrial Trunked Radio

TiN : Nitrure de Titane

UMTS : Universal Mobile Telecommunications System

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

La première partie de ce chapitre est dédiée à l'introduction de concepts fondamentaux tels que les champs électromagnétiques et leurs interactions avec la matière vivante. Elle passe également en revue les différentes générations de téléphonie mobile, de la plus ancienne à la plus récente, tout en rappelant les normes établies concernant l'exposition des populations aux champs électromagnétiques.

La seconde partie de ce chapitre contient une description approfondie du système nerveux central (SNC) ainsi que des différents types cellulaires qui le constituent. Cette partie offre également une présentation des diverses méthodes d'électrophysiologie disponibles pour enregistrer l'activité électrique des neurones et met en avant les avancées de la recherche concernant les effets biologiques des radiofréquences (RF) sur le SNC. Ce chapitre s'achève sur l'énoncé de la problématique de mes travaux de thèse.

1.1. Les champs électromagnétiques et le téléphone portable

1.1.1. Quelques généralités sur les ondes électromagnétiques

Une **onde électromagnétique** correspond aux oscillations couplées d'un champ électrique (\vec{E}) et d'un champ magnétique (\vec{B}), dont les amplitudes varient de façon sinusoïdale au cours du temps (Figure 1). Ces deux champs, perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière (3×10^8 m/s).

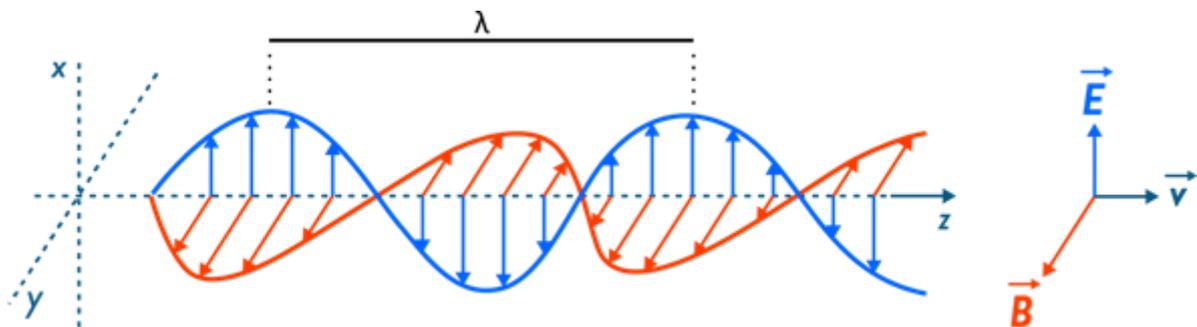


Figure 1 - Schéma d'une onde électromagnétique décomposée en deux champs : électrique et magnétique.

Les ondes électromagnétiques sont caractérisées par plusieurs grandeurs physiques :

- La **fréquence** (f) correspondant au nombre d'oscillations par seconde et s'exprimant en Hertz (Hz),
- La **longueur d'onde** (λ) correspondant à la distance qui sépare deux oscillations et s'exprimant en mètre (m).

Ces deux paramètres sont liés par la vitesse de propagation de l'onde (c), exprimée en mètre par seconde ($m.s^{-1}$), selon l'équation suivante :

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (1)$$

Ce sont les propriétés du milieu à travers lequel l'onde se propage qui déterminent la vitesse de propagation. Par conséquent, la longueur d'onde et la fréquence sont inversement proportionnelles.

Le **spectre électromagnétique** représente l'ensemble des ondes électromagnétiques existantes, classées selon leur longueur d'onde ou leur fréquence. Ce spectre contient une large gamme de rayonnements, comprenant par ordre croissant de fréquences : les très basses fréquences, les radiofréquences, l'infrarouge, la lumière visible, les ultraviolets, les rayons X et les rayons gamma. La [Figure 2](#) présente des exemples d'applications utilisant ces rayonnements.

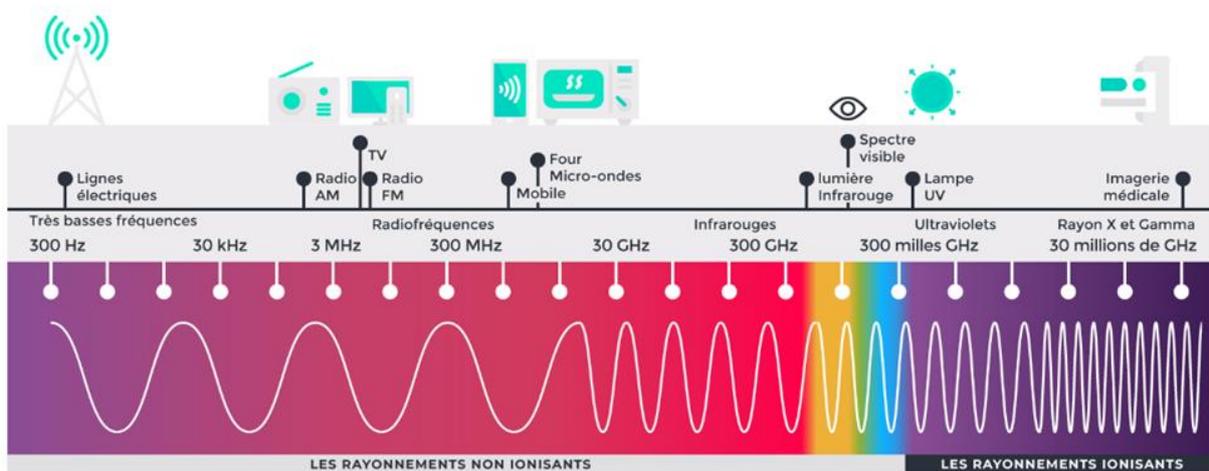


Figure 2 - Le spectre électromagnétique.

Il existe deux catégories de rayonnements : les rayonnements ionisants et non-ionisants. À la différence des rayonnements non-ionisants, les rayonnements ionisants transportent suffisamment d'énergie pour provoquer des modifications des molécules de la matière vivante. Par conséquent, ils sont associés à des risques pour la santé et nécessitent une surveillance et des précautions appropriées. Les rayonnements non-ionisants, quant à eux, sont souvent considérés comme moins dangereux mais des précautions sont toujours nécessaires, surtout lors d'une exposition prolongée ou répétée.

Cette thèse se focalisera sur les **radiofréquences** (RF) qui sont des ondes électromagnétiques dont les fréquences sont comprises entre 100 kHz et 300 GHz. Les RF sont utilisées dans de nombreux domaines tels que les communications sans fil, la radiodiffusion, la télévision et la radiocommunication militaire.

1.1.2. Évolution de la téléphonie mobile

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs générations de téléphonie mobile se sont succédées, offrant des débits croissants de données échangées et permettant aux utilisateurs de passer des simples conversations vocales aux sms, puis aux applications internet et aux flux vidéo (Figure 3).

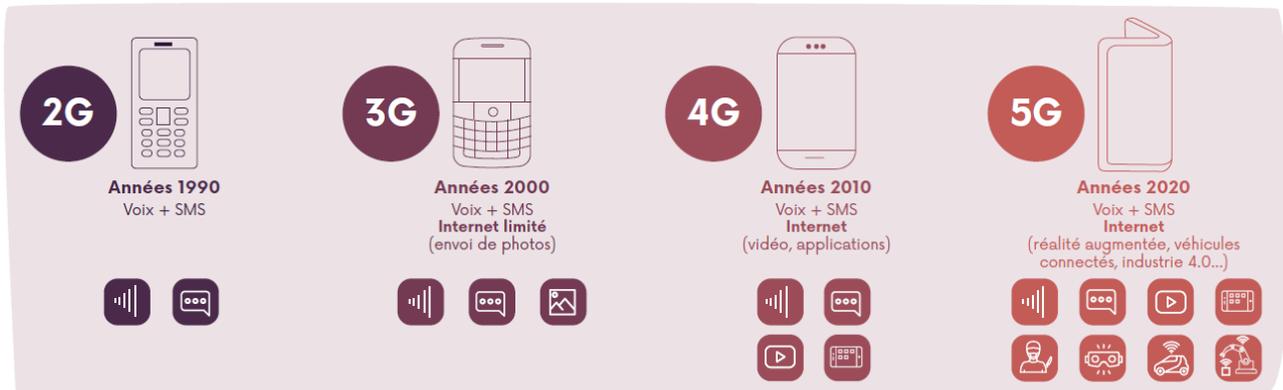


Figure 3 - Représentation chronologique de l'apparition des différentes générations de téléphonie mobile et exemples d'application.

1.1.2.1. Précédentes générations de téléphonie mobile : de la 1G à la 4G

La **première génération de téléphonie mobile** (1G) est apparue en 1979 au Japon et se limitait aux échanges vocaux dans le cadre d'appels téléphoniques. Cette technologie analogique offrait un débit d'environ 2,4 kilobits par seconde (kbps) et utilisait une onde porteuse dont la fréquence était comprise entre 850 et 900 MHz.

La **deuxième génération de téléphonie mobile** (2G), entièrement numérique, est apparue vers la fin des années 80, rendant les réseaux de première génération obsolètes. Cette technologie était plus fiable grâce à un cryptage des données transmises et bien plus performante que la première génération en proposant un débit maximal de 9,6 kbps. Avec la 2G, il était possible de transmettre la voix mais également des données numériques de faible volume comme par exemple des SMS (Short Message Service) et des MMS (Multimedia Message Service). En Europe et aux États-Unis, la 2G reposait essentiellement sur la norme GSM (Global System for Mobile) qui utilisait les fréquences porteuses de 900 et 1800 MHz (850 et 1900 MHz aux États-Unis). La norme GSM évolua au cours du temps, conduisant au développement de réseaux encore plus performants connus sous le nom de GPRS (General Packet Radio Service) et EDGE (Enhanced Data Rate for GSM Evolution). Le GPRS, qu'on appelle également 2,5G ou 2G+, permet d'augmenter le débit moyen de transfert des données à 48 kbps. Avec le EDGE (ou 2,75G), le débit moyen augmenta davantage jusqu'à atteindre 171 kbps. Aujourd'hui, bien que la 2G soit devenue obsolète dans de nombreuses régions, elle reste utilisée dans certaines zones rurales.

Dans les années 2000, c'est la **troisième génération de téléphonie mobile (3G)** qui fit son apparition. En Europe, elle est principalement représentée par la norme UMTS (Universal Mobile Telecommunications System) qui propose de hauts débits de transmission, en moyenne à 384 kbps. Cette technologie offre aux utilisateurs un accès à Internet et permet notamment le visionnage de vidéos en ligne, l'accès à la géolocalisation etc. En France, les réseaux 3G utilisent les bandes de fréquences de 900 et 2100 MHz. Des améliorations ont été progressivement apportées à cette génération de téléphonie mobile, comme la norme HSPA+ (que l'on connaît majoritairement sous le nom de H+) qui présente des débits encore supérieurs d'environ 5 mégabits par seconde (Mbps) en moyenne.

En 2013, la **quatrième génération de téléphonie mobile (4G)** fut déployée et révolutionna davantage l'industrie des télécommunications en proposant des vitesses de transmission des données encore plus rapides, allant de 75 à 150 Mbps. Cette technologie permet ainsi de télécharger des fichiers volumineux en quelques secondes, de diffuser des vidéos en haute définition sans interruption et de naviguer sur internet de manière plus fluide. Basée sur la norme LTE (Long Term Evolution), la 4G utilise des bandes de fréquences comprises entre 700 et 2600 MHz. Elle est aujourd'hui la norme pour la plupart des réseaux de téléphonie mobile dans le monde. Cependant, les bandes de fréquences utilisées par la 4G sont très encombrées à cause de l'augmentation du nombre d'utilisateurs et du volume de données échangées. Cette saturation est aggravée par l'émergence des besoins de commande en temps réel d'objets connectés, rendant nécessaire le déploiement d'une nouvelle génération de téléphonie mobile : la **cinquième génération de téléphonie mobile (5G)**.

1.1.2.2. Nouvelle génération de téléphonie mobile : la 5G

La technologie 5G, actuellement en cours de déploiement, permettra, à terme, d'améliorer significativement l'accès aux services proposés par les réseaux 4G.

La 5G offrira notamment des performances supérieures pour répondre aux besoins croissants des utilisateurs en multipliant les débits, qui seront jusqu'à 10 fois plus rapides et atteindront plusieurs gigabits par seconde (Gbps). Elle devrait également réduire considérablement les délais de transmission en divisant par 10 le temps de latence par rapport aux réseaux existants. Enfin, la 5G offrira une densité de connexion accrue, permettant de connecter simultanément jusqu'à 10 fois plus d'objets. Par conséquent, la 5G facilitera la numérisation de la société en permettant le développement de nouvelles utilisations pour les particuliers et les entreprises dans de nombreux domaines tels que la santé (télémédecine, téléchirurgie etc.), les transports (voiture autonome, système de transport intelligent etc.), l'industrie (robotique, automatisation etc.), le divertissement (réalité virtuelle, vidéo ultra HD etc.) et bien d'autres encore ([Figure 4](#)).

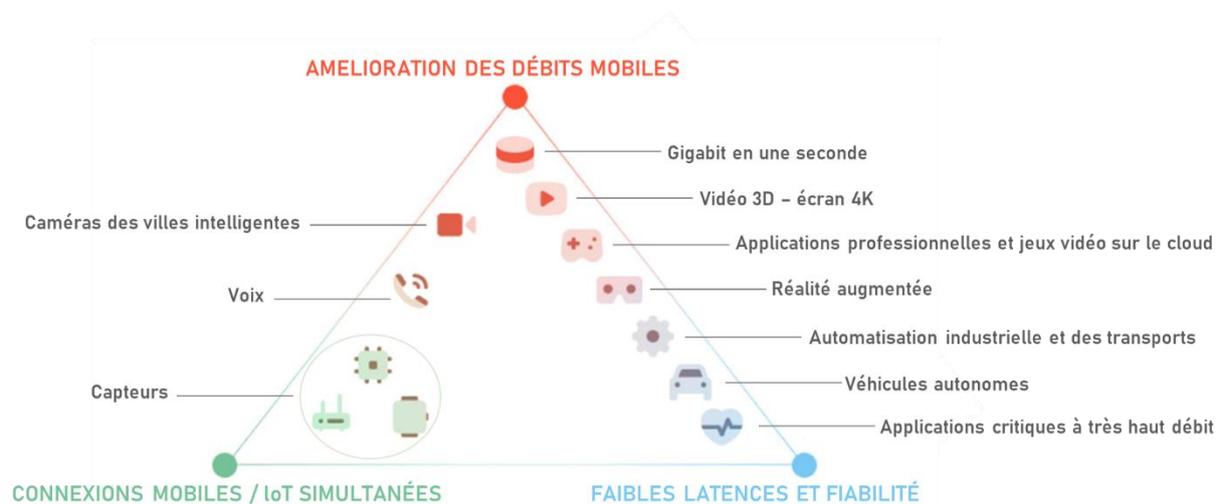


Figure 4 - Catégories d'usage de la 5G.

Pour favoriser les échanges de données sans engorger les réseaux actuels qui arrivent déjà à saturation, deux nouvelles bandes de fréquences ont été allouées à la 5G : 3,5 et 26 GHz qui coexisteront avec celles des précédentes générations de téléphonie mobile. L'utilisation de bandes de fréquences plus élevées présente cependant quelques contraintes physiques. En effet, plus la fréquence est élevée, moins l'onde peut traverser les obstacles tels que les bâtiments et les arbres. De ce fait, les fréquences hautes, comme 26 GHz, ont une portée plus limitée par rapport aux fréquences utilisées par les autres générations de téléphonie mobile. Cette contrainte nécessitera de revoir l'infrastructure des réseaux en combinant plusieurs nouvelles technologies d'antennes : le massive MIMO (Multiple Input Multiple Output), les small-cells et le beamforming (Joseph, 2022).

Le **massive MIMO** est une technologie qui utilise un grand nombre d'antennes sur la station de base pour permettre une transmission simultanée de multiples flux de données vers de nombreux utilisateurs. Les **small-cells**, quant à elles, sont des antennes de petites tailles qui peuvent être installées dans des zones où le trafic est dense, comme les centres-villes ou les stades. En utilisant cette technologie, les utilisateurs peuvent bénéficier d'une connexion plus rapide et plus stable, même dans les environnements les plus chargés. Enfin, le **beamforming** est une technique qui permet de diriger les signaux vers des utilisateurs spécifiques en utilisant des faisceaux d'antennes. Cela permet d'augmenter la portée du signal et de minimiser les interférences, ce qui peut améliorer la qualité de la connexion pour les utilisateurs situés à une plus grande distance de la station de base. De plus, contrairement aux antennes traditionnelles qui émettent en permanence dans toutes les directions, le beamforming permet de ne pas gaspiller d'énergie, réduisant ainsi l'exposition aux champs électromagnétiques autour des antennes relais (Figure 5).

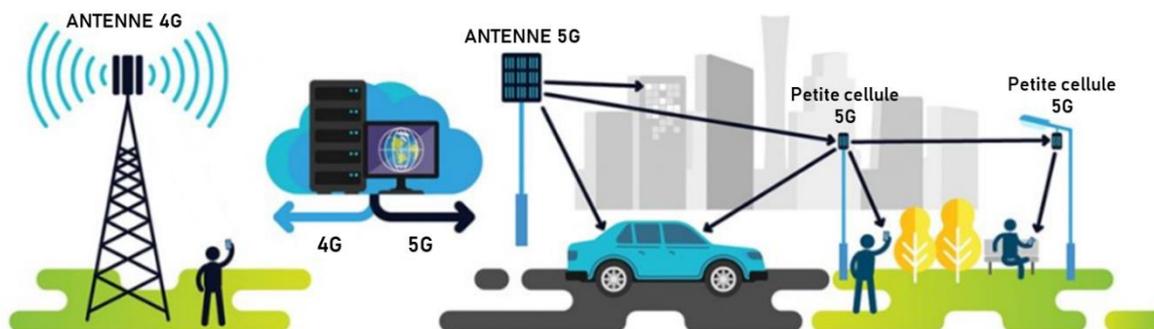


Figure 5 - Comparaison entre les technologies 4G et 5G.

Ces évolutions technologiques vont modifier l'exposition de la population aux champs électromagnétiques (nouvelles fréquences, antennes dirigées, etc.). Par conséquent, ces changements suscitent de nouvelles préoccupations quant aux effets potentiels de l'exposition aux RF sur la santé humaine.

1.1.3. Interaction des champs électromagnétiques radiofréquences avec la matière vivante

Comme décrit précédemment (partie 1.1.1 de la thèse), un champ électromagnétique se compose d'un champ électrique et d'un champ magnétique alternatifs.

Il existe trois mécanismes d'interaction fondamentaux par lesquels les champs électriques ou magnétiques variables dans le temps interagissent avec la matière vivante : le couplage avec les champs électriques, le couplage avec les champs magnétiques et enfin l'absorption d'énergie provenant des champs électromagnétiques (INRS, 2018, 2001).

1.1.3.1. Interaction avec les champs électriques

Un champ électrique \vec{E} , dont l'intensité s'exprime en Volts par mètre ($V.m^{-1}$), exerce des forces sur les entités chargées et provoque :

- le déplacement des charges libres, créant un courant électrique d'intensité I exprimée en Ampères (A),
- la polarisation des charges liées, formant des dipôles électriques,
- la réorientation des dipôles électriques déjà présents dans les tissus.

L'importance relative de ces différents effets dépend des **propriétés électriques des tissus**, qui comprennent :

- La **conductivité électrique** (σ), mesurée en Siemens par mètre ($S.m^{-1}$), déterminant l'écoulement du courant électrique dont la densité (J), exprimée en Ampères par mètre carré ($A.m^{-2}$), peut être calculée à partir de la loi d'Ohm : $J = \sigma.E$.
- La **permittivité diélectrique** (ϵ), exprimée en Farads par mètre ($F.m^{-1}$), déterminant l'ampleur des phénomènes de polarisation.

La conductivité et la permittivité varient selon les tissus biologiques et dépendent également de la fréquence du champ électrique (**Tableau 1**, d'après la base de données de IT'IS Foundation¹).

En ce qui concerne les interactions dipolaires, le champ électrique interagit principalement avec les molécules d'eau qui constituent la majeure partie des molécules du corps humain (98%). En présence d'un champ électrique, de telles molécules s'orientent selon la direction du champ. Dans le cas d'un champ électrique variable dans le temps, les molécules polaires s'orientent en changeant de sens périodiquement. Ce mouvement est d'autant plus rapide que la fréquence du champ électrique augmente et aura pour effet l'échauffement de la matière environnante par friction des molécules entre-elles. Cet échauffement peut être à l'origine d'une élévation de la température des tissus. Nous reviendrons de façon spécifique sur ce phénomène d'absorption d'énergie par la matière vivante.

1.1.3.2. Interaction avec les champs magnétiques

Les champs magnétiques peuvent exercer des forces physiques sur les entités chargées mais seulement lorsqu'elles sont en mouvement. Il est possible de caractériser un champ magnétique de deux façons différentes, soit à travers la densité du flux magnétique \vec{B} , exprimée en Teslas (T), soit par l'intensité du champ magnétique \vec{H} , exprimée en Ampères par mètre ($A.m^{-1}$). Ces deux grandeurs sont liées par la formule : $\vec{B} = \mu.\vec{H}$, où la constante de proportionnalité μ est appelée **perméabilité magnétique** et s'exprime en Henrys par mètre ($H.m^{-1}$). Dans le vide et dans l'air, comme dans les matériaux non magnétiques (incluant les matériaux biologiques), cette perméabilité reste constante ($\mu = 4\pi.10^{-7} H.m^{-1}$).

¹ Base de données de IT'IS Foundation sur les propriétés diélectriques des tissus (<https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/dielectric-properties/>)

L'interaction entre un champ magnétique variable dans le temps et le corps humain génère des champs électriques induits et par conséquent la circulation de courants électriques (eux-mêmes qualifiés de **courants induits**). Le trajet et l'intensité de ces courants induits dans une partie du corps dépendent, comme nous le précisons précédemment, de la conductivité électrique des tissus considérés. L'intensité de ces courants dépend également de la densité du flux magnétique \vec{B} et de sa vitesse de variation.

1.1.3.3. Propagation de l'onde électromagnétique, réflexion et absorption

Lorsqu'une onde électromagnétique entre en contact avec le corps humain, une partie de son énergie est réfléchi tandis que l'autre est absorbée par les tissus biologiques. L'absorption et la réflexion de cette onde dépendent des propriétés électriques des tissus (conductivité et permittivité diélectrique) (Perrin and Souques, 2010; INRS, 2001). Comme nous le signalons précédemment, la composition des tissus (par exemple la teneur en eau, en protéines, en graisses, en sels etc.) ainsi que la fréquence de l'onde sont des facteurs clés qui influencent ces propriétés, et par extension la **profondeur de pénétration** (δ) (Tableau 1). Par conséquent, l'absorption des ondes électromagnétiques ne sera pas homogène dans l'ensemble du corps en raison des différences de composition des organes. Par exemple, les liquides biologiques, tels que le sang et le liquide céphalo-rachidien, absorbent davantage les ondes que les tissus osseux ou adipeux. De plus, la profondeur de pénétration dans les tissus diminue lorsque la fréquence de l'onde électromagnétique augmente (Figure 6).

CERVEAU	SANG	OS
1,8 GHz		
$\sigma = 1,71 \text{ S/m}$	$\sigma = 2,04 \text{ S/m}$	$\sigma = 0,275 \text{ S/m}$
$\epsilon = 46,1$	$\epsilon = 59,4$	$\epsilon = 11,8$
$\delta = 9,07 \text{ mm}$	$\delta = 8,30 \text{ mm}$	$\delta = 22,62 \text{ mm}$
3,5 GHz		
$\sigma = 2,86 \text{ S/m}$	$\sigma = 3,57 \text{ S/m}$	$\sigma = 0,615 \text{ S/m}$
$\epsilon = 43,1$	$\epsilon = 56,5$	$\epsilon = 43,1$
$\delta = 5,03 \text{ mm}$	$\delta = 4,50 \text{ mm}$	$\delta = 10,85 \text{ mm}$

Tableau 1 – Propriétés électriques de différents tissus (σ et ϵ) et profondeur de pénétration (δ) en fonction de la fréquence d'exposition.

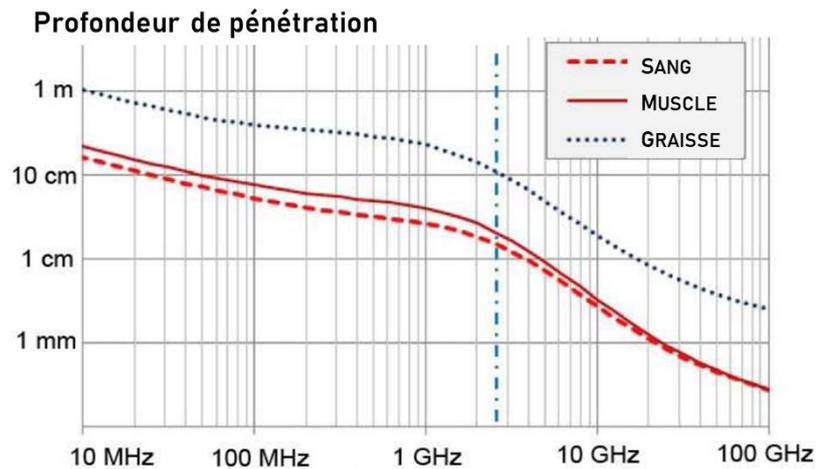


Figure 6 - Profondeur de pénétration des champs radiofréquences compris entre 10 MHz et 100 GHz dans différents types de tissus. La ligne verticale en pointillés correspond à la fréquence de 2,45 GHz (Staebler, 2017).

1.1.3.4. Synthèse des effets de l'interaction des champs électromagnétiques avec le vivant

Les champs électromagnétiques ont des effets directs sur le vivant à partir d'un certain seuil d'exposition. Ces effets diffèrent selon la fréquence du champ électromagnétique en question (Figure 7). Dans la plage de fréquences allant jusqu'à 100 kHz, les champs électriques et magnétiques peuvent entraîner une stimulation des tissus excitables (nerfs périphériques et muscles). Cela se produit en raison de leur capacité à générer des courants électriques dans ces tissus, ce qui peut provoquer des sensations telles que des fourmillements ou des contractions musculaires. Des effets transitoires et réversibles peuvent également être ressentis (phosphènes², goût métallique dans la bouche, vertiges) et ces effets sont dits non thermiques. Au-dessus de 10 MHz et jusqu'à 300 GHz, les champs électromagnétiques peuvent entraîner un échauffement des tissus biologiques (effets dits thermiques). Aux fréquences intermédiaires, comprises entre 100 kHz et 10 MHz, les effets non thermiques et thermiques coexistent, bien que les effets thermiques prédominent généralement dans cette plage de fréquences.

² Phosphènes : Perception visuelle, sous forme de scintillement.

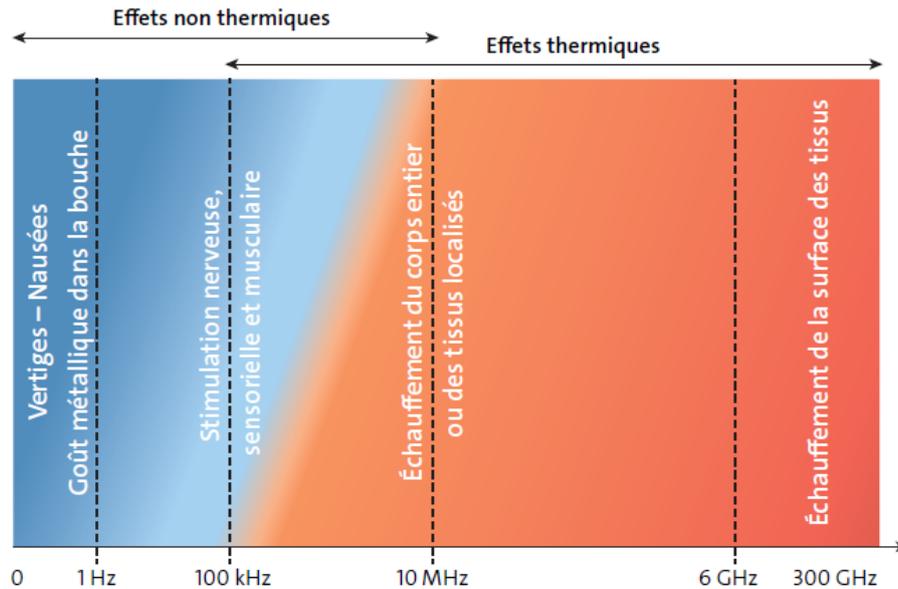


Figure 7 - Effets en fonction de la fréquence (INRS, 2018)

1.1.3.5. Quantification de l'absorption d'énergie électromagnétique

Lors d'une exposition aux **ondes radiofréquences** (100 kHz à 300 GHz), la puissance absorbée par les tissus biologiques est quantifiée grâce au débit d'absorption spécifique (DAS) qui s'exprime en W/kg. Ce paramètre représente la quantité d'énergie électromagnétique absorbée par unité de masse de tissu, au niveau du corps entier ou localement.

Le DAS dépend du champ électrique présent dans les tissus biologiques, conformément à l'équation suivante :

$$DAS = \frac{\sigma |E|^2}{\rho} \quad (2)$$

Avec,

- σ : Conductivité électrique du tissu (S/m),
- $|E|$: Valeur efficace du champ électrique (V/m),
- ρ : Masse volumique de l'échantillon en kg/m³.

Le DAS peut également se calculer à partir de l'élévation de température induite dans les tissus biologiques à la suite de l'application d'un champ électrique, selon l'équation suivante :

$$DAS = C \left. \frac{\partial T}{\partial t} \right|_{t = t_0} \quad (3)$$

Avec,

- C : Capacité calorifique du tissu (J/(kg-K)),
- ∂T : Variation de la température (K),
- ∂t : Temps d'exposition (s),
- t_0 : Début de l'augmentation de température.

Il existe deux types de méthodes permettant de calculer le DAS : la **dosimétrie numérique** et la **dosimétrie expérimentale**. La dosimétrie numérique implique l'utilisation de logiciels de simulation pour estimer les doses de radiation reçues par les tissus et éventuellement l'élévation de la température induite par l'exposition aux ondes. Ce type de dosimétrie utilise des méthodes numériques comme par exemple les méthodes des différences finies (FDTD) (Leveque et al., 1992; Taflove and Hagness, 1995) qui reposent sur des modèles mathématiques permettant de simuler les interactions entre les radiations et la matière. Cependant, la précision des résultats dépend de la qualité des données d'entrée et doit être validée par des mesures expérimentales. La dosimétrie expérimentale implique, quant à elle, la mesure directe du champ électrique ou de l'élévation de la température en utilisant des sondes spécifiques. Les résultats de la dosimétrie expérimentale servent notamment à valider les simulations numériques.

1.1.4. Les normes d'exposition aux ondes électromagnétiques

La rapide évolution des technologies et des systèmes de télécommunications sans fil entraîna la mise en place de réglementations visant à limiter l'exposition de la population aux champs électromagnétiques. Ces réglementations sont fondées sur les connaissances scientifiques disponibles et s'appuient sur les lignes directrices élaborées par l'ICNIRP³, une organisation indépendante reconnue par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS). Cette organisation scientifique propose des limites d'exposition pour le **public** (i.e., individus de tous âges, dans un état de santé variable ne connaissant pas les niveaux auxquels ils sont exposés et ne prenant pas nécessairement des mesures de précaution pour minimiser l'exposition) et les **travailleurs** (i.e., adultes exposés sous des conditions connues, informés des risques éventuels et en mesure de prendre des précautions appropriées). Ces limites d'exposition, définies pour

³ International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (<https://www.icnirp.org/>)

la première fois en 1988, sont régulièrement réévaluées en fonction des avancées de la recherche scientifique et les valeurs fournies par l'ICNIRP servent de base à la définition des normes européennes (ICNIRP, 2020, 1998). Ces valeurs limites sont déterminées en fonction des seuils d'exposition à partir desquels des effets néfastes peuvent apparaître, que ce soit à l'échelle de l'ensemble du corps ou d'une partie spécifique de celui-ci soumise à une exposition locale.

Dans la gamme des radiofréquences (100 kHz à 300 GHz), les seuls effets avérés d'une exposition sont thermiques. En effet, à ces fréquences (voir partie 1.1.3.1 de ce chapitre), le champ électromagnétique peut produire un échauffement diélectrique des tissus biologiques. Plusieurs recherches ont été menées sur des individus volontaires, sur des animaux (en particulier des rongeurs et des primates non-humains), ainsi que sur des systèmes cellulaires ou tissulaires pour déterminer le seuil critique au-delà duquel des effets thermiques se manifestent (D'Andrea et al., 1986; Adair et al., 1984; Adair and Adams, 1980; De Lorge and Ezell, 1980; Stern et al., 1979). D'après les données expérimentales disponibles, de premiers effets nocifs apparaissent lors d'une exposition à des champs électromagnétiques dont le DAS est supérieur à 4 W/kg, correspondant à une augmentation de plus de 1°C de la température corporelle. Ainsi, un DAS « corps entier » de 4W/kg représente le seuil critique de l'exposition aux champs radiofréquences. Par conséquent, comme l'indique le [Tableau 2](#), des normes d'exposition ont été établies afin de protéger la population de ces effets thermiques délétères. Des facteurs de réduction de 10 (0,4 W/kg) et 50 (0,08 W/kg) ont été retenus pour assurer la protection des travailleurs et du grand public, respectivement (ICNIRP, 2020; Lorrain and Raoul, 2002).

CORPS ENTIER		TETE et TRONC		MEMBRES	
↓		↓		↓	
DAS moyen (30 min) 4 W/kg		DAS moyen (6 min) 20 W/kg		DAS moyen (6 min) 40 W/kg	
Travailleurs	Public	Travailleurs	Public	Travailleurs	Public
FACTEURS DE SECURITÉ					
10	50	2	10	2	10
0,4 W/kg	0,08 W/kg	10 W/kg	2 W/kg	20 W/kg	4 W/kg

Tableau 2 - Normes d'exposition aux champs électromagnétiques établies dans la gamme de fréquence 100 kHz-6 GHz (d'après ICNIRP 2020).

Des limites ont également été établies pour réglementer l'**exposition locale** de certaines parties du corps. En se basant sur les données de la littérature existante, les directives actuelles considèrent comme potentiellement nocives les expositions aux champs électromagnétiques qui induisent des températures locales de 41°C ou plus (Yarmolenko et al., 2011; Dewhirst et al., 2003). Comme la température corporelle varie selon les parties du corps, ces directives définissent deux régions distinctes auxquelles sont attribuées différents seuils d'effets néfastes : la région « **tête et tronc** » dans laquelle se trouvent

des organes fonctionnels vitaux (cerveau, cœur, poumons, intestin, etc.) et la région « **membres** » comprenant les bras, les mains, les pieds etc. Un DAS d'au moins 20 W/kg est nécessaire pour atteindre le seuil critique des effets indésirables pour la région « tête et tronc », tandis que le seuil critique est de 40 W/kg pour la région « membres ». Des facteurs de réduction, prenant en compte les incertitudes scientifiques, ont également été retenus pour l'exposition locale aux radiofréquences. Ces facteurs s'élèvent à 2 pour les travailleurs et à 10 pour le public. Ainsi, en ce qui concerne le grand public, les valeurs limites de DAS « local » sont fixées à 2 W/kg pour la tête et le tronc et à 4 W/kg pour les tissus plus périphériques que sont les membres. Pour les travailleurs, ces limites sont moins strictes et fixées à 10 W/kg pour la tête et le tronc et à 20 W/kg pour les membres (Tableau 2) (ICNIRP, 2020; Lorrain and Raoul, 2002).

En France, c'est l'ANFR⁴ qui est chargée de contrôler les niveaux d'exposition du public aux ondes radiofréquences afin de garantir le respect des normes. Dans ce cadre, l'ANFR effectue des contrôles sur les téléphones mobiles commercialisés en France pour s'assurer de leur conformité à la réglementation.

Cette réglementation est susceptible de changer en fonction des avancées de la recherche scientifique. Des organismes tels que l'ANSES⁵ ou la SSM⁶ effectuent régulièrement une veille scientifique pour surveiller l'évolution des connaissances dans ce domaine (ANSES, 2022, 2019; SSM, 2018). Cependant, il est important de s'assurer que les effets biologiques décrits dans la littérature sont reproductibles par une ou plusieurs équipes de recherche indépendantes. Les résultats qui ne peuvent pas être reproduits après plusieurs tentatives ne seront pas pris en compte dans l'analyse des risques liés à l'exposition. Cette approche n'est pas spécifique au domaine du bioélectromagnétisme, mais commune à toutes les études visant à mettre en évidence les effets d'une exposition à faibles niveaux d'agents chimiques ou physiques.

1.1.5. Problématiques sociétales liées à l'utilisation du téléphone portable

L'utilisation d'appareils et de systèmes émettant des radiofréquences est en augmentation rapide. Cette situation implique que nous sommes de plus en plus exposés aux RF émises par ces dispositifs et soulève des interrogations voire des inquiétudes majeures quant à leurs éventuels effets sur notre santé.

⁴ Agence Nationale des Fréquences (<https://www.anfr.fr/accueil>)

⁵ Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (<https://www.anses.fr/fr>)

⁶ Autorité Suédoise de Radioprotection (<https://www.stralsakerhetsmyndigheten.se/en/>)

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses études ont été réalisées pour mieux comprendre les conséquences biologiques d'une exposition aux RF sur le corps humain. À l'heure actuelle, les seuls effets connus des RF sont de nature thermique, entraînant un échauffement des cellules ou des tissus exposés. Toutefois, les normes établies par la réglementation nous protègent contre ces effets thermiques. À présent, les études menées en laboratoire se concentrent sur la recherche d'effets spécifiques des RF (non-thermiques), à des niveaux en dessous des normes environnementales. Une partie de ces études porte une attention particulière à l'effet des RF sur le Système Nerveux Central (SNC). En effet, le SNC pourrait être l'une des cibles principales de l'exposition aux RF en raison de la proximité entre le téléphone portable et le cerveau pendant les appels téléphoniques (Figure 8) ainsi que de la nature excitable des neurones.

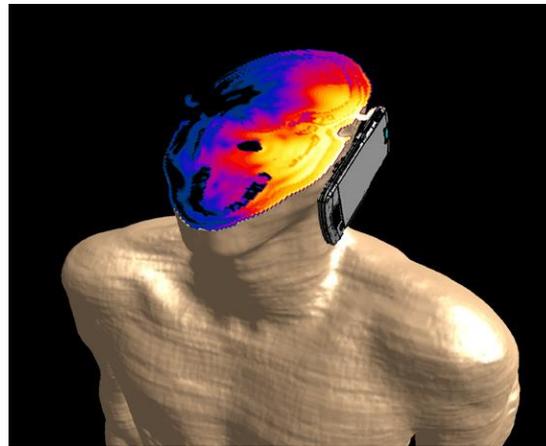


Figure 8 – Dosimétrie de l'énergie absorbée par la tête lors de l'utilisation d'un téléphone portable. Les valeurs de DAS les plus élevées se trouvent dans la zone jaune, près de l'oreille dans les couches superficielles de la tête. Dans les zones noires, l'absorption est 100 000 fois plus faible que dans les zones jaunes (Image provenant de IT'IS Foundation, Zurich).

1.2. Effet des radiofréquences sur le Système Nerveux Central (SNC)

1.2.1. Cible biologique d'intérêt : le Système Nerveux Central (SNC)

Le système nerveux central (SNC) est l'un des systèmes les plus complexes et essentiels du corps humain. Il comprend l'**encéphale** (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et la **moelle épinière** (Figure 9), qui sont responsables de la coordination et du contrôle de la plupart des fonctions du corps telles que les mouvements, les sensations, les pensées, la parole et la mémoire (Purves et al., 2011). L'encéphale et la moelle épinière se composent de deux substances principales : la **substance grise**, abritant les corps cellulaires des neurones et jouant un rôle dans le traitement de l'information, et la **substance blanche**, qui contient principalement les prolongements des neurones (les axones) et assure la transmission de l'information. Les cellules qui composent le système nerveux peuvent être divisées en deux grandes catégories : les cellules nerveuses ou neurones et les cellules non-neurales ou gliales (Amiel-Tison and Gosselin, 2010).

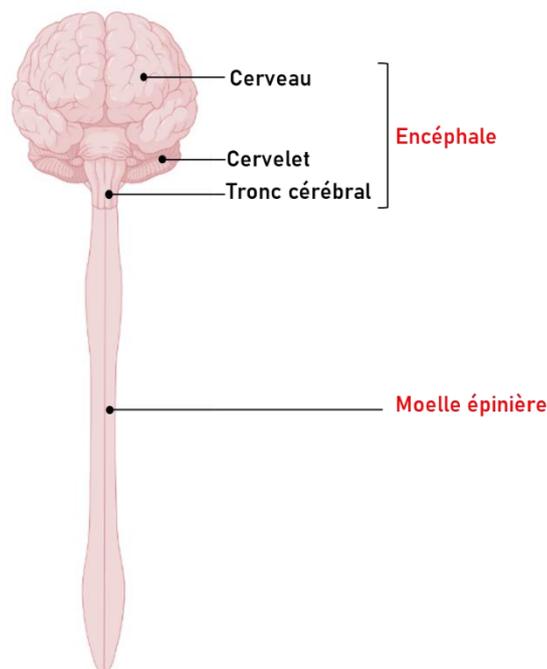


Figure 9 - Composition du système nerveux central (SNC).

1.2.1.1. Cellules gliales

Il existe différents types de cellules gliales qui assurent, chacune à leur façon, le bon fonctionnement des neurones (Purves et al., 2011; Amiel-Tison and Gosselin, 2010; Hammond and Tritsch, 1990).

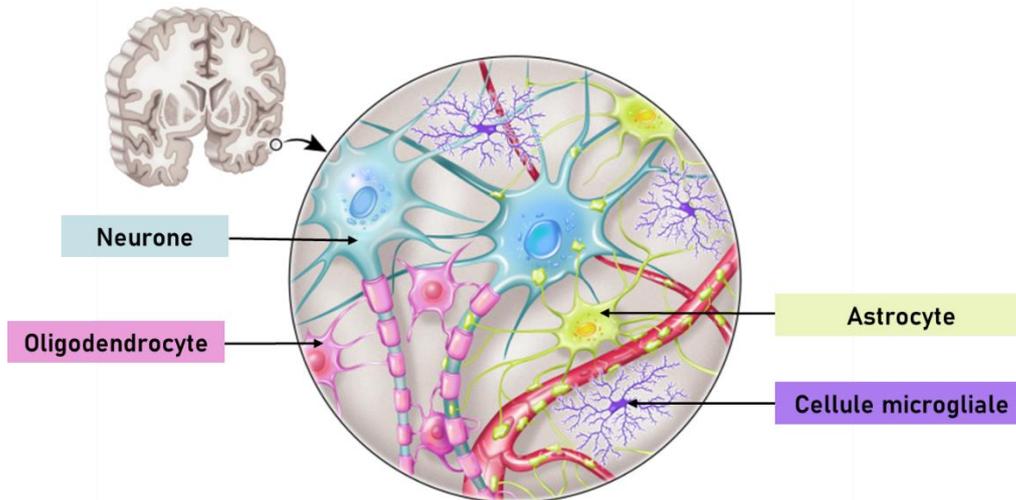


Figure 10 - Types de cellules gliales.

Les **astrocytes** se distinguent par leurs prolongements complexes qui leur donnent l'apparence d'étoiles (Figure 10). Ces cellules assurent un certain nombre de fonctions essentielles, principalement centrées sur le support et la protection des neurones. Par exemple, elles interviennent dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique et participent à la capture des neurotransmetteurs au niveau des synapses. Elles jouent également un rôle important en participant à la gliose, un processus de cicatrisation des lésions du système nerveux. De plus, les astrocytes assurent l'approvisionnement en nutriments et le métabolisme énergétique du système nerveux en fournissant aux neurones du lactate, un substrat énergétique indispensable.

Les **oligodendrocytes**, sont plus petites que les astrocytes et présentent moins de prolongements (Figure 10). Elles assurent la production des gaines de myéline qui entourent les axones de nombreux neurones. Le rôle de ces gaines de myéline est de permettre une conduction plus rapide du message nerveux.

Les **cellules microgliales** sont les macrophages résidents du SNC (Figure 10). Leur rôle principal est d'assurer la défense immunitaire du SNC en constituant la première ligne de défense contre les agents pathogènes. De plus, elles sont impliquées dans le processus de réparation tissulaire.

1.2.1.2. Neurones et neurotransmission

Les **neurones** sont responsables de l'émission et de la propagation des messages nerveux. En effet, en fonction des informations qu'ils reçoivent, ils sont capables d'émettre des signaux électriques et de les propager le long de leurs prolongements.

Caractéristiques des différentes régions neuronales

Les neurones se distinguent de la plupart des autres cellules du corps par leurs régions morphologiques distinctes, chacune ayant des fonctions spécifiques. En effet, le neurone se compose de plusieurs parties : le corps cellulaire (soma), les dendrites, l'axone, la gaine de myéline et les terminaisons axonales (ou zones synaptiques) (Purves et al., 2011; Amiel-Tison and Gosselin, 2010; Hammond and Tritsch, 1990) (Figure 11).

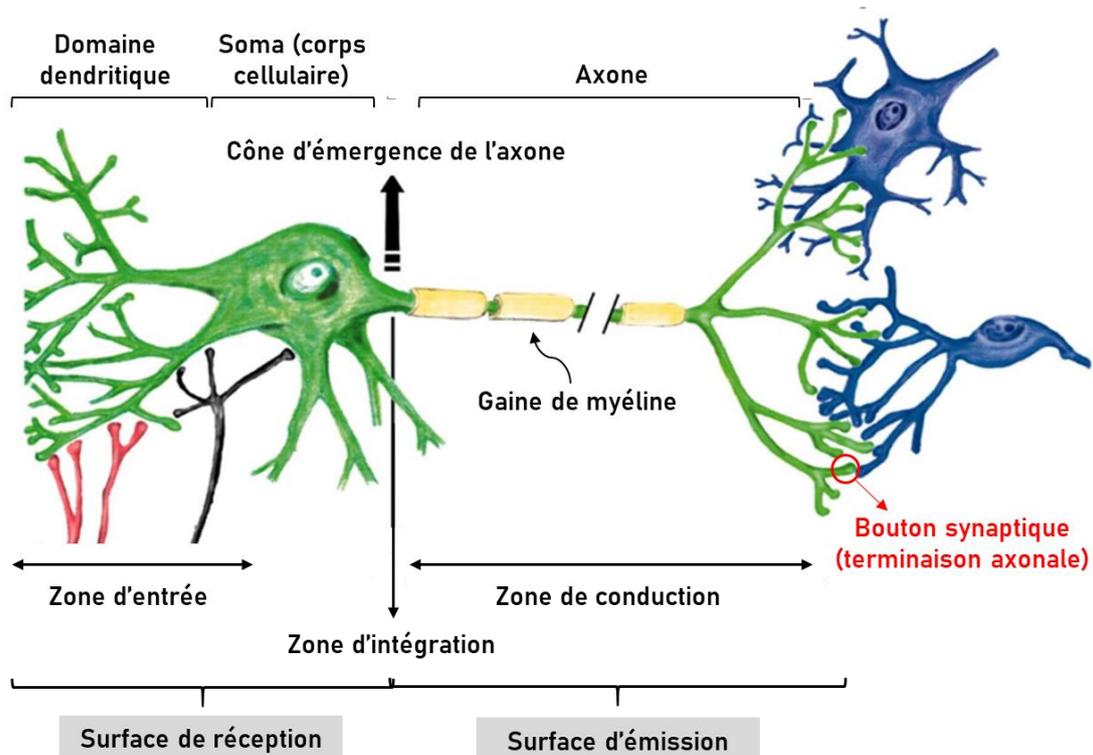


Figure 11 - Structure d'un neurone.

Le **corps cellulaire** est la partie centrale du neurone qui contient le noyau et le cytoplasme qui l'entoure. Un des rôles du corps cellulaire est d'assurer la synthèse d'une grande partie des constituants nécessaires à la structure et au bon fonctionnement du neurone. Les neurones présentent des prolongements qui émergent du corps cellulaire. Ces prolongements leur permettent d'établir des connexions (les synapses) avec d'autres neurones ou avec d'autres cellules de l'organisme telles que des cellules musculaires ou des récepteurs sensoriels. Les prolongements des neurones sont de deux types : les dendrites et les axones. Les **dendrites** sont de simples extensions du corps cellulaire, qui se divisent successivement en

une arborisation dont les caractéristiques (nombre de branchements etc.) sont propres à chaque population neuronale. Les dendrites et le corps cellulaire reçoivent de très nombreux contacts synaptiques venant d'autres neurones et constituent la principale surface de réception du neurone. Cependant, la réception des messages synaptiques n'est pas l'unique rôle des dendrites. Elles génèrent, en réponse à ces messages afférents, des signaux électriques comme les potentiels post-synaptiques. L'**axone**, le deuxième type de prolongement émis par le neurone, prend généralement son origine au niveau d'une expansion conique du corps cellulaire, qu'on appelle le cône d'émergence. L'axone se termine par une arborisation terminale, c'est-à-dire par de très nombreuses et fines branches dont les extrémités renflées effectuent des contacts synaptiques avec les cellules cibles : ce sont les boutons synaptiques. La principale caractéristique de l'axone est sa capacité à conduire les potentiels d'action sur de longues distances, sans perte d'amplitude. C'est au niveau du cône d'émergence de l'axone que sont générés les potentiels d'action en réponse aux informations transmises par l'arbre somato-dendritique. Les potentiels d'action se propagent ensuite le long de l'axone jusqu'aux terminaisons axonales (boutons synaptiques). Les terminaisons axonales, en réponse à l'arrivée des potentiels d'action, libèrent ou non les neurotransmetteurs qu'elles renferment. Pour toutes ces raisons, l'axone correspond à la surface d'émission du neurone.

Les synapses chimiques

La cellule présynaptique n'est pas directement connectée à la cellule post-synaptique. En effet, les deux cellules sont séparées par un espace qu'on appelle **fente synaptique** (Figure 12). Par conséquent, ce sont des molécules chimiques, les neurotransmetteurs, qui transmettent l'information de la cellule présynaptique à la cellule post-synaptique. Dans le neurone présynaptique, l'arrivée d'un potentiel d'action entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et par conséquent une entrée massive de calcium dans la cellule. Cette augmentation brutale de la concentration en calcium intracellulaire induit la fusion des vésicules contenant les neurotransmetteurs avec la membrane plasmique. Les vésicules libèrent ainsi, par un processus d'exocytose, des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs diffusent dans la fente synaptique et se lient à leurs récepteurs spécifiques présents sur la membrane de la cellule post-synaptique. Une partie de ces récepteurs sont des récepteurs-canaux dont l'ouverture génère des mouvements d'ions à travers la membrane post-synaptique, ce qui modifie transitoirement le potentiel membranaire du neurone post-synaptique : on parle de potentiel post-synaptique (PPS) (Amiel-Tison and Gosselin, 2010; Hammond and Tritsch, 1990).

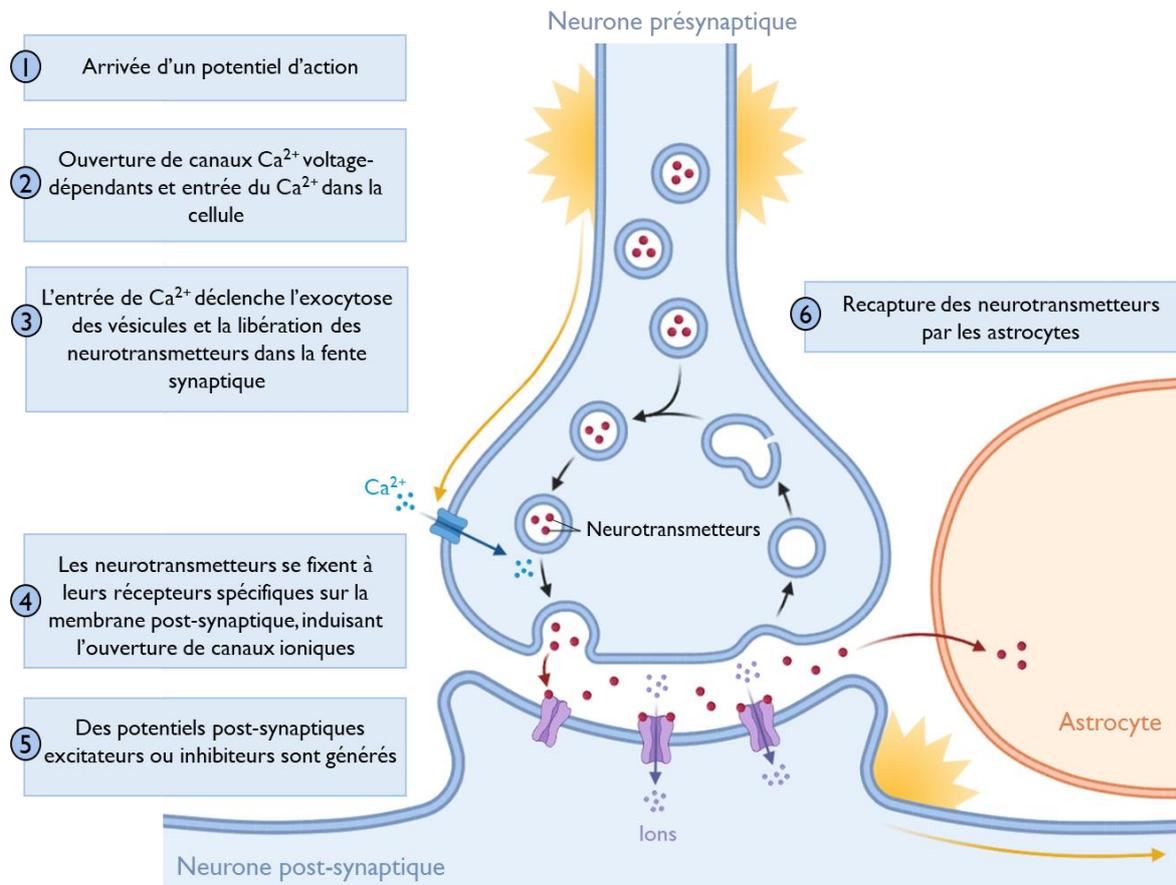


Figure 12 - Synapse chimique : les étapes de la transmission synaptique.

En fonction des récepteurs qui seront activés, les potentiels post-synaptiques pourront être de deux types : **excitateurs (PPSE) ou inhibiteurs (PPSI)** (Figure 13). Les PPSE provoquent une dépolarisation de la membrane post-synaptique, rapprochant ainsi le potentiel de membrane du seuil nécessaire pour déclencher un potentiel d'action. Cette dépolarisation est généralement causée par une augmentation de l'entrée de charges positives, comme les ions sodium (Na^+) ou les ions calcium (Ca^{2+}), dans la cellule post-synaptique. Au contraire, les PPSI induisent une hyperpolarisation de la membrane post-synaptique, éloignant ainsi le potentiel de membrane du seuil nécessaire pour déclencher un potentiel d'action. Cette hyperpolarisation est généralement provoquée par l'entrée de charges négatives, comme les ions chlorure (Cl^-) dans la cellule post-synaptique, ou par la sortie accrue de charges positives, telles que les ions potassium (K^+). Pour déclencher un potentiel d'action, il faut une sommation des potentiels post-synaptiques. Cela signifie que plusieurs potentiels post-synaptiques excitateurs doivent s'additionner pour atteindre le seuil d'excitation nécessaire pour générer un potentiel d'action.

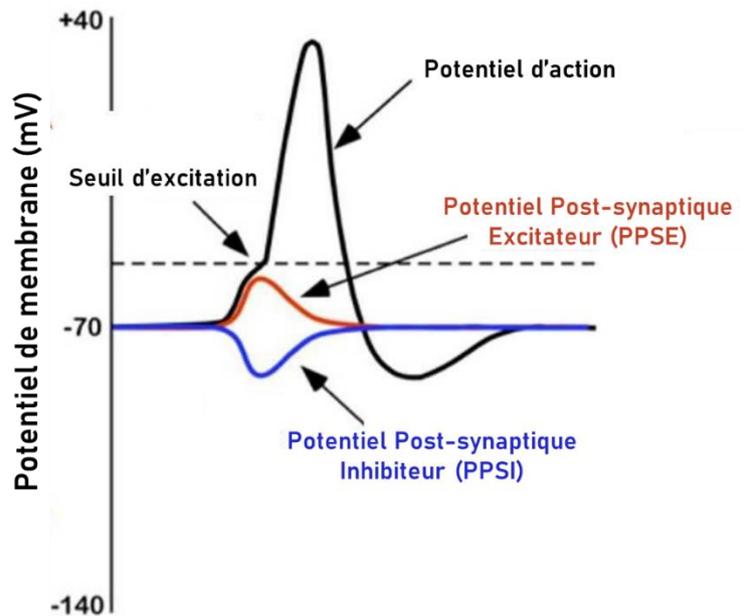


Figure 13 - Potentiels membranaires : potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs.

Les neurotransmetteurs excitateurs : exemple du glutamate

Le **glutamate** est l'un des principaux neurotransmetteurs excitateurs chez les vertébrés. Après sa libération vésiculaire par le neurone présynaptique, le glutamate active deux grandes classes de récepteurs à la membrane du neurone post-synaptique : les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), couplés à des protéines G, et les récepteurs-canaux du glutamate (ou récepteurs ionotropiques, iGluR), qui contiennent un canal ionique perméable aux cations (Na^+ , K^+ et dans certains cas Ca^{2+}). L'activation des iGluR entraîne un flux ionique à travers la membrane plasmique du neurone post-synaptique, ce qui provoque sa dépolarisation et peut ainsi permettre l'initiation de potentiels d'action. Les récepteurs iGluR sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide. Leurs cinétiques d'activation sont suffisamment rapides pour répondre à une libération brève de glutamate, comme par exemple lors d'une fusion vésiculaire unique. On distingue deux catégories principales de iGluR en fonction de leurs propriétés pharmacologiques : les **récepteurs AMPA et NMDA** (Gielen, 2010; Hammond and Tritsch, 1990).

Si tous les iGluR peuvent être activés par des applications brèves de glutamate, ils présentent néanmoins des propriétés cinétiques distinctes. Les récepteurs AMPA s'activent et s'inactivent en moins d'une milliseconde, ce qui leur permet de coder rapidement l'information. En revanche, les récepteurs NMDA présentent des cinétiques beaucoup plus lentes. L'une des caractéristiques de ces récepteurs réside dans leur liaison avec le Mg^{2+} extracellulaire. Pour des potentiels de membrane hyperpolarisants, cet ion bloque le pore du récepteur-canal NMDA, ce qui empêche tout flux ionique. Une dépolarisation membranaire est nécessaire à l'expulsion du Mg^{2+} , permettant ainsi le passage de certains cations,

notamment le Ca^{2+} . Cela signifie que les récepteurs NMDA ne laissent passer le Ca^{2+} que lorsque la cellule post-synaptique est dépolarisée, soit par l'activation d'un grand nombre d'afférences excitatrices, soit par une succession répétitive de potentiels d'action émis par la cellule présynaptique. La forte perméabilité calcique des récepteurs NMDA est à l'origine de diverses formes de plasticité essentielles aux phénomènes d'apprentissage et de mémoire (Gielen, 2010; Hammond and Tritsch, 1990).

Les neurotransmetteurs inhibiteurs : exemple du GABA

L'acide gamma-aminobutyrique (**GABA**) est l'un des principaux neurotransmetteurs inhibiteurs du SNC. Il exerce ses effets biologiques en se fixant sur plusieurs types de récepteurs dont les mieux caractérisés sont les **récepteurs GABA_A** (récepteurs ionotropiques) **et GABA_B** (récepteurs métabotropiques).

Lorsque le GABA se lie aux récepteurs GABA_A, il provoque l'entrée d'ions chlorure (Cl^-) dans la cellule post-synaptique. Cette entrée de charges négatives dans la cellule neuronale induit une hyperpolarisation de la membrane et diminue la probabilité de déclencher un potentiel d'action. Contrairement aux récepteurs GABA_A, les récepteurs GABA_B sont des récepteurs couplés aux protéines G, ce qui signifie qu'ils exercent leur action inhibitrice via des voies de signalisation intracellulaire plus complexes. Dans certains cas, l'activation des récepteurs GABA_B déclenche une cascade de signalisation intracellulaire qui favorise l'ouverture de canaux potassiques. Cette ouverture induit une sortie accrue d'ion potassium (K^+) hors de la cellule, provoquant ainsi une hyperpolarisation de la membrane neuronale et une réduction de l'excitabilité cellulaire (Hammond and Tritsch, 1990).

Potentiel de membrane au repos et potentiel d'action

Quand une cellule est au repos, il existe une différence de potentiel électrique d'environ -60 mV entre la face interne et la face externe de la membrane cellulaire. Cette différence de potentiel, dite **potentiel de membrane au repos**, est due à une répartition inégale des ions de part et d'autre de la membrane cellulaire (Figure 14). Cette différence de distribution ionique est maintenue grâce à l'activité des pompes ioniques.

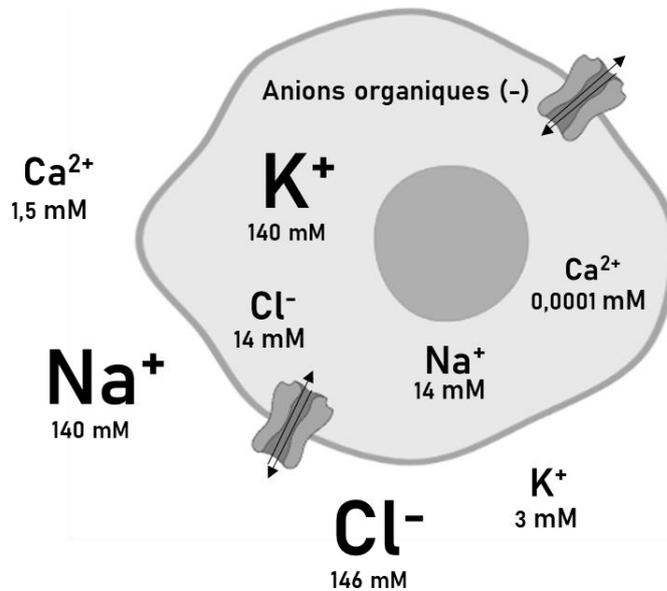


Figure 14 - Représentation schématique des principales concentrations ioniques présentes à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.

Lorsque la cellule est stimulée au-delà d'un certain seuil, généralement par l'intermédiaire de signaux électriques ou chimiques provenant d'autres cellules, cela déclenche l'apparition d'un potentiel d'action. Ce phénomène correspond à une inversion brutale et transitoire du potentiel de membrane.

En 1939, Alan Hodgkin et Andrew Huxley furent les premiers à mesurer un potentiel d'action à l'aide d'électrodes intracellulaires (Hodgkin and Huxley, 1939). En 1952, ils avancèrent un modèle mathématique décrivant le comportement électrique des neurones, dans lequel ils postulaient que des canaux ioniques présents dans la membrane neuronale en étaient responsables (Hodgkin and Huxley, 1952). Toutefois, il fallut attendre la fin des années 1970 pour que leur théorie soit confirmée expérimentalement grâce à l'invention de la technique du patch-clamp par Erwin Neher et Bert Sakmann (Hamill et al., 1981).

Le **potentiel d'action** comprend trois phases (Figure 15) :

- Une **phase de dépolarisation** extrêmement brève, qui dure une fraction de milliseconde, et qui se traduit par une brusque inversion du potentiel de membrane, passant en moyenne de - 60 mV à + 40 mV. C'est l'ouverture des canaux Na⁺ sensibles à la dépolarisation membranaire qui est responsable de cette phase ascendante du potentiel d'action. Au repos, la probabilité d'ouverture des canaux Na⁺ voltage-dépendants est très faible, la plupart d'entre eux étant fermés. Cependant, lorsque le potentiel atteint le seuil d'excitation (- 40 mV), la dépolarisation entraîne une ouverture rapide des canaux Na⁺, ce qui provoque une entrée massive d'ions sodium dans la cellule. Ce flux entrant de charges positives amplifie la dépolarisation et finit par inverser le potentiel de membrane qui atteint environ + 40 mV.

- Une **phase de repolarisation**, légèrement plus lente, qui permet au potentiel de membrane de revenir à son niveau de repos. En effet, la forte dépolarisation finit par inactiver graduellement les canaux Na^+ sensibles au voltage mais induit l'ouverture de canaux K^+ , également voltage-dépendants. Cette ouverture entraîne une sortie d'ions K^+ hors de la cellule permettant au potentiel de membrane de retrouver sa valeur initiale.
- Une **phase de post-hyperpolarisation** encore plus lente (plusieurs millisecondes) et de très faible amplitude pendant laquelle les concentrations ioniques intracellulaires retrouvent leurs valeurs initiales. Au départ, les canaux K^+ n'étant pas immédiatement inactivés, les ions potassium continuent à quitter la cellule ce qui provoque une légère hyperpolarisation.

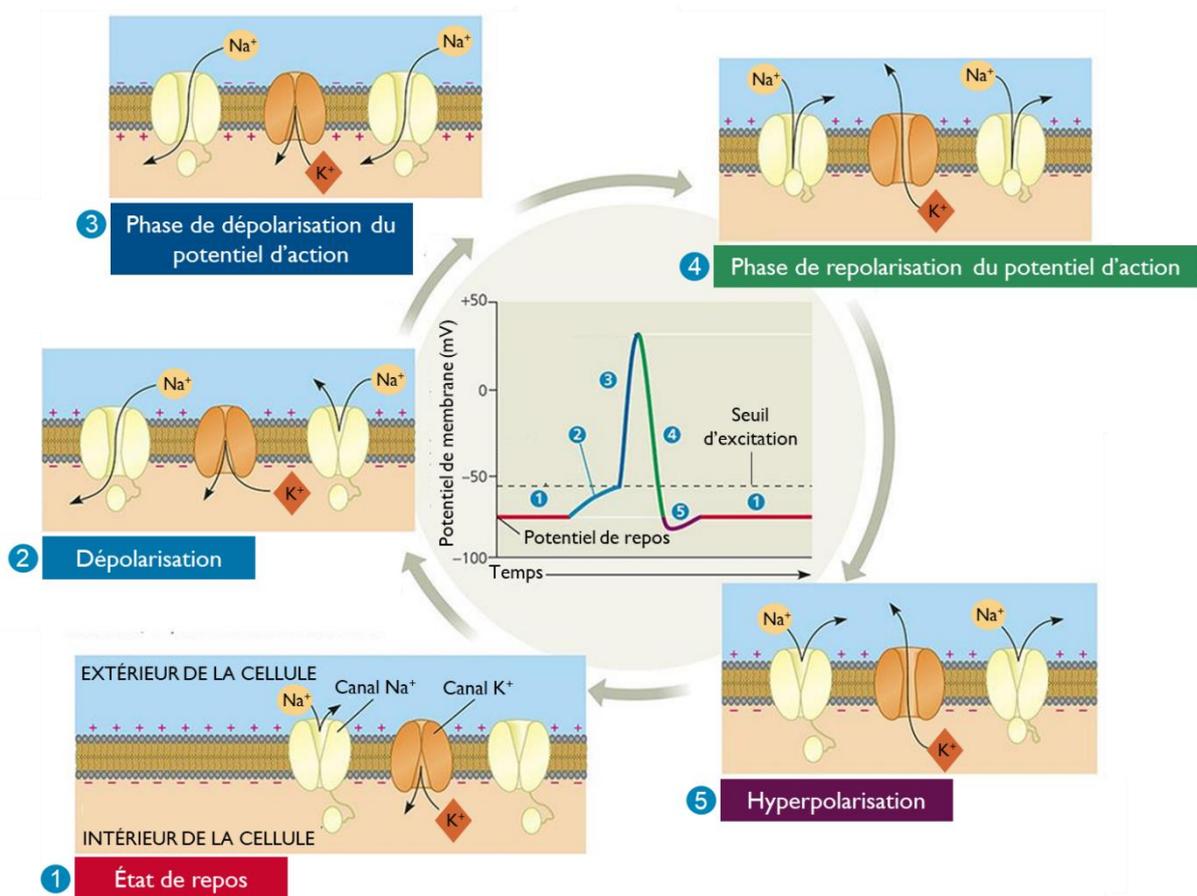


Figure 15 - Schéma représentant les différentes étapes du déroulement d'un potentiel d'action.

1.2.2. Techniques d'électrophysiologie

En utilisant des techniques d'électrophysiologie, il est possible de mesurer l'activité électrique des cellules excitables, que ce soit à l'échelle d'un organisme vivant (*in vivo*) ou à l'échelle des cultures cellulaires en laboratoire (*in vitro*).

1.2.2.1. L'électroencéphalogramme (EEG)

L'**électroencéphalogramme** (EEG) est une technique non-invasive couramment utilisée pour enregistrer l'activité électrique globale du cerveau, et non l'activité de neurones individuels. C'est en 1929 que Hans Berger, un psychiatre allemand, enregistra pour la première fois l'activité du cortex humain (Berger, 1929). Cette technique se fonde sur l'utilisation d'électrodes disposées à des emplacements précis sur le scalp (Figure 16). Les tracés obtenus sont le résultat de la somme des courants électriques générés par de nombreux neurones situés à proximité des électrodes et activés simultanément. Bien que l'activité électrique cérébrale puisse varier entre les individus, on peut identifier quatre rythmes périodiques d'oscillation du potentiel électrique : les ondes (ou bandes) alpha, bêta, delta et thêta (Purves et al., 2011). La bande alpha est typiquement enregistrée chez l'adulte en état d'éveil et de relaxation (yeux clos). Par définition, sa fréquence est comprise entre 8 et 13 Hz et son amplitude entre 10 et 50 μ V. Le rythme bêta, d'amplitude plus faible, se définit par une fréquence comprise entre 14 et 60 Hz et représente l'activité mentale liée à l'attention. Les ondes thêta et delta se caractérisent respectivement par des fréquences de 4 à 7 Hz et de moins de 4 Hz. Elles accompagnent l'assouplissement et le sommeil chez l'adulte. Lorsqu'on analyse les enregistrements d'un EEG, on se concentre sur deux types de paramètres importants : la fréquence et l'amplitude des rythmes dominants.

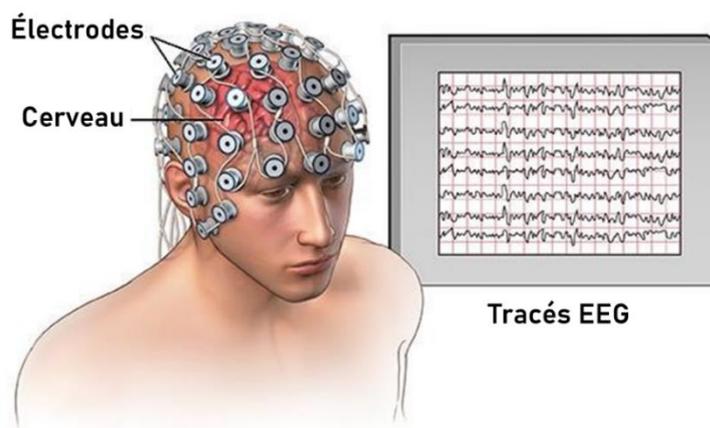


Figure 16 - Enregistrement de l'activité cérébrale par électroencéphalogramme (EEG).

1.2.2.2. Technique d'enregistrement intracellulaire : exemple du patch-clamp

Inventée dans les années 70 par Erwin Neher et Bert Sakmann (Hamill et al., 1981), la technique du **patch-clamp** est la référence pour l'étude de l'activité électrique des cellules, particulièrement des neurones. Elle permet de mesurer avec précision les courants ioniques qui traversent les membranes cellulaires et de caractériser les propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques. La technique du patch-clamp peut être utilisée selon deux modes principaux : le mode « voltage-clamp », qui permet de mesurer le courant membranaire à des valeurs de potentiel définies, ou le mode « current-clamp » qui permet d'injecter des charges tout en mesurant le potentiel membranaire.

Cette technique repose sur l'utilisation d'une micropipette en verre, remplie d'une solution conductrice, dont la pointe est mise en contact étroit avec un fragment microscopique de membrane cellulaire. La technique du patch-clamp peut être utilisée selon différentes configurations, dont les principales sont les suivantes (Figure 17) (Jain et al., 2009; Teulon, 2004) :

- Configuration « **cellule attachée** » : En appliquant une légère succion, la membrane se scelle hermétiquement à l'extrémité de la pipette, de sorte qu'aucun ion ne puisse passer entre la membrane et la pipette. Dans cette configuration, on peut enregistrer les courants ioniques locaux à la surface d'une membrane cellulaire intacte.
- Configuration « **cellule entière** » : Une forte succion est appliquée pour rompre la membrane cellulaire, établissant ainsi un contact direct avec le cytoplasme de la cellule. Cette configuration permet de mesurer les courants qui traversent l'ensemble de la surface membranaire. De plus, elle permet des échanges par diffusion entre la pipette et le cytoplasme, offrant la possibilité d'injecter différentes substances à l'intérieur de la cellule « patchée ». Ainsi, il est possible d'étudier l'effet de ces substances sur l'activité électrique de la cellule.
- Configuration « **Inside out** » : Dans cette configuration, une petite portion de la membrane est rompue et se retrouve dans la pipette. Par conséquent, la face intracellulaire de la membrane est exposée à la solution extracellulaire. Les canaux ioniques présents dans cette région spécifique de la membrane peuvent être étudiés de manière isolée. De plus, cette configuration est particulièrement utile pour étudier l'influence de molécules intracellulaires sur les fonctions du canal ionique.
- Configuration « **Outside out** » : Dans cette configuration, c'est la phase extracellulaire de la membrane qui est exposée à la solution extracellulaire. Cette configuration est idéale pour étudier comment l'activité d'un canal est influencée par des signaux chimiques extérieurs tels que des neurotransmetteurs.

Ces différentes configurations donnent à la technique du patch-clamp une souplesse exceptionnelle que l'on peut mettre à profit pour étudier les fonctions des canaux ioniques.

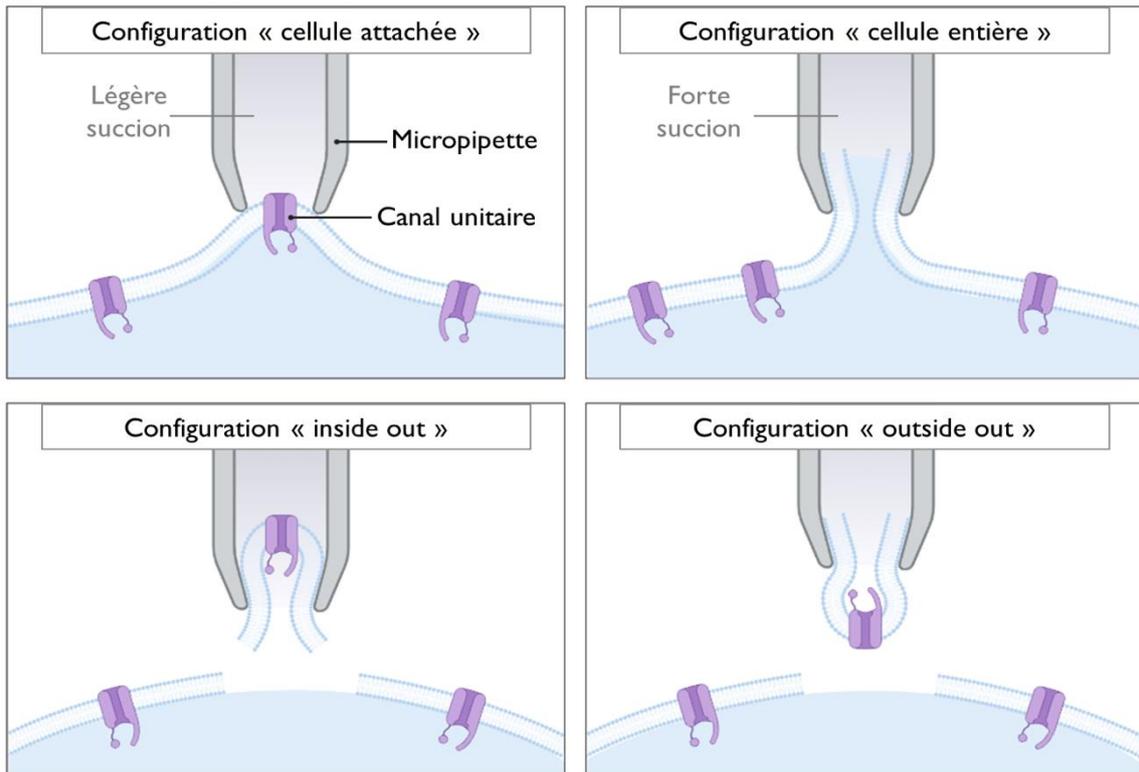


Figure 17 - Les différentes configurations utilisées en patch-clamp pour la mesure des courants ioniques.

Cependant, les enregistrements intracellulaires, tels que le patch-clamp, présentent quelques inconvénients. Tout d'abord, ces enregistrements sont souvent invasifs, ce qui peut entraîner des dommages cellulaires et altérer le bon fonctionnement de la cellule. De plus, lors des enregistrements intracellulaires, il peut être difficile de maintenir les conditions physiologiques optimales pour la cellule. Les variations de composition ionique, de pH ou de température peuvent affecter l'activité électrique et introduire des artefacts indésirables dans les enregistrements. Enfin, cette technique permet uniquement d'enregistrer l'activité électrique d'une seule cellule à la fois, ce qui limite la possibilité d'étudier les interactions de réseaux neuronaux complexes.

1.2.2.3. Technique d'enregistrement extracellulaire : exemple des matrices de microélectrodes (MEA)

Les **matrices de microélectrodes** (Microelectrodes Arrays ou MEAs) sont des dispositifs composés de multiples électrodes indépendantes et micrométriques disposées sur une surface plane, au fond d'un puits de culture. Elles permettent de cultiver et de mesurer l'activité électrique de cellules excitables telles que les cellules neuronales.

Ces dispositifs ont été introduits pour la première fois par Thomas et al. en 1972 en tant que nouvelle plateforme pour enregistrer l'activité électrique de cellules en culture (Figure 18). Avant les années 1990, l'utilisation des MEAs était limitée en raison des difficultés de fabrication. À cette époque, les laboratoires intéressés par l'utilisation de MEAs devaient souvent les fabriquer eux-mêmes, ce qui impliquait des compétences techniques spécialisées et des ressources considérables. Cependant, dans les années 1990, des progrès technologiques et l'intérêt croissant pour les MEAs ont conduit à la commercialisation de ces dispositifs.

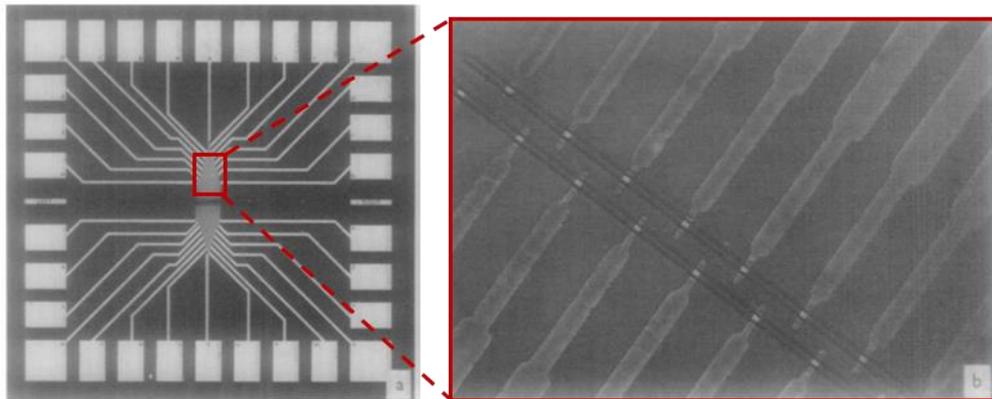


Figure 18 – Premier modèle d'une MEA en verre pour des mesures *in vitro* (Thomas et al., 1972). Elle contient 30 électrodes disposées en deux rangées distantes de 50 μm l'une de l'autre. La distance entre les électrodes d'une même rangée est de 100 μm . Les électrodes, situées au centre, sont connectées à la périphérie par des pistes conductrices. Les plots rectangulaires, disposés en couronne à la périphérie, servent de point de connexion pour relier les électrodes centrales à l'électronique externe, telle que les amplificateurs et les systèmes d'acquisition.

Idéalement, tous les matériaux utilisés dans la fabrication d'une MEA devraient avoir les caractéristiques suivantes : (1) être biocompatibles, c'est-à-dire ne produisant pas d'effets toxiques et possédant des propriétés adhésives appropriées ; (2) avoir de bonnes propriétés électriques pour les microélectrodes afin de maintenir un bon rapport signal/bruit et (3) être transparents pour l'observation des tissus ou des cellules cultivées à l'aide d'un microscope. Par conséquent, il existe une large gamme de MEAs qui peuvent être fabriquées sur différents types de support (verre, silicium ou polymère flexible), en fonction des besoins et des contraintes liées à l'application. Par exemple, les MEAs en verre sont souvent utilisées dans des applications en biologie cellulaire, ce qui permet de réaliser des observations au microscope en parallèle des mesures électriques.

Les MEAs peuvent être actives ou passives. Les MEAs **actives** sont équipées de circuits intégrés au même substrat que celui des microélectrodes. Ces circuits amplifient et traitent directement les signaux électriques enregistrés par les microélectrodes. Ce type de MEAs offre une haute résolution spatiale et temporelle. Au contraire, les MEAs **passives** ne comprennent que les microélectrodes et se limitent à la fonction de collecte des signaux électriques. Les signaux collectés peuvent ensuite être amplifiés et traités extérieurement, généralement à l'aide d'équipements dédiés.

Les électrodes des MEAs sont fabriquées à partir de matériaux conducteurs tels que le platine, l'or, le palladium, le nitrure de titane (TiN) ou l'oxyde d'indium-étain (ITO). Le nombre, la taille et l'arrangement des électrodes peuvent être personnalisés en fonction des besoins spécifiques de l'application.

Le dépôt de neurones à la surface d'une MEA permet d'accéder au potentiel d'action des cellules en utilisant une méthode électrophysiologique d'enregistrements extracellulaires. Cette méthode est une alternative non-invasive aux techniques d'enregistrements intracellulaires telles que le patch-clamp, et présente plusieurs avantages. Tout d'abord, les enregistrements extracellulaires avec les MEAs sont plus faciles à mettre en place et permettent des enregistrements prolongés sur de longues périodes. De plus, ces enregistrements fournissent des informations sur l'activité globale des réseaux neuronaux grâce au recueil d'une activité multiple distribuée spatialement selon la matrice d'électrodes. Comme nous le verrons plus loin, cette approche permet notamment de caractériser le degré de synchronisation des réseaux neuronaux, à partir de l'activité collectée sur plusieurs électrodes. En revanche, l'un des inconvénients de cette technique est une diminution importante de l'amplitude du signal (Figure 19). L'amplitude typique d'un potentiel extracellulaire est de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de microvolts.

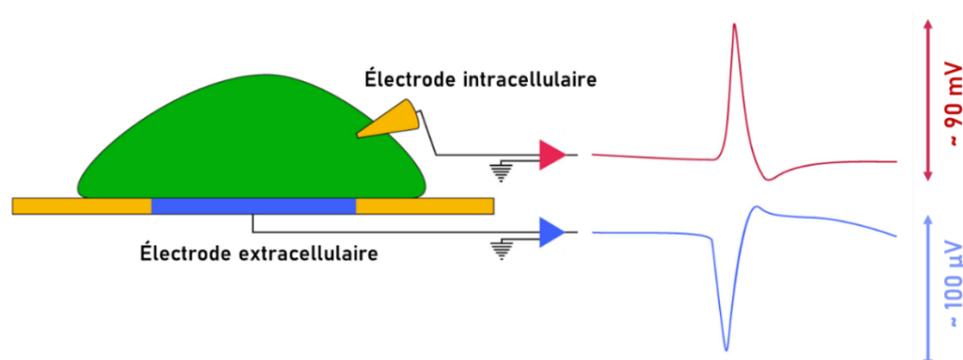


Figure 19 - Mesure intracellulaire (en haut) et mesure extracellulaire (en bas) : différence dans l'amplitude des signaux enregistrés.

Globalement, toutes les techniques d'électrophysiologie citées ci-dessus ont été utilisées pour l'étude des effets des RF sur l'activité biologique des neurones. Pour étudier cette question, les scientifiques ont fait des études à différentes échelles, allant de la population humaine (études épidémiologiques) jusqu'aux individus, en passant par les animaux et les cultures cellulaires.

1.2.3. État de la recherche sur les effets biologiques des RF sur le système nerveux

1.2.3.1. Étude de l'effet des RF chez l'Homme

Études à l'échelle de la population : études épidémiologiques

Face à la croissance exponentielle de l'usage des téléphones portables, un certain nombre d'études épidémiologiques ont été menées, dont beaucoup se sont penchées sur l'association entre le développement de tumeurs cérébrales chez l'Homme et l'exposition aux champs électromagnétiques radiofréquences. Dans l'ensemble, les études épidémiologiques effectuées sur le sujet ne montraient aucune hausse du risque de tumeurs cérébrales associée à l'utilisation de téléphones portables (Deltour et al., 2022; Castaño-Rodriguez et al., 2018; Schüz et al., 2006; Inskip et al., 2001; Muscat, 2000). Seules quelques études indiquaient une augmentation légère mais significative du risque de gliomes chez les personnes utilisant les téléphones portables de façon intensive (Momoli et al., 2017; Hardell and Carlberg, 2015; Coureau et al., 2014; Hardell, 2011; The Interphone Study Group, 2010). Ces résultats ont conduit le CIRC⁷ à classer, en 2011, les champs radiofréquences comme étant « potentiellement cancérigènes pour les humains ». Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de mécanismes biophysiques qui pourraient expliquer le caractère cancérigène des RF à de faibles niveaux d'exposition, c'est-à-dire à des niveaux de DAS inférieurs aux limites réglementaires.

Études individuelles : études humaines

De nombreuses études ont également été menées pour évaluer l'impact d'une exposition aux RF sur un certain nombre de fonctions neurophysiologiques telles que l'activité cérébrale, la cognition, le sommeil etc. Une grande partie de ces études sont résumées dans les revues suivantes : Wallace and Selmaoui, 2019; Ghosn et al., 2013; Regel and Achermann, 2011; Van Rongen et al., 2009. La plupart de ces recherches ont été réalisées par les groupes de Hämäläinen en Finlande (Haarala et al., 2007; Hietanen et al., 2000), de Achermann en Suisse (Regel et al., 2007; Huber et al., 2002), et de Croft en Australie (Perentos et al., 2013; Croft et al., 2010, 2008, 2002). En France et en Italie, des études sur l'EEG chez

⁷ Centre International de Recherche sur le Cancer (<https://www.iarc.who.int/>)

l'Homme ont également été menées par différents groupes (Wallace et al., 2022; Ghosn et al., 2015; Vecchio et al., 2012; Maby et al., 2006; Curcio et al., 2005).

Globalement, ces recherches suggèrent que l'exposition aux RF n'affecte pas les fonctions cognitives telles que l'attention et la mémoire (Eltiti et al., 2009; Unterlechner et al., 2008; Fritzer et al., 2007; Regel et al., 2007; Besset et al., 2005). En revanche, plusieurs études ont mis en évidence que l'exposition aux RF modifie l'EEG pendant l'état d'éveil, avec un effet principalement sur la puissance spectrale de la bande alpha. Toutefois, les résultats de ces études ne sont pas toujours uniformes, certains indiquant une augmentation de la puissance de la bande alpha (Croft et al., 2010, 2008; Hinrikus et al., 2008; Curcio et al., 2005; Cook et al., 2004; Huber et al., 2002) et d'autres une diminution (Yang et al., 2017; Ghosn et al., 2015; Perentos et al., 2013; Vecchio et al., 2012, 2010, 2007; Maby et al., 2006). Par exemple, dans une étude menée par Croft et al. (2008), de nombreux volontaires (n = 120) ont été exposés à un signal GSM-895 MHz (DAS ~ 0,674 W/kg). Les résultats de cette étude révèlent que l'activité de la bande alpha était significativement plus élevée chez les participants pendant l'exposition. Au contraire, dans l'étude de Ghosn et al. (2015), des expositions GSM d'une durée de 26 minutes à un DAS de 0,49 W/kg induisaient une diminution significative de la puissance spectrale de la bande alpha. De la même façon, l'étude réalisée par Yang et al. (2017) montrait une réduction de la puissance spectrale de la bande alpha, principalement dans les régions frontales et temporales, chez des volontaires exposés à un signal LTE (2,61 GHz ; DAS 1,34 W/kg).

Conclusion

Les différences observées dans les résultats obtenus peuvent être attribuées aux variations dans les protocoles expérimentaux et méthodes utilisées, comme la nature du signal RF et sa modulation, la durée de l'exposition, la position du système d'exposition près de la tête, ou encore les critères d'inclusion des participants (âge, sexe, antécédents médicaux etc.). De plus, comme l'indique Loughran et al. (2012), la variabilité interindividuelle est également un paramètre important qui pourrait expliquer les divergences dans les résultats obtenues.

Comme certaines recherches réalisées chez l'Homme apportent des preuves que l'exposition aux RF peut influencer directement les fonctions cérébrales, il est nécessaire de réaliser des études complémentaires sur des modèles animaux et cellulaires afin de déterminer si des effets biologiques existent.

1.2.3.2. Étude de l'effet des RF chez les animaux (*in vivo*)

Dans cette section, nous présenterons une sélection d'études portant sur les effets des RF sur l'activité neuronale de différentes espèces animales. Cette section sera divisée en deux sous-parties : la première abordera les études sur des **animaux sains**, tandis que la seconde se concentrera sur les études portant sur des **modèles animaux de pathologies humaines**.

Il existe peu d'études explorant les effets des RF sur les animaux au moyen de méthodes électrophysiologiques. Ces dernières utilisent principalement l'EEG ou des méthodes d'enregistrement nécessitant l'implantation d'électrodes. Les références citées dans cette section sont regroupées dans deux tableaux récapitulatifs ([Tableau 3](#) et [Tableau 4](#)) et classées selon un ordre chronologique.

Effets des RF sur des animaux sains

Des altérations de l'EEG d'animaux exposés aux RF ont été rapportées dès les années 1960 et 1970 par des scientifiques des pays d'Europe de l'Est et des États-Unis (Bawin et al., 1973; Barański and Edelwejn, 1967; Kholodov and Ianson, 1962; Bawin et al., 1960) ; ces anciennes études n'ont pas été incluses dans le [Tableau 3](#) en raison d'un manque de données descriptives. Il existe également des études plus récentes sur le sujet (Crouzier et al., 2007; Thuröczy et al., 1994). Par exemple, une équipe hongroise publia en 1994 des résultats sur les effets d'une exposition aux RF sur l'EEG de rats anesthésiés (Thuröczy et al., 1994). Lors d'une exposition localisée au niveau de la tête (CW-4 GHz, 42 W/kg, 30 min), les auteurs observaient des modifications de l'activité de l'EEG, notamment une augmentation de la puissance des bandes delta et thêta. Cependant, ces effets ont été qualifiés de thermiques, étant associés à une élévation d'environ 2°C de la température cérébrale. En 2007, une équipe française s'est intéressée aux effets d'une exposition aux RF (GSM-1800 MHz, DAS 0,071-0,53 W/kg) sur l'EEG de rats en mouvement (Crouzier et al., 2007). Après 24h d'exposition, aucune modification n'a été observée dans l'activité de l'EEG des rats exposés.

Des approches plus invasives ont également été utilisées pour explorer les effets des RF sur l'activité neuronale des animaux. Ces méthodes reposent sur l'implantation d'électrodes dans des régions spécifiques du cerveau afin d'obtenir des enregistrements plus précis de l'activité des neurones. Une étude réalisée aux États-Unis par Beason et Semm (2002) offre un exemple concret de cette approche. Dans cette étude, des oiseaux ont été exposés à un signal GSM-900 MHz avec un DAS de 0,05 W/kg en utilisant un protocole en trois phases distinctes (préexposition, exposition et post-exposition), chaque phase durant 10 minutes. Pendant l'exposition, des changements réversibles de l'activité électrique ont été observés dans 69% des cellules nerveuses enregistrées, sous la forme d'une excitation (52 %) ou d'une inhibition (17%) de l'activité électrique spontanée.

Une étude plus récente (Yaghmazadeh et al., 2022) s'est concentrée sur les effets d'une exposition intermittente aux RF sur l'activité neuronale de rongeurs éveillés (950 MHz, DAS 28,84 W/kg, cycles de 2/3 secondes d'exposition suivis de 2/3 secondes d'arrêt). Pour évaluer l'impact d'une telle exposition, deux méthodes différentes ont été utilisées et directement comparées : des enregistrements électrophysiologiques impliquant l'utilisation d'électrodes d'enregistrement métalliques, et des enregistrements optiques par imagerie calcique. En utilisant la méthode optique, les auteurs n'observaient aucun effet de l'exposition sur la réponse neuronale. En revanche, lorsque l'activité électrique était enregistrée par l'intermédiaire d'électrodes métalliques implantées dans l'hippocampe, les RF induisaient un effet chez 29,1% des neurones enregistrés. Ces effets étaient principalement de nature inhibitrice (60,1%), mais aussi parfois excitatrice (39,8%). Selon les auteurs, les effets observés seraient uniquement liés à la présence d'électrodes métalliques, qui pourraient induire une augmentation locale du champ électrique pendant l'exposition, entraînant des effets spécifiques.

Étant donné que l'étude de Yaghmazadeh et al. (2022) compare l'activité neuronale mesurée par électrophysiologie ou imagerie calcique, nous pouvons faire référence aux récents travaux de Hao et al. (2023), dans lesquels l'imagerie calcique est utilisée pour évaluer les conséquences d'une exposition aux RF (2856 MHz, DAS 5,9 - 6,6 W/kg, 15 min) sur l'activité des neurones de l'hippocampe de souris éveillées. Bien que cette méthode ne permette pas de mesurer directement l'activité électrique des neurones, elle est couramment utilisée dans la littérature scientifique pour quantifier les changements dans l'activité neuronale. Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative de l'activité des neurones pyramidaux de l'hippocampe, surtout pendant les premières minutes de l'exposition, alors même que la température corporelle (mesurée par voie rectale) ne dépasse pas 0,1°C d'augmentation. Ces résultats contredisent en apparence les conclusions de l'étude mentionnée précédemment et menée par Yaghmazadeh et al. (2022) qui ne montrait aucun effet des RF en utilisant une approche similaire d'imagerie calcique.

Tableau 3 - Références mentionnées pour l'étude des effets d'une exposition aux RF sur des animaux sains.

Référence	Sujet de l'étude	Fréquence porteuse	DAS	Modulation	Durée de l'exposition	Principaux effets
Thuröczy et al., 1994	Rats (anesthésiés)	4 GHz	42 W/kg	CW	10 min	L'exposition locale de la tête entraîne une augmentation de la puissance des bandes delta et thêta ; effets associés à une augmentation de 2°C de la température.
Beason and Semm, 2002	Oiseaux - Pinsons zébrés (anesthésiés)	900 MHz	0,05 W/kg	GSM	10 min	L'exposition entraîne des changements de l'activité électrique spontanée des neurones, sous la forme d'une excitation ou d'une inhibition.
Crouzier et al., 2007	Rats (non anesthésiés)	1800 MHz	0,071-0,53 W/kg	GSM	24h	Pas d'effet de l'exposition sur l'activité de l'EEG.
Yaghmazadeh et al., 2022	Rats et souris (non anesthésiés)	950 MHz	28,84 W/kg	CW ou fréquence modulée en amplitude à 5, 10 ou 20 Hz	Cycles 2/3 sec "ON" puis 2/3 sec "OFF", minimum 100 répétitions	Selon la méthode d'enregistrement utilisée, les effets de l'exposition sont différents. Avec des électrodes d'enregistrement métalliques, l'exposition induit des modifications de l'activité neuronale chez 29,1% des neurones enregistrés, se traduisant par une inhibition ou une excitation. Avec l'imagerie calcique comme technique d'enregistrement, l'exposition n'induit pas d'effet.
Hao et al., 2023	Souris (non anesthésiées)	2856 MHz	5,9 - 6,6 W/kg	Pulses (0,5 msec, répétition 80 Hz)	15 min	Augmentation de l'activité calcique des neurones, se manifestant par une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des signaux enregistrés.

Effets des RF sur des modèles animaux de pathologies humaines

Jusqu'à présent, la majorité des études *in vivo* se sont concentrées sur les effets des RF sur des sujets sains. Cependant, quelques études récentes se sont intéressées à l'influence des RF sur l'activité neuronale de sujets déjà atteints par une pathologie telle que la sclérose en plaques (Anane et al., 2003), l'épilepsie (López-Martín et al., 2009), la maladie d'Alzheimer (Jeong et al., 2015; Arendash et al., 2010) et la neuroinflammation (Souffi et al., 2022; Occelli et al., 2018).

À titre d'exemple, Occelli et al. (2018) ont étudié l'impact d'une exposition RF à un signal 2G (GSM-1800 MHz, DAS 1,55 W/kg, 2h) sur l'activité du cortex auditif de rats anesthésiés et prétraités avec du lipopolysaccharide (LPS), afin de reproduire un contexte de neuroinflammation aiguë. Chez les animaux malades, l'exposition entraînait une réduction significative des réponses neuronales à différents sons, ainsi qu'une augmentation de la durée de ces réponses. À travers cette étude, les chercheurs apportent une preuve que, dans un contexte de neuroinflammation, l'exposition aux RF peut affecter de façon significative l'activité neuronale liée à la perception auditive.

Les conclusions des études répertoriées dans le [Tableau 4](#) suggèrent que les effets de l'exposition aux RF sur les animaux malades diffèrent selon la nature de la pathologie. Par exemple, pour les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer, l'exposition aux RF semble avoir des effets bénéfiques, tandis que dans le cas d'un modèle animal de sclérose en plaques, aucun effet n'est observé.

Conclusion

En conclusion, les études *in vivo* portant sur l'effet des RF sur l'activité neuronale présentent des résultats très contradictoires. Certaines études signalent des effets, qu'ils soient inhibiteurs ou excitateurs, tandis que d'autres n'observent aucun effet. Ces divergences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que les méthodes d'enregistrements utilisées, les différences dans les protocoles expérimentaux, les fréquences utilisées, les niveaux d'exposition, les espèces animales étudiées ou encore l'état sain ou pathologique des animaux. Ces études contradictoires mettent en évidence la complexité de la recherche sur l'effet des RF sur les organismes vivants.

Tableau 4 - Références mentionnées pour l'étude des effets d'une exposition aux RF sur des modèles animaux de pathologies humaines.

Référence	Sujet de l'étude	Fréquence porteuse	DAS	Modulation	Durée de l'exposition	Principaux effets
Anane et al., 2003	Rats (non anesthésiés ; modèle d'encéphalomyélite allergique expérimentale = un modèle de sclérose en plaques)	900 MHz	1,5 et 6,0 W/kg	GSM	2h tous les jours, pendant 21 jours	Pas d'effet de l'exposition sur le début, la durée et la fin de la crise d'encéphalomyélite allergique expérimentale.
López-Martín et al., 2009	Rats (anesthésiés et prétraités avec de la picrotoxine pour induire une activité épileptique)	900 MHz	0,03 - 0,26 W/kg	CW et GSM	2h	Chez les rats rendus épileptiques par un traitement à la picrotoxine, l'exposition aux signaux GSM entraîne une augmentation significative de l'excitabilité neuronale.
Arendash et al., 2010	Souris (non anesthésiées ; modèle de la maladie d'Alzheimer)	918 MHz	0,25 W/kg	CW	<u>Exposition à long-terme</u> : Deux sessions d'exposition d'1h tous les jours pendant plusieurs mois (de 2 à 8 mois) <u>Exposition aiguë</u> : Deux sessions d'exposition d'1h	Chez les souris atteintes de la maladie d'Alzheimer, l'exposition à long-terme induit des effets bénéfiques sur la cognition.
Jeong et al., 2015	Souris (non anesthésiées ; modèle de la maladie d'Alzheimer)	1950 MHz	5 W/kg	CW	2h tous les jours, 5jours par semaine, pendant 8 mois	Chez les souris atteintes de la maladie d'Alzheimer, l'exposition chronique réduit le dépôt de plaques amyloïdes. Par conséquent, l'exposition induit des effets bénéfiques chez les souris malades.

Ocelli et al., 2018	Rats (anesthésiés et prétraités avec du LPS pour induire une neuroinflammation)	1800 MHz	1,55 W/kg	GSM	2h	Chez les rats neuro-inflammés, l'exposition entraîne une réduction significative des réponses neuronales à différents sons, ainsi qu'une augmentation de la durée de ces réponses.
Souffi et al., 2022	Rats (anesthésiés et prétraités avec du LPS pour induire une neuroinflammation)	1800 MHz	0,37 - 0,5 W/kg	LTE	2h	Chez les rats neuro-inflammés, l'activité neuronale induite par différents sons diminue de façon significative après l'exposition.

1.2.3.3. Étude de l'effet des RF sur des modèles cellulaires (*in vitro*)

Dans cette section, nous présenterons des publications portant sur l'effet des RF sur l'activité électrique de neurones *in vitro*. Les références citées dans cette section sont répertoriées dans deux tableaux distincts et classées par ordre chronologique. Le [Tableau 5](#) présente les références qui ne montrent aucun effet de l'exposition aux RF sur l'activité électrique des neurones en culture. Le [Tableau 6](#), quant à lui, regroupe les publications mettant en évidence un effet de l'exposition aux RF sur l'activité neuronale.

Effets des RF comprises entre 100 kHz et 30 GHz

- Études utilisant des techniques d'enregistrement intracellulaire

De premières études sur le sujet ont été réalisées dans les années 70 aux États-Unis par les groupes de Watchel et Guy qui cherchaient à évaluer les effets des RF à forte puissance sur l'activité électrique de neurones en culture. Dans la plupart de leurs expériences, de larges neurones ont été excisés à partir de différentes espèces animales telles que le lapin (Courtney et al., 1975), le gastéropode marin *Aplysia* (Wachtel et al., 1975), le chat et la grenouille (Chung-Kwang Chou and Guy, 1978). Ces neurones isolés ont majoritairement été exposés à 1,5 GHz ou 2,45 GHz. De manière générale, les changements observés étaient d'origine thermique et induits par des niveaux de DAS élevés. Cependant, les techniques d'électrophysiologie disponibles à l'époque étaient beaucoup moins sophistiquées qu'elles ne le sont aujourd'hui, par conséquent, de nombreuses informations manquaient concernant l'activité électrique des neurones.

Depuis, les progrès réalisés dans le domaine de l'électrophysiologie ont ouvert de nouvelles perspectives dans la compréhension des effets des RF sur la réponse électrique des neurones. En plus de ces avancées technologiques, de nouveaux modèles biologiques plus appropriés, tels que des réseaux de neurones cultivés *in vitro* ou des tranches de tissus cérébraux ont été utilisés.

En 2001, des tranches d'hippocampe de rats ont été exposées à 700 MHz (CW, DAS 0,0016-0,0044 W/kg, 5-15 min) par une équipe anglaise (Tattersall et al., 2001). Les effets des RF sur l'activité neuronale ont été étudiés en présence d'aminopyridine, un agent capable de déclencher une activité épileptique spontanée des neurones (sous forme de bursts). Des modifications de l'activité électrique ont été observées pendant l'exposition aux RF dans environ 36 % des tranches d'hippocampe testées, avec une réduction ou une abolition totale de l'activité électrique spontanée, sans augmentation de température mesurable. Une autre étude réalisée par cette même équipe (Green et al., 2005) avait pour objectif d'examiner les effets d'une exposition à des signaux radio TETRA (Terrestrial Trunked Radio) sur le calcium intracellulaire de cellules excitables (cellules granulaires du cervelet et cardiomyocytes). Dans l'ensemble, les résultats de l'étude ne montraient pas d'effets significatifs des signaux TETRA sur

la concentration intracellulaire en calcium, et donc indirectement sur l'activité électrique des neurones granulaires, quels que soient les DAS testés (5, 10, 20, 50 ou 400 mW/kg).

En 2006, une étude menée par Xu et al. s'est penchée sur les effets d'une exposition chronique aux RF sur la fonction synaptique de neurones hippocampiques de rats. Au cours de cette étude, les réseaux de neurones ont été exposés à des ondes GSM-1800 MHz tous les jours pendant 15 minutes, sur une période de 8 jours, avec un DAS de 2,4 W/kg. À la suite de cette exposition chronique et en utilisant la technique du patch-clamp, les chercheurs ont observé une réduction de l'activité synaptique excitatrice des neurones. Selon les auteurs, ces effets ont été observés en l'absence totale d'une augmentation de température en lien avec l'exposition, écartant l'hypothèse d'un effet thermique.

Plus récemment, une étude réalisée par Echchgadda et al. (2022) regarda l'impact d'une exposition aux RF à 3,0 GHz (CW, DAS < 0,7 W/kg, 60 minutes) sur l'excitabilité de neurones hippocampiques de rats *in vitro*. Dans cette étude, des enregistrements en patch-clamp ont été effectués dans les 30 minutes suivant l'exposition aux RF des neurones. Les résultats montraient une dépolarisation significative du potentiel de membrane au repos après l'exposition, rendant les neurones plus excitables. Les auteurs observaient également une diminution de l'amplitude du potentiel d'action, ainsi qu'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Ces résultats ont été observés dans des conditions où l'élévation de température était négligeable (environ 0,2°C).

- Études utilisant des techniques d'enregistrement extracellulaire

Les effets des RF sur les cultures neuronales ont aussi été étudiés en utilisant des MEAs, comme une alternative non-invasive aux techniques d'enregistrement intracellulaires. En 2007, l'équipe allemande de J. Gimsa fut la première à enregistrer en temps réel l'activité électrique de neurones sous exposition aux RF à l'aide d'une MEA (Koester et al., 2007). Dans leur étude, des neurones corticaux cultivés à partir d'embryons de souris ont été exposés à deux types de rayonnements : à des ondes continues (1,9-2,2 GHz) et à un signal 3G de téléphonie mobile (UMTS). Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis de conclure quant à un effet des RF sur les réseaux neuronaux. En effet, les électrodes utilisées présentaient un fort niveau de bruit sous exposition aux champs électromagnétiques, ce qui masquait la signature électrique des réseaux de neurones. Une équipe allemande, dirigée par Christiane Thielemann, utilisa également des MEAs pour étudier l'effet d'une exposition chronique aux RF (toutes les 2h, pendant 15 min, 7 jours par semaine) sur l'activité électrique de réseaux de neurones corticaux. Globalement, leurs études ne montraient pas d'effets d'une exposition à long terme aux RF (CW-900 MHz à 0,36 W/kg ou signal TETRA à 1,17 W/kg) sur l'activité électrique des neurones (Köhler et al., 2018; Oster et al., 2016). Cependant, leur configuration expérimentale n'était pas conçue pour enregistrer l'activité neuronale pendant la phase d'exposition, empêchant les auteurs d'observer un éventuel effet réversible des RF.

Mon équipe de recherche utilisa un système similaire à celui de l'équipe allemande (Köhler et al., 2018; Oster et al., 2016). Toutefois, l'approche développée présentait une différence majeure : la possibilité d'enregistrer l'activité électrique des neurones pendant l'exposition. Avec ce système, mon équipe de recherche observa une diminution significative d'environ 30% de l'activité électrique de réseaux de neurones corticaux lors d'une exposition à un signal GSM-1800 MHz pendant une durée de 3 minutes (Moretti et al., 2013). Cette diminution de l'activité électrique des neurones se produisait à des niveaux largement supérieurs aux normes environnementales (DAS ~ 25,6 W/kg). Dans une seconde étude, mon équipe s'est intéressée à l'influence de la dose d'exposition sur la réponse électrique des cultures de neurones (GSM-1800 MHz, DAS de 0,08 à 73 W/kg, 15 minutes). Les résultats obtenus indiquaient clairement que l'activité électrique des neurones diminuait à mesure que le DAS augmentait. De plus, à des DAS équivalents, les champs RF modulés avec un signal GSM provoquaient une diminution légèrement plus marquée de l'activité électrique des neurones par rapport aux champs non-modulés (CW) (El Khoueiry et al., 2018). Enfin, la dernière étude réalisée par mon équipe suggère que les RF (CW, 1800 MHz, 15 minutes), à des niveaux supérieurs aux normes (28,6 W/kg), n'exercent pas leur action inhibitrice sur l'activité électrique des neurones par l'intermédiaire des récepteurs GABA de type A (GABAA) (Lemercier et al., 2022).

Effets des RF millimétriques (30 à 300 GHz)

Une équipe de chercheurs américains s'est, quant à elle, plus particulièrement penchée sur l'effet des ondes millimétriques, une catégorie spécifique d'ondes radio dont les fréquences sont comprises entre 30 et 300 GHz. Leurs études présentent un grand intérêt dans le cadre du déploiement de la technologie 5G, qui utilisera en partie des fréquences hautes situées aux alentours de 26 GHz. Comparées aux RF actuellement utilisées en téléphonie mobile, les ondes millimétriques sont majoritairement absorbées à la surface du corps. Par conséquent, pour la dosimétrie, la grandeur physique utilisée est la Densité de Puissance Incidente (DPI), représentant l'énergie absorbée par unité de surface, exprimée en milliwatts par centimètre carré (mW/cm²). Les limites d'exposition aux ondes millimétriques sont fixées à 1 mW/cm². En 2010, cette équipe américaine focalisa sa recherche sur les conséquences d'une exposition aux ondes millimétriques sur l'activité neuronale. Pour cela, la technique électrophysiologique du patch-clamp fut employée sur des tranches de cortex de rat (Pikov et al., 2010). L'exposition aux ondes millimétriques (pendant 1 minute, à des DPI inférieures à 1 μW/cm²) induisait une diminution de la fréquence en spikes dans 50 % des neurones pyramidaux testés et un rétrécissement de la largeur des potentiels d'action mesurés. En 2014, les mêmes observations ont été faites sur un modèle biologique moins complexe, le ganglion segmentaire de la sangsue médicinale (Romanenko et al., 2014).

Conclusion

Sur les 15 études mentionnées dans cette section, 6 ne présentent aucun effet d'une exposition aux RF sur l'activité neuronale, tandis que les 9 autres mettent en évidence des effets significatifs. Ces effets vont majoritairement dans le sens d'une diminution de l'activité neuronale. En effet, 8 des 9 études citées montrent des effets inhibiteurs liés à l'exposition aux RF. En définitive, les études *in vitro* présentent des résultats contradictoires d'un groupe de recherche à l'autre. Cette divergence dans les résultats obtenus peut être attribuée à la diversité des approches utilisées, ce qui rend difficile une comparaison directe entre les différentes études. Les tableaux récapitulatifs (Tableau 5 et Tableau 6) des recherches sur les effets des RF sur l'activité électrique des neurones mettent en évidence la variabilité des paramètres expérimentaux utilisés (fréquences, modulations, niveaux d'exposition, méthodes d'enregistrement et durées d'exposition). Enfin, les résultats obtenus à partir des cultures neuronales ne sont pas directement extrapolables à l'Homme. Par conséquent, il est difficile de donner des conclusions définitives quant à l'effet des RF sur le système nerveux.

Pour conclure, bien que certaines recherches indiquent des changements possibles dans l'activité électrique des neurones exposés aux RF, il n'existe **pas de consensus scientifique sur l'existence d'un effet non-thermique**. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'interaction entre les RF et l'activité électrique des neurones.

Tableau 5 - Références mentionnées ne montrant pas d'effet de l'exposition aux RF sur l'activité électrique de neurones in vitro.

Référence	Sujet de l'étude	Fréquence porteuse	DAS	Modulation	Durée de l'exposition	Principaux effets
Courtney et al., 1975	Ganglions cervicaux supérieurs de lapin	2450 MHz	2 à 1000 W/kg	CW	1 min	Pas d'effet de l'exposition sur les réponses évoquées des ganglions cervicaux supérieurs de lapin.
Chung-Kwang Chou and Guy, 1978	Nerfs sciatiques de grenouille, nerfs saphènes de chat, nerfs vagues de lapin et ganglions cervicaux supérieurs de lapin	2450 MHz	0,3 à 1500 W/kg	CW et pulses (1 µsec avec 1000 pps ou 10 µsec avec 100 pps)	5 et 10 min	Pas d'effet de l'exposition, à l'exception des effets thermiques, sur la conduction des nerfs et des ganglions isolés.
Green et al., 2005	Cellules granulaires du cervelet et cardiomyocytes	380 MHz	5, 10, 20, 50 ou 400 mW/kg	TETRA	10 min	Pas d'effet de l'exposition sur la concentration calcique intracellulaire dans les cellules granulaires du cervelet et les cardiomyocytes, quels que soient les DAS testés.
Koester et al., 2007	Cultures primaires de neurones corticaux de souris	1,9-2,2 GHz	X	CW et UMTS	30 min	Pas de conclusion quant à l'effet de l'exposition sur l'activité neuronale (trop de bruit sur les électrodes d'enregistrement)
Oster et al., 2016	Cultures primaires de neurones corticaux de rat	900 MHz	0,36 W/kg	CW	Toutes les 2h pendant 15 min, 7 jours par semaine.	Pas d'effet de l'exposition sur l'activité électrique des neurones.
Kölher et al., 2018	Cultures primaires de neurones corticaux de rat	395 MHz	1,17 et 2,21 W/kg	TETRA	15 min (court terme) ou toutes les 2h pendant 15 min (long-terme)	Pas d'effet de l'exposition sur l'activité électrique des neurones.

Tableau 6 - Références mentionnées montrant des effets (inhibiteurs ou excitateurs) de l'exposition aux RF sur l'activité électrique de neurones in vitro.

Référence	Sujet de l'étude	Fréquence porteuse	DAS	Modulation	Durée de l'exposition	Principaux effets
Watchel et al., 1975	Ganglions du gastéropode marin Aplysia	1,5 et 2,45 GHz	0 à 50 mW/cm ³	CW et pulses (10 µsec, répétition entre 1 et 5 kHz)	~ 25 sec à 1 min	Augmentation de l'intervalle de temps entre les spikes individuels dans des neurones pacemakers. Ces effets sont reproductibles en augmentant la température.
Tattersall et al., 2001	Tranches d'hippocampe de rat	700 MHz	0,0016-0,0044 W/lg	CW	5, 10 et 15 min	L'exposition entraîne des changements significatifs dans l'activité électrique spontanée des neurones (sous la forme d'une réduction ou d'une abolition totale de l'activité électrique)
Xu et al., 2006	Cultures primaires de neurones hippocampiques de rat	1800 MHz	2,4 W/kg	GSM	Tous les jours pendant 15 min, sur une période de 8 jours	Diminution de l'activité synaptique excitatrice des neurones.
Pikov et al., 2010	Tranches de cortex cérébral de rat	60 GHz	< 1 µW/cm ²	CW	1 min	Diminution de la fréquence en spikes dans 50% des neurones testés et rétrécissement de la forme (phases ascendante et descendante) des potentiels d'action.
Moretti et al., 2013	Cultures primaires de neurones corticaux de rat	1800 MHz	25,6 W/kg*	GSM	3 min	Diminution réversible d'environ 30% du taux de spikes et de bursts pendant l'exposition.

Romanenko et al., 2014	Neurones ganglionnaires de sangsue	60 GHz	1, 2 et 4 mW/cm ²	CW	1 min	Augmentation dose-dépendante de l'hyperpolarisation des neurones. Diminution de l'amplitude des potentiels d'action. Rétrécissement de la forme des potentiels d'action (phases ascendante et descendante) et suppression du taux de décharge des neurones.
El Khoueiry et al., 2018	Cultures primaires de neurones corticaux de rat	1800 MHz	0,08 à 73 W/kg*	CW et GSM	15 min	Diminution dose-dépendante du taux de bursts pendant l'exposition. L'amplitude de l'effet est plus marquée pour les signaux modulés (GSM).
Echchgadda et al., 2022	Cultures primaires de neurones hippocampiques de rat	3,0 GHz	< 0,7 W/kg	CW	60 min	Modification de la forme du potentiel d'action (diminution de l'amplitude et augmentation du potentiel de membrane au repos) Augmentation de l'excitabilité des neurones. Augmentation de la concentration calcique intracellulaire.
Lemercier et al., 2022	Cultures primaires de neurones corticaux de rat	1800 MHz	28,6 W/kg	CW	15 min	Inhibition réversible des spikes et des bursts avec un effet plus important sur les bursts. Inhibition non médiée par les récepteurs GABA de type A (GABAAA).

*Valeurs de DAS obtenues suite à une réévaluation minutieuse de la dosimétrie effectuée dans l'étude de Nefzi et al., 2022.

1.2.4. Problématique de ma thèse

Le contexte dans lequel s'inscrit mon étude, ainsi que l'avancement des connaissances sur le sujet ont été présentés précédemment. Dans cette dernière partie de l'introduction, nous ferons une synthèse de ma problématique de thèse en abordant notamment l'approche expérimentale que j'ai adoptée, ainsi que les divers axes qui structurent l'ensemble de ma thèse.

1.2.4.1. Contexte sociétal et technologique de ma thèse

Ma problématique de thèse s'inscrit dans le cadre du développement récent de la technologie 5G, une nouvelle génération de téléphonie mobile. Cette technologie se caractérise principalement par l'utilisation de nouvelles bandes de fréquences, plus élevées que celles utilisées par les précédentes générations de téléphonie mobile. La 5G se caractérise également par la mise en place de nouvelles infrastructures, qui entraînent une augmentation du nombre de stations de base déployées sur le territoire. Par conséquent, ces changements suscitent de nouvelles préoccupations au sein de la population en ce qui concerne les effets potentiels de l'exposition aux RF sur la santé humaine.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse est de contribuer à l'évaluation des **risques sanitaires** liés aux signaux émis par cette nouvelle génération de téléphonie mobile. En parallèle, mon étude vise à vérifier que les normes encadrant les niveaux d'exposition aux RF sont correctement établies et adaptées à cette nouvelle technologie. Cette recherche est en partie financée par l'ANSES dans le cadre du projet 5G-SAMU (EST-2019 RF-18) mais également par la région Nouvelle Aquitaine dans le cadre du projet PHYSTRIG (AAPR2020A- 2019-8140010).

1.2.4.2. Question scientifique

L'une des nouvelles bandes de fréquence attribuées à la technologie 5G se situe aux alentours de 3,5 GHz. À cette fréquence, les ondes électromagnétiques ont la capacité de pénétrer dans les tissus sur quelques centimètres. Par conséquent, elles sont en mesure d'atteindre le cortex, une couche de substance grise qui recouvre la surface des hémisphères cérébraux. De plus, étant donné la proximité entre le téléphone portable et le cerveau pendant les appels téléphoniques, il est possible que le cortex soit l'une des cibles des radiofréquences. Ainsi, cette thèse vise à répondre à la question suivante : **Quels sont les effets des radiofréquences émises par la technologie 5G sur les neurones, les cellules prédominantes du cortex ?**

1.2.4.3. Approche expérimentale

Pour répondre à cette question scientifique, des réseaux de neurones *in vitro* ont été utilisés comme modèle biologique. Ce modèle se distingue par sa facilité de reproduction et sa capacité à générer une activité électrique spontanée. Pour réaliser des mesures en temps réel de l'activité neuronale, des neurones corticaux d'embryons de rats ont été cultivés sur des matrices de microélectrodes (MEAs), une méthode d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire. En effet, les MEAs sont équipés de multiples électrodes qui permettent de mesurer simultanément l'activité électrique de plusieurs neurones, offrant ainsi des informations sur l'activité globale des réseaux neuronaux.

Mon approche expérimentale repose sur l'utilisation d'un banc d'expérimentation unique au monde, combinant à la fois électrophysiologie et exposition aux radiofréquences. La composition de ce banc, permettant d'enregistrer l'activité électrique des neurones sous exposition, sera détaillée dans le chapitre suivant ([Chapitre 2 : MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS](#)).

1.2.4.4. Axes de travail de la thèse

Mon travail de thèse s'organise selon deux grands axes. L'un des axes s'intéresse aux effets des signaux 5G à 3,5 GHz sur l'activité électrique des neurones en culture. Les effets de ces signaux ont été étudiés en exposant les neurones à des niveaux de DAS proches des normes environnementales, mais également à des niveaux de DAS élevés, dépassant largement les normes. Le deuxième axe, quant à lui, se concentre sur l'influence de la température sur l'activité électrique des neurones, étant donné qu'une exposition aux radiofréquences s'accompagne d'une augmentation de la température, plus ou moins importante. Par conséquent, il est pertinent d'étudier les effets d'une modification de la température, non induite par les radiofréquences, sur l'activité neuronale. Si des effets significatifs de l'exposition aux RF sont observés sur l'activité électrique des neurones en culture, cette approche comparative ouvrirait une voie pour répondre à la question scientifique suivante : les effets constatés suite à l'exposition aux RF sont-ils de nature thermique ou non-thermique ?

1.2.4.5. Cadre du travail et collaborations

Ce travail de thèse découle d'une collaboration historique entre deux laboratoires ayant des domaines d'expertises différents. En effet, les laboratoires IMS⁸ (à Bordeaux) et XLIM⁹ (à Limoges) associent leurs compétences et méthodes depuis plusieurs années afin d'explorer un axe de recherche

⁸ Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (<https://www.ims-bordeaux.fr/>)

⁹ Laboratoire XLIM (<https://www.xlim.fr/>)

pluridisciplinaire sur les effets biologiques des champs électromagnétiques. Un tel sujet nécessite la convergence de compétences en biologie, en biophysique, en électrophysiologie, en physique des champs électromagnétiques, en automatique et en électronique.

Laboratoire IMS	Université de Bordeaux CNRS UMR-5218	<ul style="list-style-type: none">• Biologie• Physique• Electronique
Laboratoire XLIM	Université de Limoges CNRS UMR-7252	<ul style="list-style-type: none">• Conception et caractérisation physique des systèmes pour exposer des milieux biologiques à des champs radiofréquences

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Ce chapitre se décompose en deux grandes parties. La première partie illustre mes travaux de recherche portant sur les effets d'un signal 5G à 3,5 GHz sur l'activité neuronale. Ces données sont présentées sous la forme d'une publication scientifique. La seconde partie présente mes travaux de recherche visant à déterminer l'impact de la température sur l'activité électrique des neurones.

2.1. Effet d'une exposition aux signaux 5G à 3,5 GHz sur l'activité électrique des neurones (article)

2.1.1. Introduction à l'article

Cette introduction donne des éléments supplémentaires à ceux décrits dans l'article, à la fois sur le modèle biologique et le système d'exposition.

2.1.1.1. Modèle biologique et technique d'électrophysiologie

Comme je le mentionnais précédemment, nous utilisons des réseaux de neurones *in vitro* comme modèle biologique pour étudier l'effet d'une exposition aux RF sur l'activité neuronale. L'un des principaux avantages inhérents à ce modèle réside dans sa capacité à développer une activité électrique spontanée.

L'**activité électrique spontanée**, également appelée activité cérébrale intrinsèque, fait référence aux signaux électriques naturellement générés par les neurones sans stimulation sensorielle ou motrice. Sa manifestation la plus évidente se produit pendant le sommeil, lorsque les perceptions sensorielles et les mouvements moteurs sont réduits. Cependant, des études de neuroimagerie indiquent que, même pendant les états d'éveil, des régions cérébrales sans lien avec une tâche ou une fonction spécifique sont actives (Fox and Raichle, 2007).

Afin d'enregistrer les signaux émis par les neurones en culture, nous employons une technique d'enregistrement extracellulaire qui repose sur l'utilisation des MEAs. Ces dispositifs se distinguent par leur capacité à enregistrer l'activité électrique globale des réseaux neuronaux en détectant simultanément l'activité électrique de multiples neurones.

Dans les cultures de neurones *in vitro*, une activité électrique spontanée se met en place après plusieurs jours de culture. En effet, à la fin de la première semaine de culture, une activité électrique spontanée apparaît sous la forme de spikes isolés et non synchronisés, reflétant les potentiels d'action des neurones. Au cours de la deuxième semaine de culture, on observe une évolution progressive de l'activité électrique vers des séquences rapides de décharges neuronales appelées « bursts » (Van Pelt et al., 2004a). Ces bursts correspondent à une succession rapprochée de spikes. La synchronisation des bursts entre les différents neurones s'intensifie progressivement au cours du temps, tandis que l'activité en spikes isolés tend à disparaître complètement (Figure 20). À partir de la troisième semaine de culture, de tels réseaux de neurones présentent des « network bursts », c'est-à-dire des bursts extrêmement synchronisés à l'échelle de la MEA (Chiappalone et al., 2007). Cette transition indique une maturation des connexions neuronales et une coordination accrue entre les neurones. Ce schéma de développement des signaux électriques spontanés, passant des spikes isolés aux bursts et aux network bursts, est relativement reproductible dans les cultures de neurones dissociés (Wagenaar et al., 2006; Streit et al., 2001).

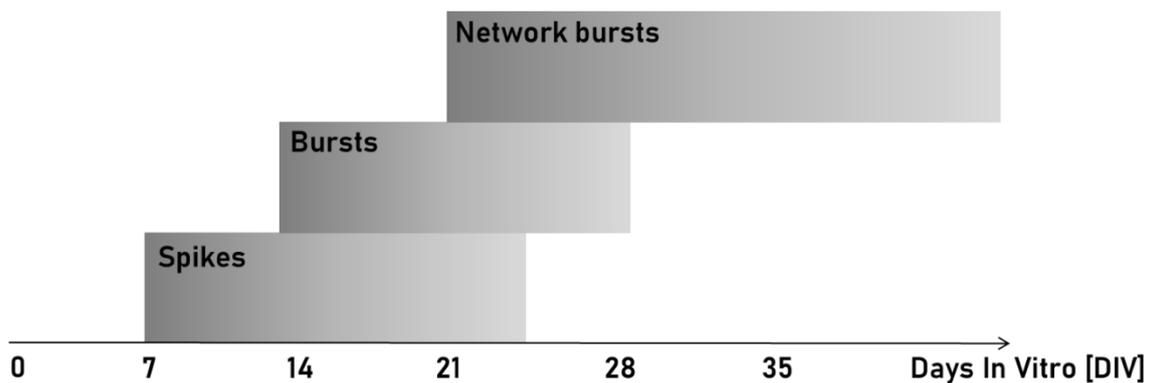


Figure 20 - Évolution de l'activité électrique en fonction de l'âge des cultures.

Les événements de type « bursts » sont relativement rares chez les humains et les animaux, ne se produisant que dans des conditions spécifiques. Par exemple, dans certaines pathologies telle que l'épilepsie, des anomalies perturbent l'activité normale des neurones, entraînant des décharges électriques excessives et extrêmement synchronisées (Stafstrom and Carmant, 2015). En revanche, dans les cultures de neurones *in vitro*, les bursts sont courants et prédominants. Les caractéristiques principales de ces bursts sont assez homogènes, même entre les différents laboratoires (Wagenaar et al., 2006; Van Pelt et al., 2004b).

2.1.1.2. Système d'électrophysiologie *in vitro* sous radiofréquences

Dans le cadre de notre étude, nous utilisons un **système unique et très innovant** qui permet de réaliser des mesures en temps réel de l'activité neuronale sous exposition aux radiofréquences. Pour rappel, dans ce système, l'activité électrique des neurones est enregistrée à l'aide de MEAs. Pour assurer une exposition uniforme des cultures de neurones, les MEAs sont disposés au centre d'une cellule transverse électromagnétique (TEM). La conception de ce système s'est faite en étroite collaboration avec des collègues physiciens (Philippe Lévêque et Delia Arnaud-Cormos) du laboratoire XLIM, à Limoges.

Choix des MEAs

Les MEAs sont des outils efficaces pour étudier l'activité des réseaux de neurones *in vitro* et offrent ainsi des perspectives supplémentaires dans la compréhension des potentiels effets des RF sur le système nerveux. Certaines études sur le sujet ont déjà fait usage de ces dispositifs, qui sont à la fois durables et réutilisables (Köhler et al., 2018; Oster et al., 2016; Koester et al., 2007). Afin d'éviter de potentielles interférences des RF avec les composants électroniques présents dans les MEAs actives, mes collègues ont fait le choix d'utiliser des MEAs passives. Ces MEAs sont principalement composées d'une **chambre de culture** (ou puits de culture), d'une **puce en verre** servant de substrat pour les électrodes et les pistes de connexion, et d'une **carte de circuits imprimés** (PCB).

Deux MEAs, provenant de deux fabricants différents (Qwane Biosciences et Multi Channel Systems), ont été personnalisées et modifiées afin de s'adapter parfaitement à notre système d'exposition aux radiofréquences. Pour chacune de ces MEAs, les pistes de connexion métalliques sont isolées de la solution biologique par une couche isolante (en SU-8 ou nitrure de silicium), laissant les électrodes découvertes pour permettre le contact avec les neurones. Elles comprennent 60 électrodes (en platine ou en nitrure de titane) formant une matrice de (presque) 8 x 8 électrodes, dont 59 sont utilisées pour l'enregistrement des réponses neuronales alors que la dernière piste sert de référence (Figure 21, Figure 22).

- Première version de MEAs customisées

Dans le cadre de nos expériences, la MEA doit être placée au-dessus du préamplificateur (MEA1060-Inv, Multi Channel Systems, Reutlingen, Allemagne) pour permettre l'insertion de la chambre de culture à l'intérieur du système d'exposition. Ainsi, la première interface électrophysiologique utilisée par mon équipe était une MEA commerciale personnalisée de chez Qwane Biosciences (Qwane Biosciences, Lausanne, Suisse). Dans cette version customisée, les plots de connexion ont été déplacés vers la face inférieure du PCB afin d'assurer une connexion avec le préamplificateur et permettre la récupération des signaux lors des expositions RF des neurones. De plus, afin d'améliorer la rigidité mécanique et l'isolation électrique, une couche métallique fut insérée dans le PCB et connectée à l'électrode de

référence (Figure 21). Cette MEA, conçue sur mesure par la société Qwane Biosciences, est décrite en détail dans la publication de Merla et al. (2011). Elle fut notamment utilisée par mon équipe pour étudier l'effet d'une exposition GSM-1800 MHz sur l'activité électrique de neurones en culture (El Khoueiry et al., 2018; Moretti et al., 2013).

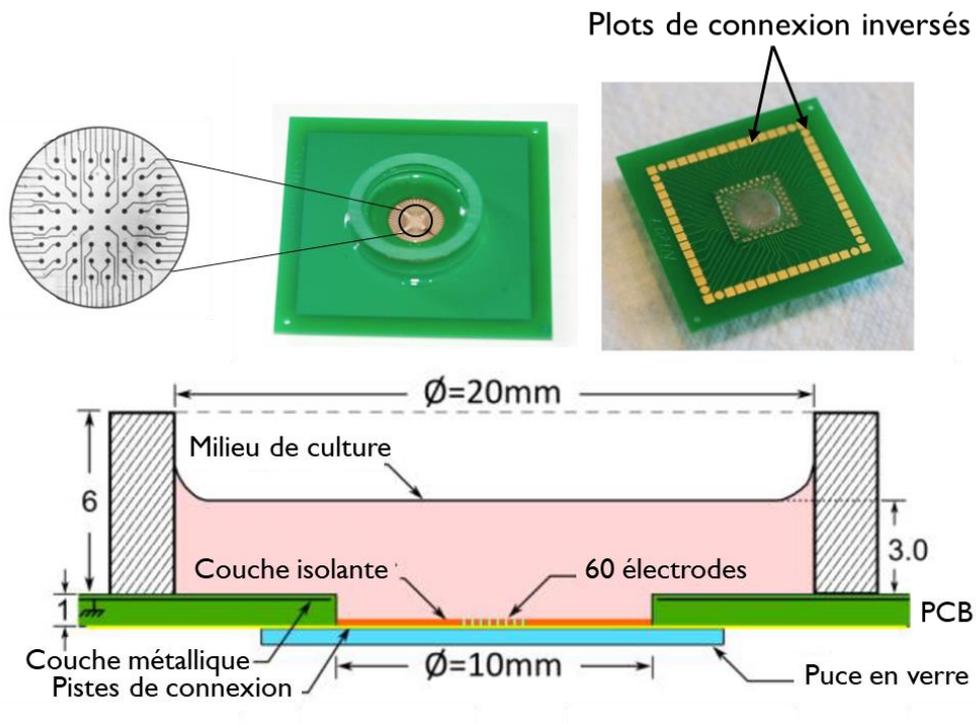


Figure 21 - MEA customisée de chez Qwane Biosciences. La MEA possède une couche métallique dans la carte de circuits imprimés (PCB). Le PCB dispose d'une ouverture de 10 mm de diamètre pour l'observation des cellules au microscope. La puce en verre de 15 x 15 mm est fixée en dessous du PCB. La couche isolante est en SU-8. Les électrodes sont en platine, ont un diamètre de 40 μm et sont placées à 200 μm de distance les unes des autres. Les plots de connexions sont situés sur la face inférieure du PCB (image adaptée de Nefzi et al., 2022).

- Deuxième version de MEAs customisées

Dans le but d'améliorer la **compatibilité électromagnétique** de notre dispositif expérimental en garantissant la stabilité du DAS et de la température pendant l'exposition, une deuxième version de MEAs personnalisées provenant de chez MCS (Multi-Channel Systems, Reutlingen, Allemagne) fut utilisée par mon équipe (Nefzi et al., 2022). Les principales différences par rapport à la première version sont les suivantes : (1) le nombre de plans métalliques à l'intérieur du PCB, (2) la taille de l'ouverture dans le PCB, et (3) la forme de la chambre de culture (Figure 22). **Ces MEAs customisées sont celles qui ont été utilisées dans le cadre de mes expériences pour répondre à ma problématique de thèse.**

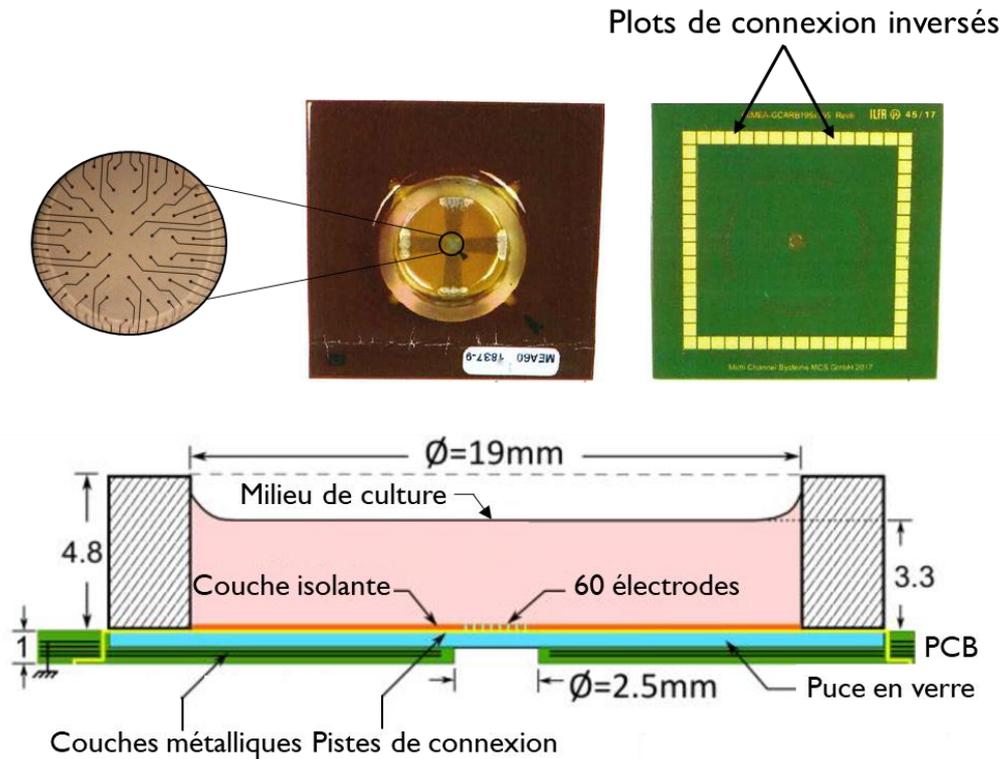


Figure 22 - MEA customisée de chez MCS. La MEA possède 4 couches métalliques dans la carte de circuits imprimés (PCB). Le PCB dispose d'une petite ouverture de 2,5 mm pour l'observation des cellules au microscope. La puce en verre est placée au-dessus du PCB. La couche isolante est en nitrure de silicium (SiN). Les électrodes sont nitrure de titane (TiN), ont un diamètre de 30 μm et sont placées à 200 μm de distance les unes des autres. Les plots de connexion sont situés sur la face inférieure du PCB (image adaptée de Nefzi et al., 2022)

Choix de la cellule transverse électromagnétique (TEM)

Afin d'exposer de façon homogène les cultures de neurones aux RF, mes collègues ont fait le choix d'utiliser une **cellule TEM ouverte**. Des outils similaires ont déjà été utilisés dans de précédentes études portant sur les effets des CEM sur des échantillons biologiques (O'Connor et al., 2010; Moisescu et al., 2008). En effet, la cellule TEM est souvent utilisée dans les études en bioélectromagnétisme et fut introduite pour la première fois en 1974 par Myron L. Crawford (Crawford, 1974).

Comme l'indique la [Figure 23](#), la cellule TEM utilisée dans nos expériences se compose de deux plaques extérieures connectées à une référence (à la masse) et d'une plaque centrale, également appelée septum, qui est connectée à un générateur d'ondes radiofréquences. Elle est conçue pour permettre l'exposition d'une seule MEA à la fois, qui s'insère parfaitement dans la cellule TEM à travers une ouverture circulaire réalisée dans la plaque de mise à la masse inférieure (Merla et al., 2011).

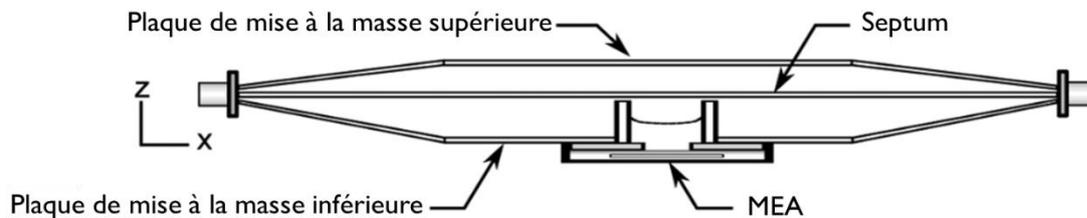


Figure 23 - Positionnement de la MEA dans la cellule TEM ouverte (image adaptée de Merla et al., 2011)

Cette cellule TEM se distingue par sa structure ouverte, offrant de nombreux avantages dans le cadre de nos expériences. En effet, elle permet un accès facile aux échantillons biologiques, une circulation optimale de l'air et du CO₂ et une surveillance en temps réel de la température. De plus, elle présente l'avantage d'être à large bande, nous permettant de travailler à différentes fréquences (1 à 4 GHz). Enfin, elle fournit un champ électrique extrêmement uniforme et homogène dans la zone d'intérêt. Les lignes de champs électrique dans la cellule TEM sont orthogonales à la surface des électrodes de la MEA, minimisant ainsi leurs interférences avec les champs électromagnétiques (Merla et al., 2011). Le système d'exposition dans son ensemble est décrit avec plus de précisions dans l'article (voir partie 2.1.2 de la thèse) qui vise à étudier l'effet d'une exposition aux signaux 5G à 3,5 GHz sur l'activité électrique de réseaux de neurones *in vitro*.

2.1.2. Article Canovi et al., 2023

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses recherches ont été réalisées sur les effets potentiels d'une exposition aux champs électromagnétiques radiofréquences (CEM-RF) sur le vivant, principalement en raison de la multiplication du nombre d'appareils connectés. Jusqu'à présent les seuls effets établis d'une exposition aux CEM-RF sur les tissus biologiques sont thermiques. Ces effets sont parfaitement caractérisés, et des normes environnementales ont été mises en place pour protéger la population des effets thermiques indésirables. Cependant, certains auteurs signalent l'existence d'effets biologiques non-thermiques à de faibles niveaux de DAS, c'est-à-dire à des niveaux en dessous des normes environnementales. Ces potentiels effets non-thermiques font encore l'objet de recherches et de discussions, et il n'existe pas de consensus scientifique sur leur importance et leur impact réel sur la santé humaine. Aujourd'hui, à une époque où les progrès technologiques redéfinissent notre mode de

vie, il est nécessaire de poursuivre les recherches pour approfondir notre compréhension des effets des CEM-RF sur les organismes vivants. Cela devient d'autant plus urgent avec l'arrivée de nouvelles technologies sans fil, comme la 5G, qui visent à améliorer les technologies précédentes en proposant des débits de données encore plus élevés et des délais de latence réduits.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon étude visant à évaluer les potentiels effets des signaux 5G sur l'activité électrique des neurones. Ces cellules, en raison de leur nature excitable et de leur proximité avec des dispositifs de communication sans fil tels que les téléphones portables, pourraient être l'une des cibles potentielles des signaux 5G à 3,5 GHz.

Afin d'évaluer les effets potentiels de l'exposition aux signaux 5G sur l'activité neuronale, des cultures de neurones provenant du cortex d'embryons de rat ont été cultivées sur des MEAs. Par la suite, ces cultures neuronales ont été placées au sein d'une cellule TEM et exposées pendant 15 minutes à une fréquence de 3,5 GHz, soit en utilisant des signaux modulés (5G), soit non-modulés (CW). Les DAS utilisés se situaient à des niveaux proches des normes environnementales pour une exposition locale de la tête (1 et 3 W/kg), ainsi qu'à des niveaux largement supérieurs aux normes (28 W/kg).

Les résultats obtenus indiquent qu'à des niveaux proches des normes environnementales (1 et 3 W/kg), l'exposition aux signaux 5G n'affecte pas l'activité électrique des neurones en culture. Cependant, à des niveaux de DAS élevés (28 W/kg), nous observons une inhibition réversible de l'activité électrique des neurones, touchant principalement le nombre moyen de bursts. **Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Frontiers in Public Health » (publiée le 07 Août 2023) (Canovi et al., 2023).**



OPEN ACCESS

EDITED BY

Caterina Merla,
Energy and Sustainable Economic
Development (ENEA), Italy

REVIEWED BY

Rosanna Pinto,
Energy and Sustainable Economic
Development (ENEA), Italy
Antonio Sarolic,
University of Split, FESB, Croatia

*CORRESPONDENCE

Noëlle Lewis
✉ noelle.lewis@u-bordeaux.fr

RECEIVED 30 May 2023

ACCEPTED 18 July 2023

PUBLISHED 07 August 2023

CITATION

Canovi A, Orlacchio R, Poulletier de Gannes F, Lévêque P, Arnaud-Cormos D, Lagroye I, Garenne A, Percherancier Y and Lewis N (2023) *In vitro* exposure of neuronal networks to the 5G-3.5 GHz signal. *Front. Public Health* 11:1231360. doi: 10.3389/fpubh.2023.1231360

COPYRIGHT

© 2023 Canovi, Orlacchio, Poulletier de Gannes, Lévêque, Arnaud-Cormos, Lagroye, Garenne, Percherancier and Lewis. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

In vitro exposure of neuronal networks to the 5G-3.5 GHz signal

Anne Canovi¹, Rosa Orlacchio^{1,2}, Florence Poulletier de Gannes¹, Philippe Lévêque³, Delia Arnaud-Cormos^{3,4}, Isabelle Lagroye^{1,2}, André Garenne¹, Yann Percherancier¹ and Noëlle Lewis^{1*}

¹Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, IMS, UMR 5218, Talence, France, ²Paris Sciences et Lettres Research University, École Pratique des Hautes Études (EPHE), Paris, France, ³Univ. Limoges, CNRS, XLIM, UMR 7252, Limoges, France, ⁴Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

Introduction: The current deployment of the fifth generation (5G) of wireless communications raises new questions about the potential health effects of exposure to radiofrequency (RF) fields. So far, most of the established biological effects of RF have been known to be caused by heating. We previously reported inhibition of the spontaneous electrical activity of neuronal networks *in vitro* when exposed to 1.8 GHz signals at specific absorption rates (SAR) well above the guidelines. The present study aimed to assess the effects of RF fields at 3.5 GHz, one of the frequencies related to 5G, on neuronal activity *in-vitro*. Potential differences in the effects elicited by continuous-wave (CW) and 5G-modulated signals were also investigated.

Methods: Spontaneous activity of neuronal cultures from embryonic cortices was recorded using 60-electrode multi-electrode arrays (MEAs) between 17 and 27 days *in vitro*. The neuronal cultures were subjected to 15 min RF exposures at SAR of 1, 3, and 28 W/kg.

Results: At SAR close to the guidelines (1 and 3 W/kg), we found no conclusive evidence that 3.5 GHz RF exposure impacts the activity of neurons *in vitro*. On the contrary, CW and 5G-modulated signals elicited a clear decrease in bursting and total firing rates during RF exposure at high SAR levels (28 W/kg). Our experimental findings extend our previous results, showing that RF, at 1.8 to 3.5 GHz, inhibits the electrical activity of neurons *in vitro* at levels above environmental standards.

KEYWORDS

radio-frequency fields, electrical activity, neuronal networks, *in vitro*, 3.5 GHz, 5G signal

1. Introduction

For the last two decades, a very large number of research reports has focused on the potential health effects of radiofrequency electromagnetic field (RF-EMF; 100 kHz to 300 GHz) exposures, mainly due to the rise of wireless communication systems. So far, the only characterized effect of RF-EMF on living organisms has been dielectric-relaxation heating. To protect people against adverse effects induced by heating, the International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) has provided exposure limits for wireless communications devices, generally expressed in terms of specific absorption rate (SAR), in watts per kilogram (W/kg). The recommended limit for whole-body exposure is 0.08 W/kg, while the SAR limit for local exposure of the head is 2 W/kg (1).

Some authors have also reported non-thermal biological effects of low SAR level RF-EMF (i.e., levels below the international guidelines). However, no plausible mechanistic hypotheses

have been proposed, making it difficult to draw conclusions based on available experimental results (2–4).

Few epidemiological studies have also suggested an increased risk of glioma associated with extensive mobile-phone use. In 2011, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified RF-EMF as possibly carcinogenic to humans. However, research conducted on animals and cells has failed to confirm the findings of the epidemiological studies, and there is no biophysical mechanism that could explain the carcinogenicity at such low levels of exposure (5).

Nowadays, questions about the potential health effects of RF-EMF exposure remain relevant, given the current deployment of the fifth generation (5G) of wireless networks, designed to improve on the 4G technology with higher data speeds and faster response rates. To avoid network congestion, the 5G technology will use new frequency bands around 3.5 and 26 GHz, in addition to those already deployed for previous technologies like 2G, 3G, and 4G. Due to its short wavelength, the 26 GHz signal cannot penetrate more than 1–2 mm into the body and, therefore, cannot penetrate deeply enough to reach the brain. In contrast, the 3.5 GHz signal can penetrate into the body and reach the cortex (6). Consequently, given the proximity between the mobile phone and the head, the central nervous system (CNS) remains one of the targets of 5G signals at 3.5 GHz.

We previously reported decreased firing and bursting rates of cortical neuronal cultures exposed to a GSM signal at 1.8 GHz for 3 min (7). We then assessed the dose-response relationship and identified potential differences in the response elicited by pulse-modulated GSM and continuous wave (CW) RF fields (7, 8). Both GSM-modulated and CW signals elicited an important decrease in bursting rate during the RF exposure phase at levels higher than environmental guidelines. A recent dosimetry study (9) led us to improve our experimental bench with new custom multi-electrode arrays (MEAs) allowing high exposure homogeneity. Beyond these adjustments, our experiments provided strong evidence of decreased electrical activity of cortical neuronal cultures during RF exposure. In a further effort to identify the inhibitory mechanisms triggered by RF exposure on cortical neurons, we next have shown that they differ from the ones mediated by the activation of GABA A receptors (10).

The research presented here aimed to investigate the potential effects of 3.5 GHz RF exposure on neuronal response *in vitro*, depending on SAR (1, 3, and 28 W/kg) and type of RF signals (CW and 5G). Specifically, we assessed the impact of RF exposure on cortical neuronal networks spiking and bursting activities.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of dissociated cortical neurons

We performed electrophysiological recordings of neuronal networks using MEAs as described previously (10). The active area of each MEA was coated with 0.1 mg/mL poly-L-lysine (PLL) (Sigma-Aldrich) and 0.05 mg/mL laminin (Sigma-Aldrich) for improved adherence.

Dissociated primary cortical neurons were isolated from the cortex of embryonic (E18–E19) Sprague–Dawley rats (Janvier-Labs, Saint-Berthevin, France) as described in Moretti et al. (7). Following 5% isoflurane anesthesia, gestating rats were euthanized by cervical

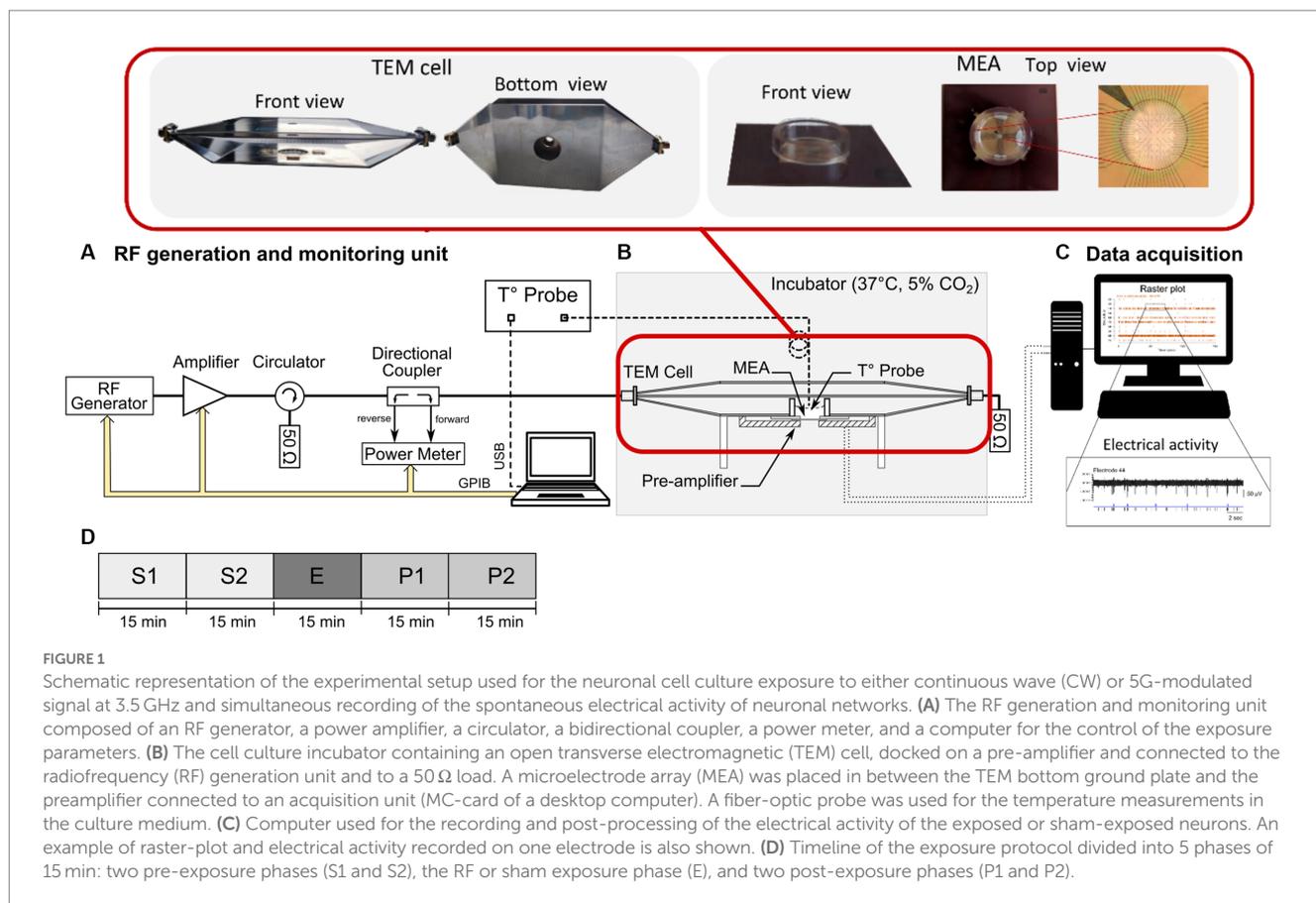
dislocation. Embryos were collected and decapitated. Their cortices were dissected in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Fisher Scientific, Illkirch, France). Cortices were treated for 30 min with an enzymatic solution containing 20 units/mL of papain and 0.005% DNase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, United States). The fragments were subjected to mechanical dissociation using a 10 mL serological pipette and centrifuged at 300 g for 5 min at room temperature. The supernatant was eliminated, and the pellet composed of cortical cells was placed in a solution containing DNase. This mixture was first placed above an albumin-inhibitor solution to create a discontinuous density gradient and was then centrifuged at 70 g for 6 min at room temperature. Finally, pellet-dissociated cortical cells were suspended in a culture medium composed of neurobasal medium (NBM) (Fisher Scientific) supplemented with 2% B-27, 1% GlutaMAX, and 1% penicillin-streptomycin (Fisher Scientific). Each MEA was plated with 10^5 cells and kept in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂) until recording. The culture medium was replaced by fresh and pre-warmed medium every 48 h.

2.2. Electrophysiological recording system

In the current study, the electrophysiological interface used to grow neuronal networks was a commercial MEA containing a 60 titanium nitride electrodes array (200 μ m spaced with 30 μ m-diameter tips) including one internal reference electrode (upper right panel of Figure 1) (60MEA200/30iR-Ti-Upside Down, Multi-Channel Systems, MCS, GmbH, Reutlingen, Germany). The MEA culture chamber was made with a 4.8 mm-high, 19 mm inner-diameter glass ring sealed with biocompatible silicone. This MEA was customized to have the contact pads underneath the printed circuit board (PCB) (9) and connected to the pre-amplifier (MEA1060-Inv, MCS GmbH, gain of 1,200), placed below the MEA, as depicted in Figure 1B. Electrophysiological recordings were performed in a dry incubator to maintain the desired cellular physiological conditions (37°C, 5% CO₂). To avoid evaporation of the culture medium during the experiment, the MEA was covered with a plastic lid with a removable membrane. Neuronal signals were acquired through an MCS data acquisition board (MC_Card, MCS) at 10 kHz/channel and visualized with the MC Rack software (MCS GmbH) (Figure 1C).

2.3. Post-processing of the electrophysiological signal

The electrical activity of neuronal cultures was analyzed using the SPYCODE software (11) developed in MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, MA, United States). Spiking activity was detected using the differential threshold precision timing spike detection (PTSD) method (12). This algorithm detects one spike when the peak-to-peak amplitude of the signal exceeds eight times the standard deviation (SD) of the biological noise in a 2 ms sliding window. The SD of the biological noise was evaluated for each recording channel in the pre-exposure phase. Bursts were then detected using the method described by Pasquale et al. (13). The algorithm is based on the computation of the logarithmic inter-spike interval (ISI) histogram and automatically detects the best ISI threshold for finally



distinguishing between spikes inside or outside bursts for each recording channel of the array. An analogue thresholding method was used to detect network bursts, based on an inter-burst interval (IBI) histogram combined with a synchronization criterion implicating at least 20% of the electrodes (13).

2.4. RF exposure system

The experimental setup used for RF exposure is described in our previous works (7–10) and schematically shown in Figure 1. Briefly, it consists of three main units including (i) an open transverse electromagnetic (TEM) cell (Figure 1B), (ii) an RF signal generation unit (Figure 1A), and (iii) a computer for monitoring the exposure parameters, namely incident power, and exposure duration (Figure 1A). The incubator shields the system from possible external electromagnetic interferences. The TEM cell length is 160 mm and the widths of the central septum, and the two external plates are 30 mm and 85 mm, respectively. Given the ratio between the TEM cell septum width (30 mm) and total height (21 mm), a cut-off frequency of around 6 GHz is obtained for symmetrical structures. This is high enough to support the TEM cell use up to 3.5 GHz. The specific customization of MEAs was made to ensure highly uniform exposure of the neuronal cultures and to improve the electromagnetic compatibility of the experimental device by allowing the stability of the SAR and temperature during RF exposure (9, 14). During exposure, the MEA was located between the TEM bottom ground plate, through a 24 mm diameter aperture (upper left panel of Figure 1) and pre-amplifier. Moreover, the pre-amplifier

was shielded with RF absorbers to avoid residual interference with the recording system. The RF generation unit was located outside the incubator (Figure 1A) and consisted of (i) an RF signal generator (SMBV100A, Rohde & Schwarz) used to generate either CW or 5G-modulated signal at 3.5 GHz, (ii) a 25 dB gain amplifier (Mini-circuits, ZHL-4W-422+, NY, United States), (iii) a circulator (Pasternack, PE83CR1005, CA, United States), (iv) a bidirectional coupler (Mini-circuits, ZGBDC30-372HP+, NY, United States), and (v) a power-meter (N1912A, Keysight, United States) with two power sensors (N1921A, Keysight, United States) to monitor in real-time the incident and reflected powers at the TEM cell input. The 3.5 GHz 5G signal used corresponds to 5G NR (release 15, Digital Standards SMBVB-K444, Rohde & Schwarz) with FDD duplexing, QPSK modulation and 100 MHz channel bandwidth. The signal was led to the TEM cell through a 1.5 m coaxial precision test cable (CBL-1.5 m-SMNM+, Mini-circuits, United States; 1.2 dB insertion loss at 3.5 GHz) and SMA connectors. To consider the losses along the entire chain, the actual power was measured at the end of the coaxial cable, therefore at the TEM cell input. To absorb transmitted power and prevent wave reflection, the TEM cell output port was connected to a 50 Ω load (PE6185, Pasternack, United States), sustaining up to 10 W power with 6 GHz bandwidth.

2.5. RF dosimetry

RF dosimetry, i.e., the quantification of the energy absorbed by the biological samples exposed to an electromagnetic field, is fundamental

to ensure the reproducibility and reliability of bioelectromagnetic results (15). In this study, well-defined exposure conditions were obtained through numerical and experimental dosimetry. SAR, the electromagnetic power dissipated per unit mass in the exposed sample (W/kg), was quantified as the metric to define the exposure level. Therefore, numerical simulations and temperature measurements were performed to precisely characterize the exposure conditions of this study: 0.7 mL, 2.3 mm height of culture medium exposed at 3.5 GHz.

Numerical dosimetry represents the direct resolution of Maxwell's equations under the specific exposure conditions performed through computer simulations. As in our previous studies, a custom finite difference time domain (FDTD)-based code was used to extract both local and volume SAR levels of the exposed samples defined as the SAR values averaged over 0.5 mm³ and the whole exposed culture medium, respectively (9, 16, 17). All MEA components except the electrodes and the top conductor tracks were simulated. The metallic components were modeled as perfect electric conductors (PEC). Conductivity (σ) and relative permittivity (ϵ_r) used to simulate the culture medium at 3.5 GHz were measured using a slim dielectric probe (85070E Dielectric probe kit, Agilent, United States) and were equal to 3.85 S/m and 70, respectively (at 37°C). The culture chamber, the glass chip, and the PCB were defined as loss-free materials with ϵ_r equal to 4.6, 7, and 4.4, respectively. A volume of 0.7 mL of culture medium with a meniscus was used in the simulation. For accurate results, non-uniform adaptive meshing was used with a 100 μ m finest meshing size.

Besides numerical simulation, the experimental local SAR was extracted from the exponential fitting of the initial phase of the electromagnetic-induced temperature elevation of the culture medium under RF exposure:

$$\text{SAR} = C \left. \frac{\partial T}{\partial t} \right|_{t=t_0} \quad (1)$$

where C is the sample heat capacity {4196.8 [J/(kg K)]}, and dT/dt is the initial slope of the temperature curve. A representative example of the fitting curve used to calculate local SAR is shown in Figure 2B. For temperature measurements, a fiber-optic thermometer (Luxtron One, Lumasense Technologies, CA, United States, accuracy $\pm 5\%$), with a tip having an approximated volume of 0.5 mm³ was used. The probe was vertically deepened, at the center of the MEA, in the culture medium to ensure contact with the bottom of the culture chamber where neurons are located during the exposure. Reproducibility was assured by at least three measurements per condition.

Both measurements and simulations were performed without cells since a thin cell monolayer does not significantly affect local SAR distribution.

2.6. Protocol for cells RF exposure

Neuronal cultures were exposed between 17 and 27 days *in vitro* (DIV). In this range, the neuronal activity is balanced between random spikes and bursts (18, 19). In all experiments, after placing the MEA in the recording setup, we waited for the stabilization of the temperature inside the incubator to work under standard cell culture

conditions (37°C, 5% CO₂). The experimental protocol lasted 75 min and was divided into 5 phases of 15 min, including two pre-exposure (S1 and S2), one exposure (E), and two post-exposure phases (P1 and P2), as schematically represented in Figure 1D. Sham exposures were carried out using the same protocol but with no RF-EMF emitted. During the RF exposure phase (E), we used both CW and 5G-modulated 3.5 GHz RF signals at SAR values of 1 or 3 W/kg, slightly below or above the ICNIRP guidelines for local exposure.

We also assessed the effects of high-level signals (SAR of 28 W/kg) as we previously observed an inhibitory effect of CW 1.8 GHz-RF exposure at 28 W/kg (10). In this previous study, the experimental conditions differed on one point: the culture medium was continuously perfused. Therefore, to characterize the role of carrier frequency and compare experiments under identical conditions, we also conducted RF exposure with a 1.8 GHz CW signal at 28 W/kg, with the setup described in the section "RF exposure system."

Each culture was exposed to only one SAR exposure condition (1 or 3 or 28 W/kg). To guarantee the reproducibility of results, each experiment was carried out at least 8 times. The exact number of experiments for each exposure condition is detailed in the figure caption.

2.7. Exposure of cells to heat

To assess the role of temperature elevation during RF exposure, neuronal cultures were also subjected to direct heating in the absence of RF. To perform these experiments, the same five-phase protocol (as described above) was used but the E phase corresponded to heating the culture medium using a warming plate located underneath the MEA. The heating was regulated by a specific controller (TC01, MCS) that was adjusted to reach the temperature increase caused by RF-induced heating in the culture medium at 28 W/kg.

2.8. Choice of metrics and data analysis

To characterize the neuronal activity and quantify RF-induced changes in the network activity, four metrics were assessed for each recording phase. Since neuronal cultures exhibit activity patterns that include both spikes and bursts, we used metrics characterizing either spiking or bursting activity.

- 1) Mean firing rate (MFR)

$$\text{MFR} = \frac{\sum \text{FR}}{N_S(S1)} \quad (2)$$

where FR is the firing rate, i.e., the total number of spikes per second collected over all active electrodes, and N_S (S1) is the total number of active electrodes in terms of spiking activity in the S1 phase. N_S was calculated by considering an electrode active when its spike rate was at least 0.1 Hz.

- 2) Mean bursting rate (MBR)

$$\text{MBR} = \frac{\sum \text{BR}}{N_B(S1)} \quad (3)$$

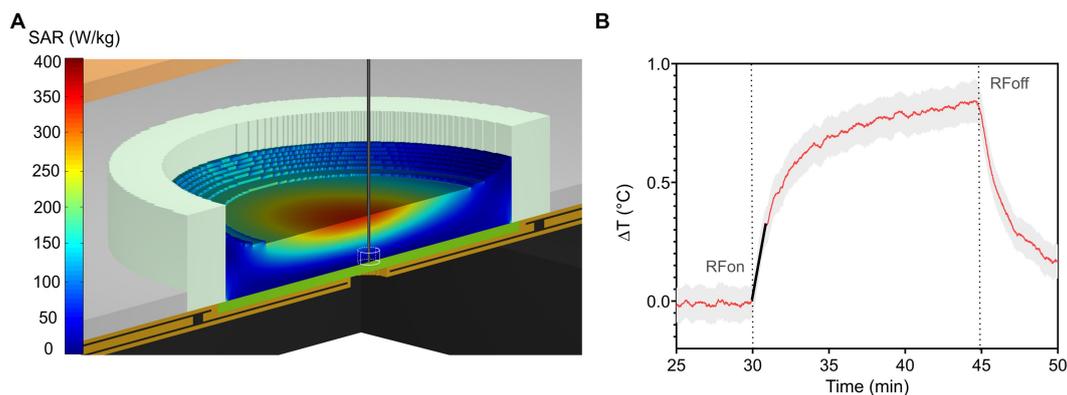


FIGURE 2

(A) Numerical SAR distribution normalized to 1 W incident power at 3.5 GHz along a vertical cut across the TEM cell and MEA filled with 0.7 mL of culture medium. The straight vertical black line represents the thermal probe located at the bottom of the MEA used for the experimental measurement of local SAR within an approximate volume of 0.5 mm³. (B) Induced-temperature elevation of RF-exposed culture medium with an incident power of 1 W. The red solid trace represents the average temperature elevation, while the grey area represents the standard deviation. The slope at the origin of the transient curve is represented by the solid black line (at $t = 30$ min). Its value is used to determine experimental local SAR.

where BR is the bursting rate, i.e., the total number of bursts per minute collected over all active electrodes, and N_B (S1) is the total number of active electrodes in terms of bursting activity in the S1 phase. N_B was calculated by considering an electrode active when its burst rate was at least 0.04 Hz.

3) Mean burst duration (MBD)

$$MBD = \frac{\sum BD}{N_B} \quad (4)$$

where BD is the burst duration defined as the average burst duration calculated across all active electrodes.

4) Mean outside bursts firing rate (M_{OBFR})

$$M_{OBFR} = \frac{\sum_{OBFR}}{N_{B(S1)}} \quad (5)$$

where $_{OBFR}$ is the outside bursts firing rate, i.e., the total number of isolated spikes (occurring outside bursts) per second collected over all active electrodes.

To properly characterize the effect of RF exposure on the entire neuronal network, we only considered the number of active electrodes in the S1 phase. Moreover, to deal with the basal electrical activity variability, these four metrics were normalized by considering the S1 phase as 100%. Multiple comparison tests were performed using Kruskal–Wallis, followed by Conover's post-hoc test. Statistical analyses were performed with R (20) and the PMCMRplus (21) package.

3. Results

3.1. Numerical and experimental dosimetry at 3.5 GHz

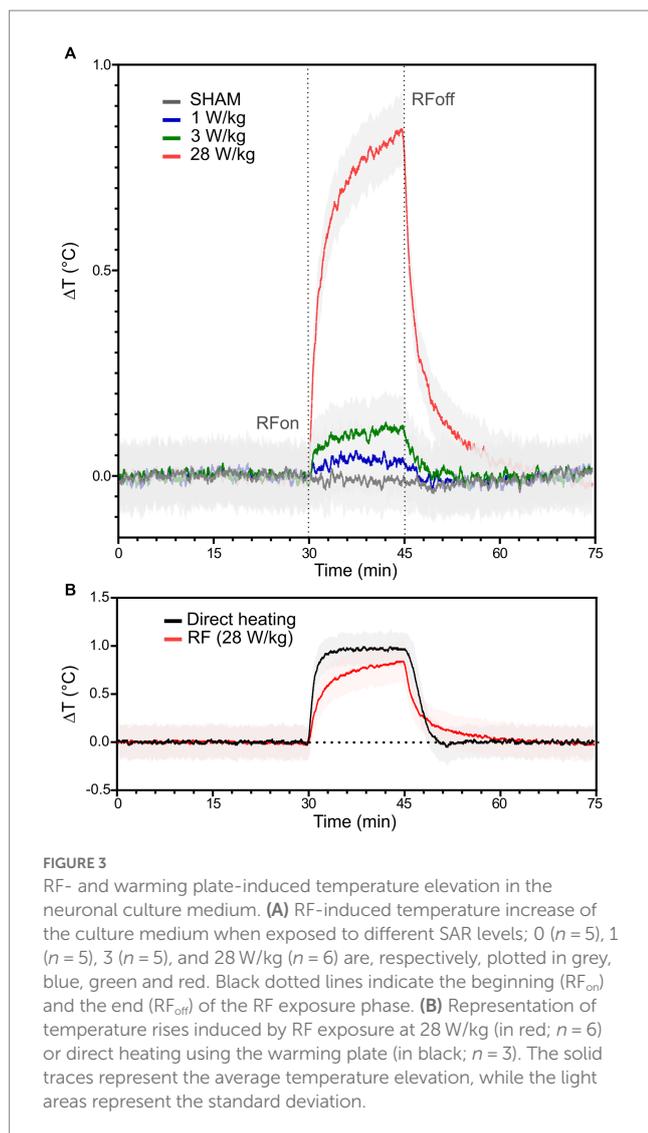
Figure 2A shows the SAR distribution at 3.5 GHz normalized to 1 W incident power along a vertical cut across the TEM cell and the

MEA. The SAR is locally homogeneous at the level of the neurons, which are at the bottom of the MEA. The local SAR value is averaged over 0.5 mm³ of the exposed culture medium, corresponding to the volume of the thermal probe, as depicted in Figure 2A. Simulated local and whole-volume SAR values for 1 W input power were 31.2 W/kg and 77.5 W/kg, respectively.

Figure 2B shows the measured temperature elevation of the culture medium when exposed to 1 W incident power. Experimental local SAR normalized to 1 W incident power was equal to 28 ± 4 W/kg, a value consistent with numerical simulations. Based on this value, input TEM cell power during exposure was adjusted to 15.5 dBm, 20.3 dBm, 30 dBm, for SAR levels of 1, 3, or 28 W/kg, respectively.

3.2. Thermal dosimetry at 3.5 GHz and direct heating

The temperature of the culture medium was measured along the 5 phases of the experimental protocol (Figure 1D). Figure 3A shows the RF-induced temperature elevation during the E phase when the culture medium was exposed to CW 3.5 GHz signal for 15 min. The initial slope of the RF-induced temperature rise (at $t = 30$ min) and the temperature achieved at the end of the exposure phase (at $t = 45$ min) are dependent on the SAR level. The average temperature increase was 0.06°C, 0.13°C, and 0.80°C at 1 W/kg, 3 W/kg, and 28 W/kg, respectively (Figure 3A). As expected, maximal temperature elevation was achieved under RF exposure with a SAR of 28 W/kg. In Figure 3B, we compare the temperature rise induced in the culture medium by CW exposure at 28 W/kg or by direct heating using the warming plate. We have performed 6 measurements of temperature elevation during RF exposure at 28 W/kg. At the end of the 15 min RF exposure, the average temperature rise was (0.8 ± 0.2) °C. For experiments with direct heating, we conducted 3 temperature measurements. At the end of the 15 min heating time, the average temperature rise was (1.0 ± 0.1) °C. We obtained curves with small differences in terms of temperature dynamic and amplitude, notably in rising and falling transient phases.



3.3. RF exposure of cells at 3.5 GHz

Neuronal cultures were exposed to a 3.5GHz-RF signal at increasing SAR levels of 1, 3, and 28 W/kg. For all exposure conditions, the electrophysiological recordings of the RF-exposed phase (E) were compared with the pre-exposure (S1, S2) and the post-exposure (P1, P2) recordings, according to the four metrics defined in “Choice of metrics and data analysis” section: MBR, MFR, MBD, and $M_{OB}FR$.

3.3.1. Exposure at SAR levels of 1 and 3 W/kg

We first analyzed the effect of 15 min RF exposure to 3.5 GHz CW and 5G-modulated signals at SAR of 1 and 3 W/kg. Figure 4 shows the box plots illustrating the four metrics evaluated in each exposure condition, including the sham exposure (SHAM). For the sham experiments, the chosen parameters are extremely stable between the different phases. For CW experiments, there were no significant differences between the non-exposed phases (S1, S2, P1, and P2) and the RF-exposed phase (E) for all metrics considered and whatever SAR used ($p > 0.05$). For 5G modulated experiments at 1 and 3 W/kg, the MBR and the MBD were not different between the 5 phases. However, when neuronal networks were exposed to 5G-modulated signals at 1 W/kg, the $M_{OB}FR$ increased significantly during the first

post-exposure phase (P1) compared to the first pre-exposure phase (S1). The MFR also increased slightly between the E and P2 phases in cell cultures exposed at 3 W/kg ($p < 0.05$).

3.3.2. Exposure at a SAR level of 28 W/kg

We next assessed how exposure to 3.5 GHz signals (CW and 5G) at a SAR value of 28 W/kg impacted the electrical activity of the neurons. While this SAR value is well above the guidelines, it corresponds to the level used in our previous exposure experiment at 1.8 GHz (10). Figure 5 shows representative examples of the recorded S2, E, and P1 phases and corresponding raster plots during exposure to 5G signals at 28 W/kg. These recordings revealed an apparent decrease in the electrical activity of neurons during the exposure phase (E) that progressively disappeared in the first minutes of the P1 phase.

The first two lines of Figure 6 illustrate the normalized parameters (MBR, MFR, MBD, and $M_{OB}FR$) for 16 CW- and 14 5G-exposed cultures at a SAR of 28 W/kg. In all experimental conditions, the four parameters were stable along the two pre-exposure phases (S1 and S2). When neuronal cultures were exposed to CW or 5G-modulated signals at 28 W/kg, both the MBR and the MFR were significantly reduced in the E phase in comparison to the S1 phase. These two parameters also appeared to be significantly different between the S2 and E phases except for the MBR in the CW-exposure condition for which we only observed a decreasing trend. Whatever the conditions, there were no statistically significant differences between the pre-exposure phases (S1, S2) and the post-exposure phases (P1, P2), indicating that the inhibition in bursting and firing rate during exposure was reversible. However, depending on the conditions and metrics considered, the exposure phase (E) was not systematically different from the post-exposure phases (P1, P2). For instance, in the CW-exposure condition, the MFR of the E-phase is not different from the MFR of the P1-phase.

To quantify the magnitude of the effect, the median values were compared between phases. For the CW exposure, the MBR decreased by 43.03% during the E-phase compared to the S1 phase ($p < 0.01$). The MFR also decreased by 39.11% and 40.01% in comparison to S1 ($p < 0.05$) and S2 phases ($p < 0.01$), respectively. For 5G-modulated signals, the MBR during the exposure was reduced by 37.42% and 35.54%, respectively, in comparison to S1 ($p < 0.0001$) and S2 ($p < 0.001$) phases. The MFR also decreased by 40.59% and 41.19% compared with S1 ($p < 0.001$) and S2 ($p < 0.001$) phases. In sharp contrast, the MBD and the $M_{OB}FR$ did not change significantly between phases, except for the MBD which was significantly different between E and P2-phases ($p < 0.05$) in CW experiments. Globally, even if these two parameters are not significantly different between phases, they tend to decrease in the E phase.

Specific inhibition of the neuronal activity was further analyzed by measuring the temporal variation of the MBR_{1min} , i.e., the MBR averaged over 1 min of recording along the whole experiment lasting 75 min and averaged over the total number of experiments, for each condition. While the MBR_{1min} tends to be relatively stable over time in the sham experiment (Figure 7A), an important decrease in the MBR_{1min} was observed at the beginning of the exposure to the 5G-modulated 3.5 GHz signal at 28 W/kg (Figure 7C). Indeed, the MBR_{1min} dramatically decreased by over half of the baseline level during the first minutes of exposure and then stabilized. For CW exposure, the MBR_{1min} also decreased over time until reaching almost 50% inhibition at the end of the 15 min exposure phase (Figure 7B).

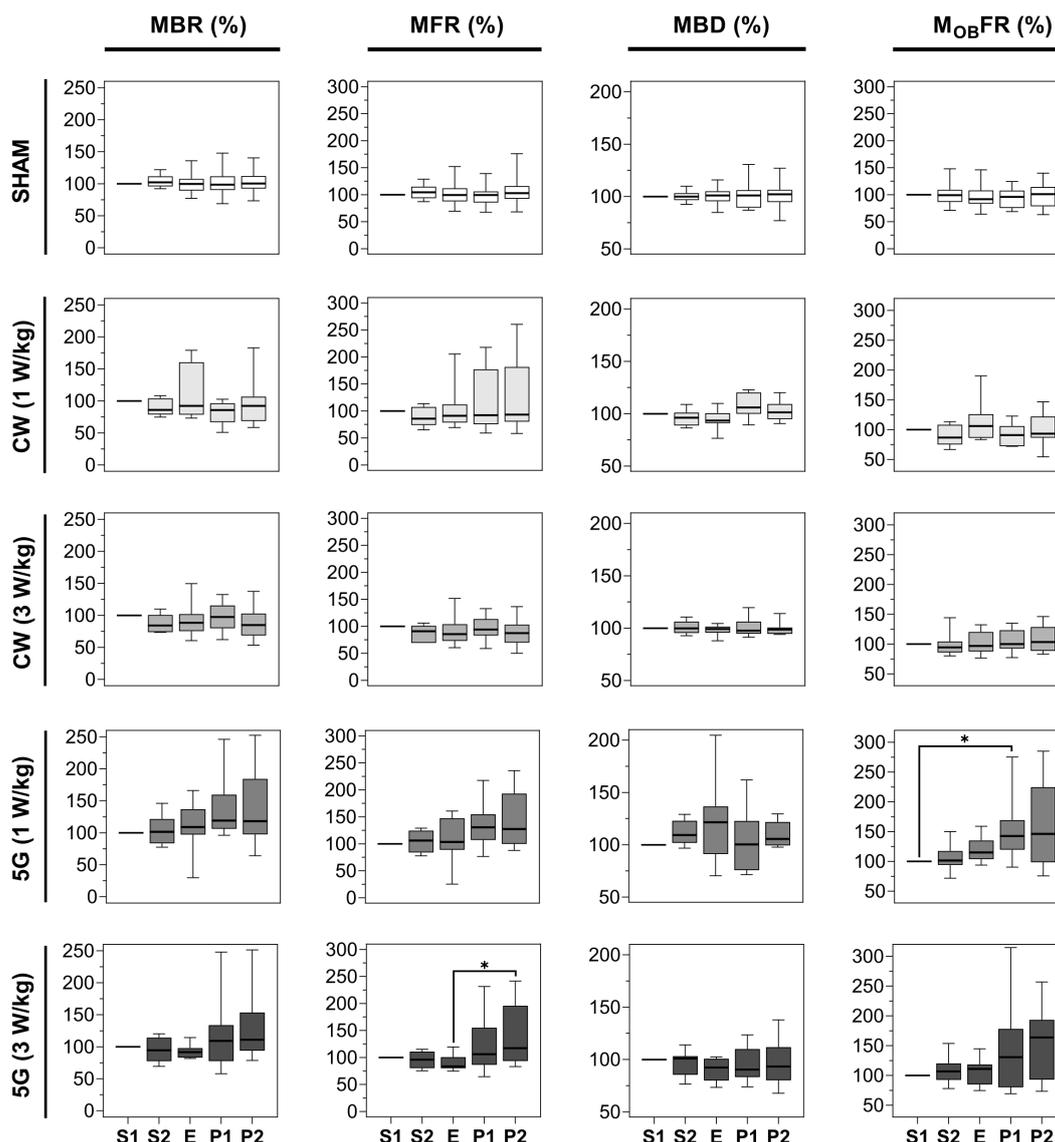


FIGURE 4
 Statistical analysis of the effects of 15 min RF exposure at 3.5 GHz CW and 5G-modulated signals at SAR of 1 and 3 W/kg on the electrical activity of cultured cortical networks. Box plots are representative of the mean bursting rate (MBR), the mean firing rate (MFR), the mean burst duration (MBD), and the mean firing outside bursts rate (M_{OBFR}) measured along the 5 phases (S1, S2, E, P1, P2) of the sham or RF-exposure protocols. Data are normalized considering the S1 phase as 100%. From top to bottom: sham-exposed cultures ($n = 19$); RF-exposed cultures to CW signals at a SAR of 1 W/kg ($n = 8$); RF-exposed cultures to CW signals at a SAR of 3 W/kg ($n = 9$); RF-exposed cultures to 5G signals at a SAR of 1 W/kg ($n = 8$); RF-exposed cultures to 5G signals at a SAR of 3 W/kg ($n = 9$). (* $p \leq 0.05$, Conover multiple comparison test).

As expected regarding the results of averaged metrics (Figure 6), the MBR_{1min} gradually returned to baseline after the RF signal was turned off.

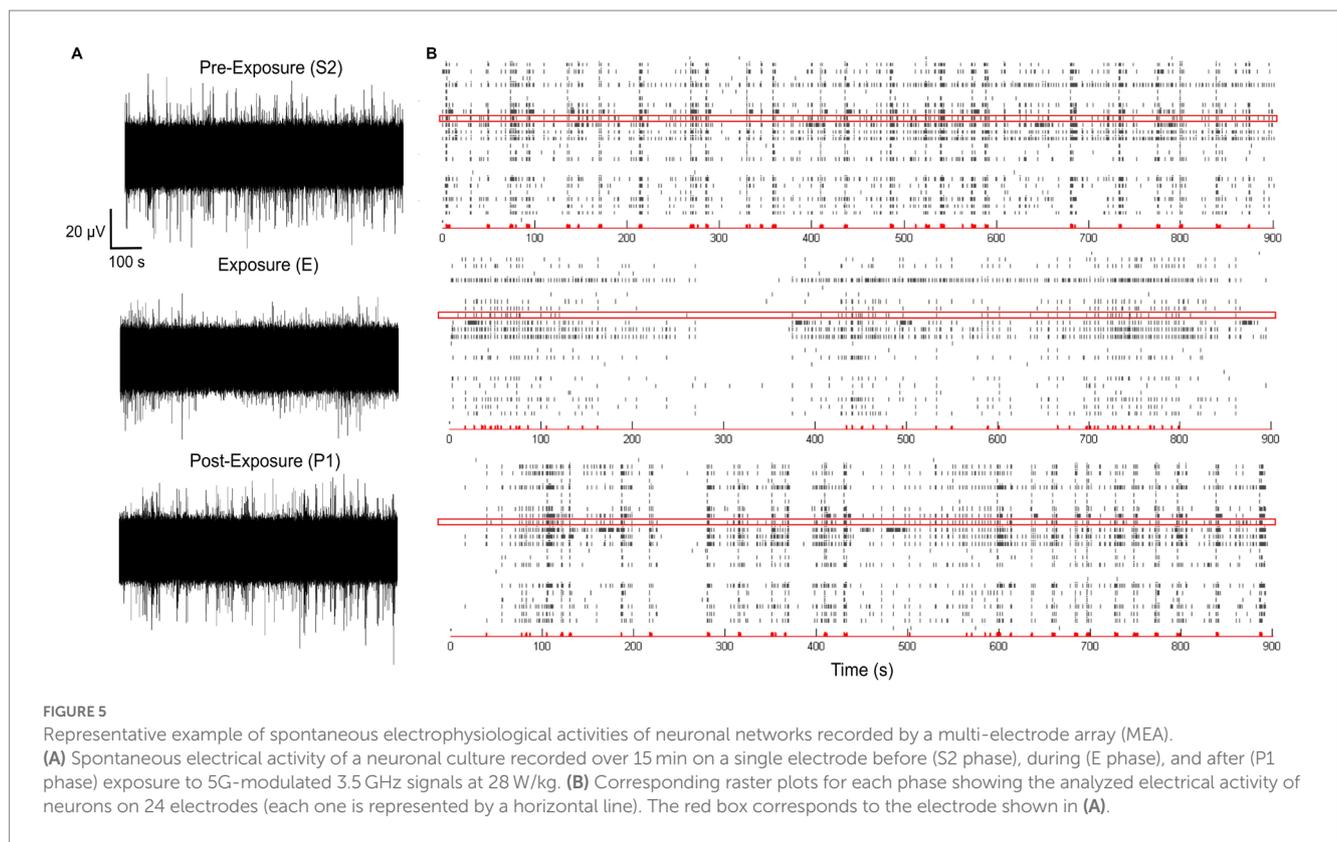
3.4. Thermal exposure of cells without RF

We finally assessed whether the moderate temperature increase ($<1^\circ\text{C}$) measured during RF exposure to 3.5 GHz signals at 28 W/kg could be responsible for the decrease in neuronal electrical activity. Thus, we exposed neuronal cultures to direct heating during the E phase, with the temperature profile shown in Figure 3B. Results on neuronal activity are illustrated in Figure 6. Interestingly, we observed

an effect, especially on the MBR and the MFR. While S1 and S2 phases were stable, the MBR and the MFR were significantly reduced in the heating phase (E) by 15.66 and 27.11% compared to the S1 phase, respectively. Moreover, the MFR for the P1 and P2 phases were significantly lower than in the S1 phase ($p < 0.05$), indicating that the spike inhibition was not reversible.

3.5. RF exposure of cells at 1.8 GHz and a SAR level of 28 W/kg

Whether RF exposure to 3.5 GHz signals induces comparable effects on the electrical activity of neurons to those observed at



1.8 GHz was then tested using our exposure system (see “RF exposure system” section and Figure 1).

Since we observed an effect of 3.5 GHz exposure at 28 W/kg, we assessed whether the carrier frequency was important in generating this inhibitory effect. Using the same setup, we exposed neuronal cultures to a 1.8 GHz CW RF signal at a SAR of 28 W/kg. As shown in Figure 8, comparing E and S1 phases, we obtained a significant decrease of 29.6% of the MBR and 42.93% of the MFR during exposure. We also studied the effect of such exposure on other parameters characterizing the electrical activity of neurons, such as the MBD and the $M_{OB}FR$, but we did not detect any exposure-related changes in these parameters.

4. Discussion

In the present study we assessed the effects of RF exposure at 3.5 GHz on the electrical activity of rat cortical neuronal networks *in vitro* at different SAR levels. Our results showed that exposure to 3.5 GHz CW and 5G-modulated signals for 15 min at SAR levels ranging from 1 to 3 W/kg do not cause major changes in firing and bursting activities. In sharp contrast, at high SAR level of 28 W/kg, 15 min exposures to both 3.5 GHz CW and 5G-modulated signals clearly inhibited the spontaneous activity of the neuronal networks. At this specific high SAR level, both mean spiking (MFR) and bursting (MBR) activities were decreased by ~40%, while the burst duration (MBD) and the number of spikes outside bursts ($M_{OB}FR$) remained stable throughout the entire experiment, suggesting an effect on burst generation. We should note that this inhibitory effect was reversible. Additionally, the RF signal modulation had no impact on the

magnitude of the effect, as inhibition was comparable in experiments with CW or 5G signals (Figure 6). When replicating the experiment with CW 1.8 GHz exposure, similar decreases of ~40% of the MFR and ~30% of the MBR were observed, while both the MBD and the $M_{OB}FR$ remained unchanged (Figure 8). These findings suggest that the carrier frequency does not influence the amplitude of the effect in the 1.8–3.5 GHz range. Furthermore, the present findings at 1.8 GHz are in agreement with our previous published work (10), which showed a comparable decrease of ~35% of the MBR under CW exposure at the same SAR level, while the culture medium was then continuously and slowly perfused. This indicates that the circulation of thermostated culture medium during the 75 min experiment is not necessary to induce this effect.

In summary, we found an inhibitory effect of RF exposure on neuronal networks *in vitro*. However, the threshold for this inhibitory effect exceeds the SAR limit recommended by ICNIRP for environmental exposure (1). Interestingly, our study also indicates a specific effect on bursts while the number of isolated spikes (outside bursts) remained stable. This prompted us to further investigate the underlying mechanisms responsible for burst generation in neuronal cultures.

4.1. Electrical activity of dissociated neuronal cultures

Cultures of dissociated neurons generally follow a relatively reproducible developmental pattern. After a few days of culture, spontaneous electrical activity appears as isolated and unsynchronized spikes. Starting on the second week of culture, there is a gradual

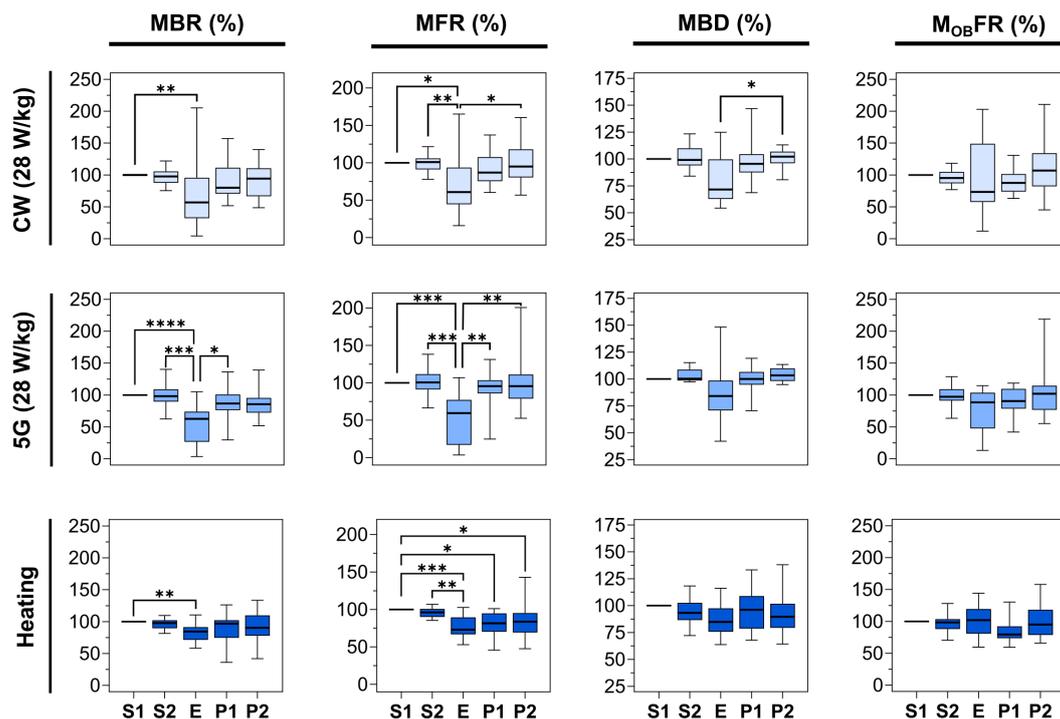


FIGURE 6

Statistical analysis of the effects of 15 min RF exposure at 3.5 GHz CW and 5G-modulated signals at a SAR of 28 W/kg and warming plate equivalent heating on the electrical activity of cultured neuronal networks. Box plots are representative of the mean bursting rate (MBR), the mean firing rate (MFR), the mean burst duration (MBD), and the mean firing outside bursts rate (M_{OBFR}) measured for the neuronal cultures exposed either to RF or direct heating, along the 5 phases (S1, S2, E, P1, P2). Data are normalized considering the S1 phase as 100%. From top to bottom: RF-exposed cultures to 3.5 GHz CW signal at a SAR of 28 W/kg ($n = 16$); RF-exposed cultures to 5G-modulated 3.5 GHz signal at a SAR of 28 W/kg ($n = 14$); cell cultures heated by thermal conduction (1°C rise) ($n = 13$) using a warming plate ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$, Conover multiple comparison test).

evolution towards bursts of activity occurring synchronously across multiple active sites. The synchronism of these bursts is progressively reinforced over time, while at the same time, the spiking activity tends to be completely abolished. This sequential pattern of electrical signals seems to be a common feature of dissociated cultures of neurons and is also found in different neuronal tissues (22–25). It has been shown that changes in this spontaneous electrical activity are correlated with topology and morphology changes in the network occurring during its development (26, 27). Moreover, these changes are also closely associated with homeostasis and long-term synaptic plasticity (28) and their origin results from different causes (29).

At the cellular level, it was shown that some cortical cells exhibit specific intrinsic properties, making them spontaneously generate rhythmic activity (30). These pacemaker properties are well known and related to the interaction of T-type calcium and I_h currents and may play a role in the network's spontaneous activity. Finally, the spontaneous firing of neuronal assemblies can also cause long excitatory post-synaptic potential (EPSP) mediated by NMDA receptors (29, 31) and modulated by AMPA receptors (32) initiating bursts.

At the network level, a local confluence of action potentials generation can trigger activity in the target neurons producing bursts (33). This transmission is mediated by chemical synapses, which are the major actors in the propagation of electrical activity. The strength of chemical synapses is modulated by pre- and post-synaptic activity. It is also under the control of a spontaneous form of

neurotransmission-termed miniature currents (34) and increased excitatory synaptic strength generally facilitates the propagation of bursts through the network.

As the bursting activity pattern results from several mechanisms related to the dynamics of excitatory and inhibitory synapses (26), its decrease under RF exposure suggests that RF alters the overall excitatory/inhibitory balance in the network.

4.2. Effects of EMF exposure on neuronal networks *in vitro*

Many *in-vitro* studies have also assessed whether RF exposure impact neuronal activity. For instance, an experiment combining an open TEM cell with 60-electrode MEAs (35) was carried out to assess the effects of pulsed TETRA RF signals on cortical neuronal networks (36). The carrier frequency was 395 MHz pulsed at 17.64 Hz (TETRA signal). The authors reported no significant difference in the bursting rate before and after a series of 15 min exposures at 1.17 and 2.21 W/kg. However, the experimental device was not set up to detect electrical activity during the exposure phase, which prevented them from detecting reversible alterations. Xu et al. (37) investigated the impact of chronic RF exposure on synaptic function of cultured hippocampal neurons of rats using the patch-clamp technique in association with immunohistochemistry. In that study, cell cultures were subjected to 15 min of daily exposure (DIV7–DIV14) to GSM

1.8 GHz RF signals at 2.4 W/kg. RF exposure selectively reduced the AMPA miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSCs) amplitude, whereas the frequency of AMPA mEPSCs as well as the

NMDA mEPSCs current amplitude remained unaffected. This group also noted that the number of (PSD95)-stained puncta significantly decreased in RF exposed neurons, suggesting a reduction in the number of excitatory synapses. More recently, another *in-vitro* investigation conducted by Echchgadda et al. (31) reported the impact of CW 3.0 GHz RF exposure on neuronal excitability in cultured primary hippocampal neurons. Whole-cell patch-clamp recordings were performed within 30 min after exposing the neurons at low SAR levels of ~0.3 W/kg, for 60 min. Results revealed a significant depolarization of the neuronal resting membrane potential after exposure, making neurons more excitable. This effect was also associated with decreased action potential (AP) amplitude. In addition, the exposure enhanced synaptic transmission leading to an increase in the amplitude of glutamate-dependent spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) and GABA-dependent spontaneous inhibitory post-synaptic currents (iPSCs).

The variability of outcomes among our study and those obtained by Xu et al. (37) and Echchgadda et al. (31) may be attributed to differences in the experimental approach such as neuronal subtypes, duration of exposure (short-term versus chronic), carrier frequency, SAR values and the possibility to assess the neuronal activity during RF exposure. However, all these studies point to a possible non-thermal effect of RF on the balance between excitatory and inhibitory synapses.

Additionally, several research reports described the impact of millimeter waves (MMW, 30–300 GHz) on neuronal cells. These studies present renewed interests in the context of the deployment of 5G technology, which is based in part of the use of the 26 GHz frequency band. One investigation conducted by Pikov et al. (38) assessed the impact of MMW 1 min exposures (60.125 GHz) on neuronal firing using cortical slices and patch-clamp experiments. In cells exposed for 1 min at power densities of 1 μW/cm², the firing rate of individual pyramidal neurons decreased in 4 of the 8 tested neurons. This effect was associated with the narrowing of the AP and the decrease in membrane resistance. The same research group also examined the effects of low-power 60 GHz MMW on individual neurons in the leech ganglia, a simpler biological model. In agreement with their previous study, they found that exposure to MMW tends to decrease the firing rate of neurons (39). Even if these studies were not performed in the same frequency range, the results are in line with those obtained in the present work.

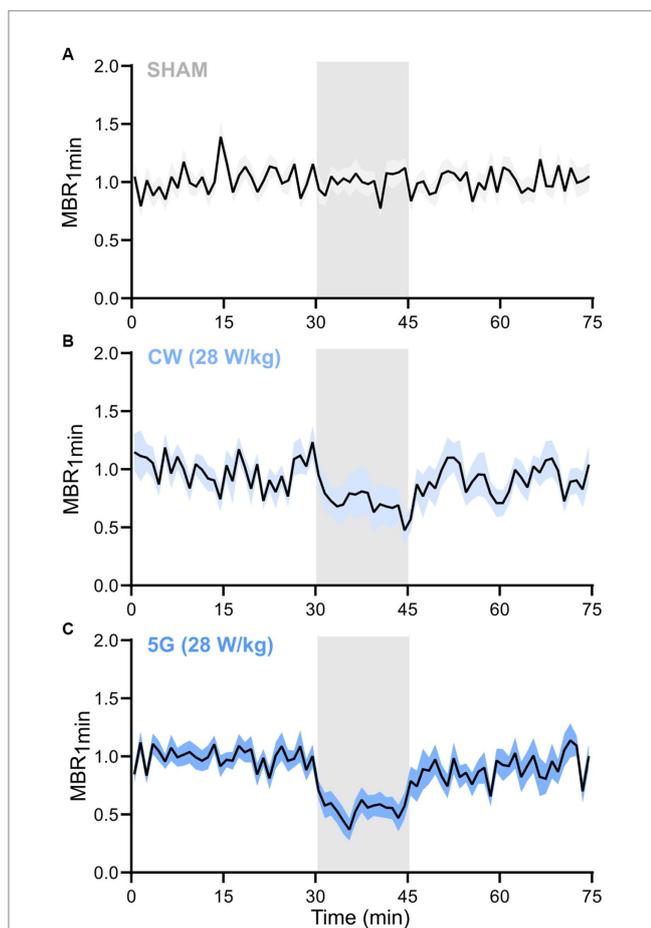


FIGURE 7
Temporal dynamic of the mean bursting rate along the RF exposure protocol to 3.5 GHz signals at 28 W/kg. Normalized temporal time course of the mean bursting rate averaged over 1 min (MBR_{1min}) along the 75 min of the experimental protocol for (A) SHAM ($n = 19$), (B) CW signals ($n = 16$), and (C) 5G signals ($n = 13$) groups of runs (data are shown as mean \pm SEM). The RF exposure phase is represented by a grey-shadowed area (RF_{on} at 30 min and RF_{off} at 45 min).

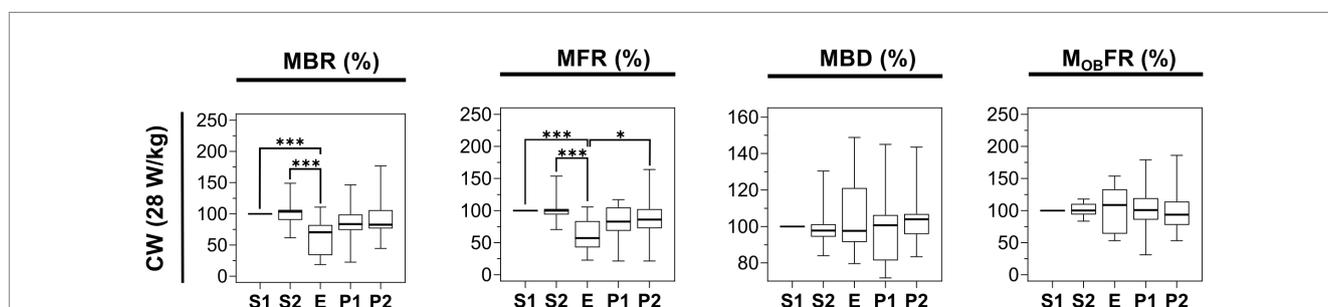


FIGURE 8
Statistical analysis of the effects of 15 min RF exposure with CW signal at 1.8 GHz at 28 W/kg on the electrical activity of cultured cortical networks. Box plots are representative of the mean bursting rate (MBR), the mean firing rate (MFR), the mean burst duration (MBD), and the mean firing outside bursts rate (M_{OBFR}) measured along the 5 phases (S1, S2, E, P1, P2) of the experimental protocol. Data are normalized considering the S1 phase as 100%. Cells were exposed to 1.8 GHz CW signals at a specific absorption rate (SAR) of 28 W/kg ($n = 15$) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, Conover multiple comparison test).

4.3. Influence of temperature

Knowing that 3.5 GHz RF exposures at 28 W/kg induced a local temperature elevation of $\sim 1^\circ\text{C}$, we decided to characterize the effect of direct heating on neuronal electrical activity. Interestingly, we found that thermal exposure also reduced the MFR and the MBR by approximately 27% and 15%, respectively, which is about half the decrease observed using RF exposure. Furthermore, in contrast to RF exposure at 28 W/kg, for the MFR alone, inhibition by direct heating was not immediately reversible in the 30 min post-exposure period (Figure 6). These results suggest that the RF-induced decrease of neuronal electrical activity observed at 28 W/kg cannot be entirely attributed to the concomitant temperature elevation.

Other research groups have also compared the effects induced by RF-EMF exposure and equivalent direct heating on neuronal activity. For instance, Romanenko et al. (39) performed experiments on individual neurons in the leech ganglia using microelectrode techniques. They found that low-level (1, 2, and 4 mW/cm^2) 60 GHz MMW exposure and gradual bath heating (from around 21–22°C up to 27°C) of ganglionic neurons produced nearly identical effects on the resting membrane potential and the AP amplitude. However, the firing rate was slightly suppressed during MMW exposure at all applied power densities but increased in a dose-dependent manner during gradual bath heating. We can note that the heating rate was 0.59°C/min during the MMW irradiation and 2.4°C/min during bath heating. More recently, the same group (40) investigated the effect of higher power MMW (60 GHz, >100 mW/cm^2) on primary sensory neurons from the medicinal leech. Such neurons are only activated when exposed to painful stimulus (pressure, chemical or osmotic agent, temperature changes). Authors demonstrated that electrophysiological responses of these sensory neurons differed between MMW exposure and direct heating. Indeed, bath heating of sensory neurons evoked spike trains with higher spiking rate when compared to MMW irradiation. However, the authors noted that the average temperature rise rate was different: 6.6°C/min for MMW and 12.6°C/min for direct conductive heating. In our study, we also had differences in the rates of temperature rise between RF exposure and direct heating (Figure 3). Indeed, the measured temperature rise rates for RF exposure and direct heating were equal to 0.09 and 0.38°C/min, respectively. In further studies, it will be interesting to perform experiments using different rates of temperature rise, while assessing corresponding changes in neuronal activity.

Independently of RF exposure, numerous studies have investigated the impact of temperature elevation on neuronal activity, both in terms of temperature increment and rate of change. For instance, Köllher et al. (36) found that raising the temperature from 37 to 37.5°C at 0.1°C/min increased spike and burst rates of cortical neurons *in vitro*. However, the results were not statistically significant. Our group has also demonstrated that increasing by 1°C the temperature of the culture medium led to an increase in the bursting activity of cortical neurons. These experiments were conducted by gradually elevating the temperature by approximately 0.16°C/min (8). More recently, Odawara et al. (41) investigated the effect of increasing the temperature from 37°C to 46°C on the spontaneous activity of hiPSC-derived sensory neurons. They used a heating rate of 1.4°C/min and observed that the firing frequency increased with the temperature, particularly above 40°C. In contrast, Newberry et al. (42) did not observe any temperature-dependent effect on the spiking rate when recording spontaneous

activity in dorsal root ganglia (DRG) rat neurons at 37°C and 42°C. Taken together, the findings of these studies suggest that an elevation in temperature generally led to an increase in the firing rate of neurons. However, these experiments were carried out under various experimental conditions with different temperature rise rates. Neurons might not be sensitive to the temperature elevation itself but rather to the time profile of the gradual temperature increase as supported by several studies. For instance, Bolshakov and Alekseev (43) showed that changes in the electrical activity of pacemaker neurons of the pond snail were dependent on the heating rate. Indeed, they noticed that a rapid temperature increase caused inhibition of the firing rate (due to fast activation of the sodium pump), whereas slow warming had the opposite effect by increasing the firing rate. Moreover, Alekseev et al. (44) found that MMW exposure produced biphasic changes in the firing frequency of neurons. Interestingly, this biphasic alteration was reproduced through the application of heat, provided that the magnitude and rate of temperature rise were comparable to those observed during MMW exposure. Overall, these findings highlight that we cannot exclude that the rate of temperature change could be of importance in defining the neuronal response to RF or thermal exposure.

4.4. Influence of the electrodes

Special care has been paid to the electromagnetic compatibility of our experimental bench which combines *in vitro* electrophysiology and RF exposure. The influence of electrodes at the bottom of the culture well and their possible interference with EMF has already been discussed in our previous studies (7, 8). Despite shielding, the maximal voltage that could remain on the electrodes (1 mV) was not likely to alter the electrophysiological activity of the neuronal network. Furthermore, in our more recent experiments (10) as well as in the present work, we used a new type of MEA that was custom designed to further improve the electromagnetic compatibility, mainly resizing the aperture for optical visualization and adding ground planes in the multi-layer PCB (9). However, it would still be useful to explore alternative methods to electrophysiology to characterize the spiking activity of neuronal networks *in vitro* under RF exposure.

4.5. Conclusion

In conclusion, we have given here experimental evidence that RF exposure of cultured cortical neurons at 3.5 GHz CW or 5G-modulated signals at 28 W/kg induces a decrease in total firing and bursting activities. The threshold for such inhibitory effect exceeds the maximal SAR recommended by ICNIRP for human exposure (1). Considering the studies mentioned above, we may hypothesize that the rate of the temperature rise plays an important role in eliciting specific cellular responses. Further studies are needed to elucidate the role of temperature rate and thus investigate the mechanism underlying these observations.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Bordeaux Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA-050).

Author contributions

NL, YP, PL, DA-C, and IL participated in research design. AC, FPdG, RO, and PL conducted experiments. AC, AG, NL, RO, PL, and YP performed data analysis. AC, NL, YP, RO, AG, FPdG, IL, PL, and DA-C wrote or contributed to the writing of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This research was funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES) under grant

References

1. ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to electromagnetic fields (100 kHz to 300 GHz). *Health Phys.* (2020) 118:483–524. doi: 10.1097/HP.0000000000001210
2. SCENIHR. *Potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF) Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR)* (2015). Available at: https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/scenihr_o_041_0.pdf
3. Vecchia P, Matthes R, Ziegelberger G, Lin J, Saunders R, Swerdlow A, et al. *Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz–300 GHz)* ICNIRP (2009) Available at: https://www.emf.ethz.ch/archive/var/ICNIRP_effekte_RFReview.pdf.
4. Sheppard AR, Swicord ML, Balzano Q. Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. *Health Phys.* (2008) 95:365–96. doi: 10.1097/01.HP.0000319903.20660.37
5. Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Talla L, et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol.* (2011) 12:624–6. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70147-4
6. Gultekin DH, Siegel PH. Absorption of 5G radiation in brain tissue as a function of frequency, power and time. *IEEE Access.* (2020) 8:115593–612. doi: 10.1109/ACCESS.2020.3002183
7. Moretti D, Garenne A, Haro E, Poulletier de Gannes F, Lagroye I, Lévêque P, et al. *In-vitro* exposure of neuronal networks to the GSM-1800 signal. *Bioelectromagnetics.* (2013) 34:571–8. doi: 10.1002/bem.21805
8. El Khoueiry C, Moretti D, Renom R, Camera F, Orlacchio R, Garenne A, et al. Decreased spontaneous electrical activity in neuronal networks exposed to radiofrequency 1800 MHz signals. *J Neurophysiol.* (2018) 120:2719–29. doi: 10.1152/jn.00589.2017
9. Nefzi A, Orlacchio R, Carr L, Lemerrier CE, Khoueiry CE, Lewis N, et al. Dosimetry of microelectrodes array chips for electrophysiological studies under simultaneous radio frequency exposures. *IEEE Trans Microw Theory Tech.* (2022) 70:1871–81. doi: 10.1109/TMTT.2021.3136296
10. Lemerrier CE, Garenne A, De GFP, Khoueiry CE, Arnaud-Cormos D, Lévêque P, et al. Comparative study between radiofrequency-induced and muscimol-induced inhibition of cultured networks of cortical neuron. *PLoS One.* (2022) 17:e0268605. doi: 10.1371/journal.pone.0268605
11. Bologna LL, Pasquale V, Garofalo M, Gandolfo M, Baljon PL, Maccione A, et al. Investigating neuronal activity by SPYCODE multi-channel data analyzer. *Neural Netw.* (2010) 23:685–97. doi: 10.1016/j.neunet.2010.05.002
12. Maccione A, Gandolfo M, Massobrio P, Novellino A, Martinoia S, Chiappalone M. A novel algorithm for precise identification of spikes in extracellularly recorded neuronal signals. *J Neurosci Methods.* (2009) 177:241–9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.09.026
13. Pasquale V, Martinoia S, Chiappalone M. A self-adapting approach for the detection of bursts and network bursts in neuronal cultures. *J Comput Neurosci.* (2010) 29:213–29. doi: 10.1007/s10827-009-0175-1
14. Soueid M, Kohler S, Carr L, Bardet SM, O'Connor RP, Leveque P, et al. Electromagnetic analysis of an aperture modified TEM cell including an ITO layer for real-time observation of biological cells exposed to microwaves. *Prog Electromagn Res.* (2014) 149:193–204. doi: 10.2528/PIER14053108
15. Hansen JW, Swartz EM, Cleveland JD, Asif SM, Brooks B, Braaten BD, et al. A systematic review of *in vitro* and *in vivo* radio frequency exposure methods. *IEEE Rev Biomed Eng.* (2020) 13:340–51. doi: 10.1109/RBME.2019.2912023
16. Orlacchio R, Andrieu G, Joushomme A, Patrignoni L, Hurtier A, de Gannes FP, et al. A novel reverberation chamber for *in vitro* bioelectromagnetic experiments at 3.5 GHz. *IEEE Trans Electromagn Compat.* (2023) 65:39–50. doi: 10.1109/TEMC.2022.3216045
17. Leveque P, Reineix A, Jecko B. Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas: application of FDTD method. *Electron Lett.* (1992) 28:539–41. doi: 10.1049/el:19920340
18. Chiappalone M, Novellino A, Vajda I, Vato A, Martinoia S, van Pelt J. Burst detection algorithms for the analysis of spatio-temporal patterns in cortical networks of neurons. *Neurocomputing.* (2005) 65–66:653–62. doi: 10.1016/j.neucom.2004.10.094
19. van Pelt J, Vajda I, Wolters PS, Corner MA, Ramakers GJA. Dynamics and plasticity in developing neuronal networks *in vitro* In: *Progress in brain research: Elsevier* (2005). 171–88. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612304470137>
20. R Core Team. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienne, Austria: R Foundation for Statistical Computing (2023) Available at: <https://www.R-project.org/>.
21. Pohlert T *PMCMRplus: calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums extended.* (2022). Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus>
22. Wagenaar DA, Pine J, Potter SM. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci.* (2006) 7:11. doi: 10.1186/1471-2202-7-11
23. Wagenaar DA. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J Neurosci.* (2005) 25:680–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4209-04.2005
24. Van Pelt J, Corner MA, Wolters PS, Rutten WLC, Ramakers GJA. Longterm stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays. *Neurosci Lett.* (2004) 361:86–9. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.062
25. Streit J, Tschertner A, Heuschkel MO, Renaud P. The generation of rhythmic activity in dissociated cultures of rat spinal cord: rhythmic activity in dissociated spinal cultures. *Eur J Neurosci.* (2001) 14:191–202. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01636.x
26. Habibe R, Striebel J, Schmieder F, Czarske J, Busskamp V. Long-term morphological and functional dynamics of human stem cell-derived neuronal networks on high-density micro-electrode arrays. *Front Neurosci.* (2022) 16:951964. doi: 10.3389/fnins.2022.951964
27. Yaghoubi M, de Graaf T, Orlandi JG, Giroto F, Colicos MA, Davidsen J. Neuronal avalanche dynamics indicates different universality classes in neuronal cultures. *Sci Rep.* (2018) 8:3417. doi: 10.1038/s41598-018-21730-1
28. Gerkin RC, Nauen DW, Xu F, Bi GQ. Homeostatic regulation of spontaneous and evoked synaptic transmission in two steps. *Mol Brain.* (2013) 6:38. doi: 10.1186/1756-6606-6-38
29. Mazzoni A, Broccard FD, Garcia-Perez E, Bonifazi P, Ruaro ME, Torre V. On the dynamics of the spontaneous activity in neuronal networks. *PLoS One.* (2007) 2:e439. doi: 10.1371/journal.pone.0000439

agreement EST-2019 RF-18 (The 5G-SAMU Project) and the New Aquitaine regional council under grant agreement AAPR2020A- 2019-8140010 (The PHYSTRIG project).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

30. Ramirez JM, Tryba AK, Peña F. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr Opin Neurobiol.* (2004) 14:665–74. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.011
31. Echchgadda I, Cantu JC, Tolstykh GP, Butterworth JW, Payne JA, Ibey BL. Changes in the excitability of primary hippocampal neurons following exposure to 3.0 GHz radiofrequency electromagnetic fields. *Sci Rep.* (2022) 12:3506. doi: 10.1038/s41598-022-06914-0
32. Sokolov RA, Mukhina IV. Spontaneous Ca²⁺ events are linked to the development of neuronal firing during maturation in mice primary hippocampal culture cells. *Arch Biochem Biophys.* (2022) 727:109330. doi: 10.1016/j.abb.2022.109330
33. Okujeni S, Egert U. Structural modularity tunes mesoscale criticality in biological neuronal networks. *J Neurosci.* (2023) 43:2515–26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1420-22.2023
34. Sutton MA, Ito HT, Cressy P, Kempf C, Woo JC, Schuman EM. Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cells.* (2006) 125:785–99. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.040
35. Oster S, Daus AW, Erbes C, Goldhammer M, Bochtler U, Thielemann C. Long-term electromagnetic exposure of developing neuronal networks: a flexible experimental setup: exposure of developing neuronal networks. *Bioelectromagnetics.* (2016) 37:264–78. doi: 10.1002/bem.21974
36. Köhler T, Wölfel M, Ciba M, Bochtler U, Thielemann C. Terrestrial trunked radio (TETRA) exposure of neuronal *in vitro* networks. *Environ Res.* (2018) 162:1–7. doi: 10.1016/j.envres.2017.12.007
37. Xu S, Ning W, Xu Z, Zhou S, Chiang H, Luo J. Chronic exposure to GSM 1800 MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* (2006) 398:253–7. doi: 10.1016/j.neulet.2006.01.004
38. Pikov V, Arakaki X, Harrington M, Fraser SE, Siegel PH. Modulation of neuronal activity and plasma membrane properties with low-power millimeter waves in organotypic cortical slices. *J Neural Eng.* (2010) 7:045003. doi: 10.1088/1741-2560/7/4/045003
39. Romanenko S, Siegel PH, Wagenaar DA, Pikov V. Effects of millimeter wave irradiation and equivalent thermal heating on the activity of individual neurons in the leech ganglion. *J Neurophysiol.* (2014) 112:2423–31. doi: 10.1152/jn.00357.2014
40. Romanenko S, Harvey AR, Hool L, Fan S, Wallace VP. Millimeter wave radiation activates leech nociceptors via TRPV1-like receptor sensitization. *Biophys J.* (2019) 116:2331–45. doi: 10.1016/j.bpj.2019.04.021
41. Odawara A, Shibata M, Ishibashi Y, Nagafuku N, Matsuda N, Suzuki I. *In vitro* pain assay using human iPSC-derived sensory neurons and microelectrode Array. *Toxicol Sci.* (2022) 188:131–41. doi: 10.1093/toxsci/kfac045
42. Newberry K, Wang S, Hoque N, Kiss L, Ahlijanian MK, Herrington J, et al. Development of a spontaneously active dorsal root ganglia assay using multiwell multielectrode arrays. *J Neurophysiol.* (2016) 115:3217–28. doi: 10.1152/jn.01122.2015
43. Bolshakov MA, Alekseev SI. Changes in the electrical activity of pacemaker neurons of the snail depending on the heating rate. *Biofizika.* (1986) 31:521–3.
44. Alekseev SI, Ziskin MC, Kochetkova NV, Bolshakov MA. Millimeter waves thermally alter the firing rate of the Lymnaea pacemaker neuron. *Bioelectromagnetics.* (1997) 18:89–98. doi: 10.1002/(SICI)1521-186X(1997)18:2<89::AID-BEM1>3.0.CO;2-0

2.2. Effet de la température sur l'activité électrique des neurones

2.2.1. Contexte de l'étude

Comme l'indique l'introduction générale de ma thèse, les seuls effets biologiques actuellement identifiés des RF émises par les équipements sans fil sont liés à l'échauffement des tissus vivants. Dans le cadre des expériences en laboratoire, il est nécessaire de caractériser avec précision l'élévation de la température induite par l'exposition aux RF. Si des effets biologiques sont observés pendant cette exposition, ils pourraient être liés à l'élévation de la température plutôt qu'aux RF elles-mêmes.

Dans le cadre de nos expériences d'exposition aux RF (voir partie 2.1. de la thèse), nous observons une inhibition de l'activité électrique des cultures de neurones lorsque ces dernières sont exposées à 28 W/kg, que ce soit avec des signaux non-modulés (CW) ou modulés (5G). Ces expositions s'accompagnent d'une élévation de la température d'environ 1°C. Pour déterminer avec précision le rôle de cette augmentation de la température sur la réponse neuronale, des cultures de neurones ont été soumises à un changement de température comparable à celui induit par l'exposition à 28 W/kg. Les résultats obtenus montrent qu'un saut de température de 1°C ne suffit pas à reproduire avec exactitude l'amplitude de l'inhibition observée lors de l'exposition aux RF à 28 W/kg. Ceci suggérerait que les effets observés ne seraient pas uniquement thermiques, mais pourraient également impliquer une composante non-thermique. Cependant, il existe une différence notable entre les deux expériences comparées dans l'article qui réside dans la dynamique du changement en température, notamment pendant la phase ascendante de la courbe. C'est pourquoi nous émettons l'hypothèse, en nous appuyant également sur les données d'autres publications (Alekseev et al., 1997; Bolshakov and Alekseev, 1986), que la vitesse de montée en température pourrait jouer un rôle dans la réponse neuronale. Pour étudier cette question, nous avons fait quelques expériences supplémentaires qui sont présentées dans cette section.

2.2.2. Matériels et méthodes

Dans le cadre de notre étude sur l'influence de la température sur l'activité électrique des neurones, nous avons mis en place un protocole très similaire à celui décrit dans l'article pour l'exposition aux RF (voir partie 2.1.2 de la thèse).

2.2.2.1. Culture de neurones et système de chauffage des cellules par conduction

Toujours selon le même protocole, des neurones corticaux primaires de rat ont été déposés sur des MEAs et maintenus dans un incubateur humide (37°C et 5% CO₂) jusqu'au développement de réseaux de neurones matures. À partir de DIV17, des enregistrements de l'activité électrique des neurones ont été effectués dans un incubateur non-humide (37°C, 5% CO₂) afin d'éviter d'endommager l'électronique

du système d'enregistrement. Pendant les enregistrements, les cultures de neurones ont été exposées à une élévation de la température par chauffage direct à l'aide d'une **plaque chauffante** (Figure 24). La température de la plaque chauffante pouvait facilement être régulée grâce à l'utilisation d'un contrôleur spécifique (TC01, Multi Channel Systems). La température réelle au sein de la MEA était contrôlée et mesurée à l'aide d'une sonde de température à fibre optique (Luxtron One, Lumasense Technologies, CA, United States) positionnée au fond de la chambre de culture, à l'emplacement des neurones (Figure 24). Pour étudier l'effet de la vitesse d'augmentation de la température sur l'activité neuronale, des cultures de neurones ont été soumises à deux cinétiques d'augmentation de température différentes, chacune se traduisant par un saut de 1°C de la température (voir description des cinétiques partie 2.2.2.4 de la thèse). De plus, pour évaluer l'effet de l'amplitude de la montée en température, des cultures de neurones ont également été exposées à une élévation d'environ 2°C de la température.

Comme l'indique la Figure 24, notre configuration expérimentale exigeait que la plaque chauffante soit positionnée en dessous de la MEA, ce qui nécessitait le placement du préamplificateur au-dessus de celle-ci. Par conséquent, nous avons dû opter pour des MEAs dites « standards » (60MEA200/30iR-Ti, MCS), légèrement différentes de celles utilisées précédemment pour l'exposition aux radiofréquences, la principale différence résidant dans le positionnement des plots de connexion, qui sur les MEAs « standards », sont placés sur la **face supérieure** du PCB (Figure 24 et Tableau 7). Ce positionnement des plots de connexion était essentiel pour permettre la connexion des MEAs avec le préamplificateur dans le cadre de nos expériences. En dépit de quelques différences mineures, les MEAs « standards » restent extrêmement similaires à celles utilisées pour l'exposition aux radiofréquences, et leurs caractéristiques respectives sont récapitulées dans le Tableau 7.

	60MEA200/30iR-Ti-Upside Down (MCS)	60MEA200/30iR-Ti (MCS)
		
Matériaux de base	Verre et PCB	Verre
Matériaux des pistes de connexion	Nitru de titane (TiN)	Nitru de titane (TiN)
Matériaux des plots de connexion	Or (Au)	Nitru de titane (TiN)
Position des plots de connexion	Sur la face inférieure	Sur la face supérieure
Diamètre des électrodes	30 μm	30 μm
Distance entre les électrodes	200 μm	200 μm
Matériaux des électrodes	Nitru de titane (TiN)	Nitru de titane (TiN)
Matériaux pour l'isolation	Nitru de silicium (SiN)	Nitru de silicium (SiN)
Grille d'agencement des électrodes	(presque) 8 x 8	(presque) 8 x 8
Nombre d'électrodes d'enregistrement	59	59
Nombre d'électrodes de référence	1	1

Tableau 7- Comparaison des différents paramètres caractérisant les deux types de MEAs utilisées dans le cadre de ma thèse. Dans la colonne de gauche, les MEAs utilisées pour les expériences d'exposition aux radiofréquences. Dans la colonne de droite, les MEAs utilisées pour les expériences de chauffage direct des neurones par conduction.

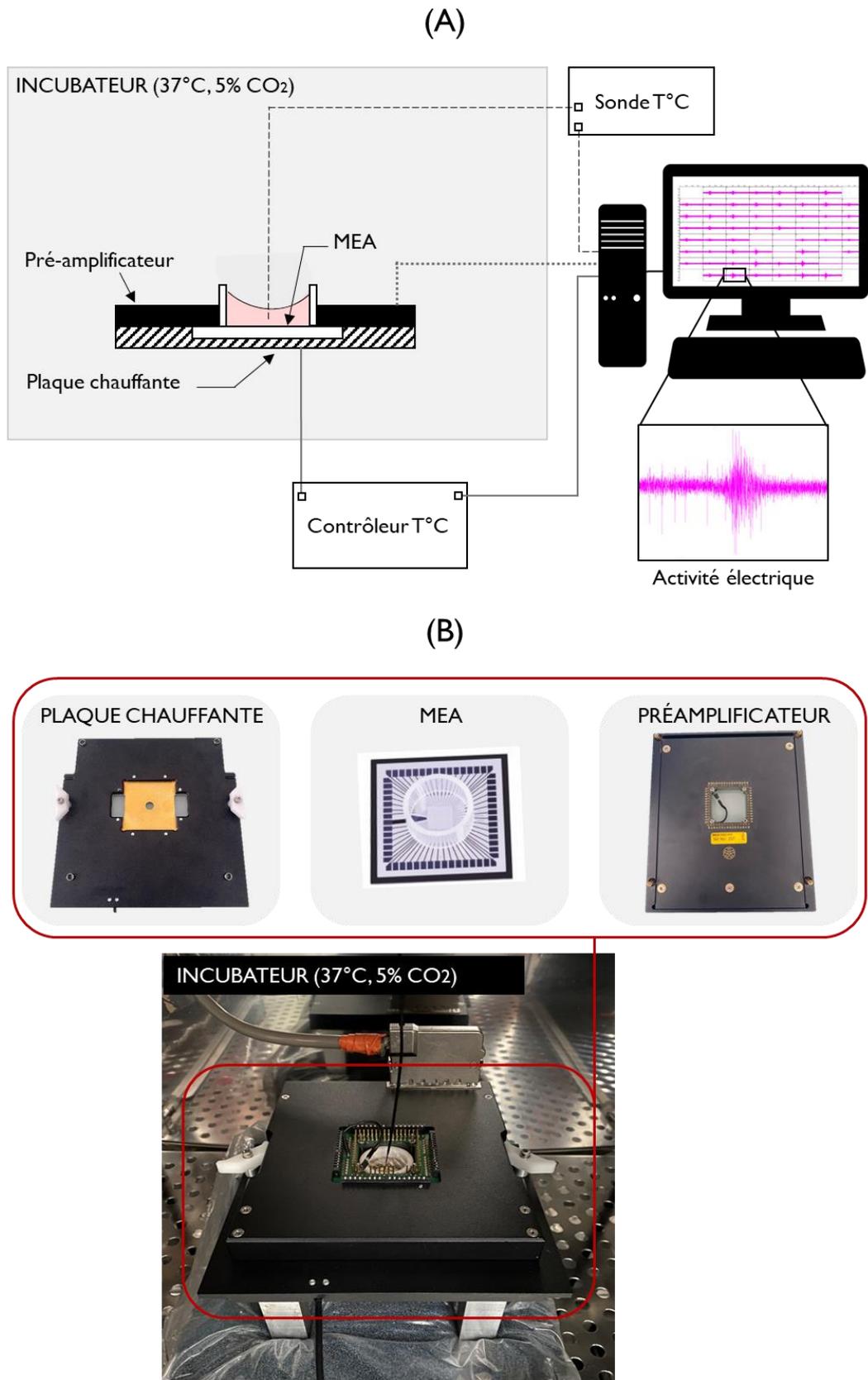


Figure 24 - (A) Représentation schématique et (B) photographies de la configuration expérimentale utilisée pour le chauffage direct des cultures de neurones primaires par conduction.

2.2.2.2. Protocole d'enregistrement

Comme l'indique la [Figure 25](#), le protocole d'enregistrement mis en œuvre pour étudier l'effet de la température sur l'activité neuronale est identique à celui que nous utilisons pour les expositions aux radiofréquences. Ce protocole se compose de 5 phases distinctes, chacune d'une durée de 15 minutes. Les deux premières phases sont dédiées à l'enregistrement de l'activité basale des neurones (S1 et S2). Ensuite, une phase d'enregistrement est réalisée pendant le chauffage des neurones par conduction (E). Enfin, les deux dernières phases permettent d'enregistrer l'activité électrique des neurones post-chauffage (P1 et P2).

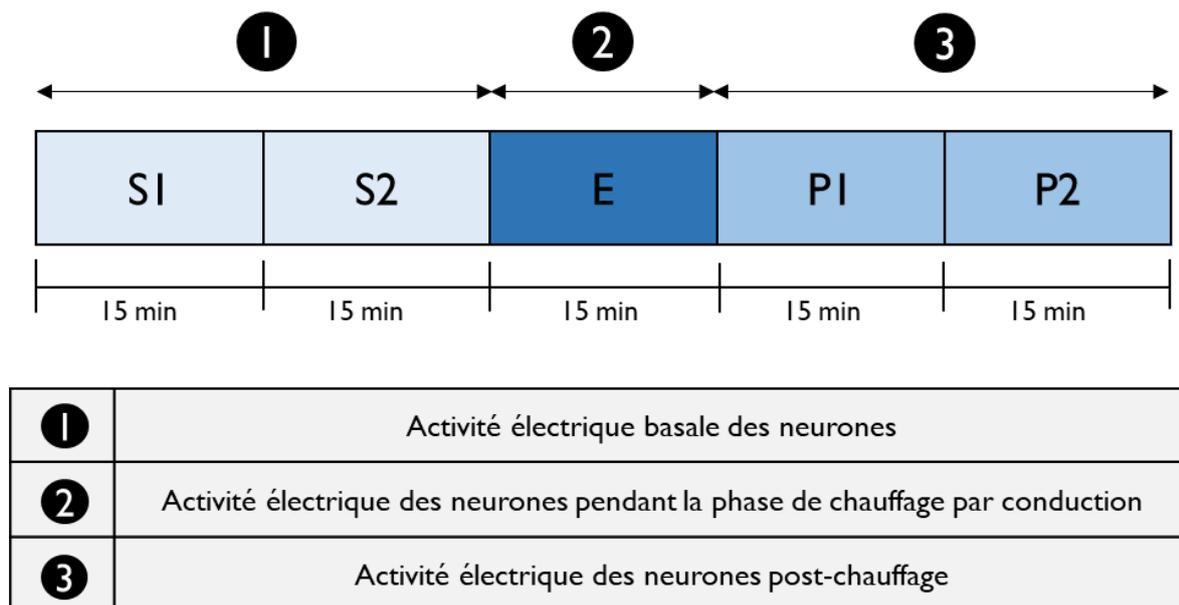


Figure 25 - Protocole d'enregistrement pour l'étude de l'effet de la température sur l'activité électrique des neurones.

2.2.2.3. Acquisition, traitement et analyses des données

L'acquisition, le traitement et l'analyse des données recueillies au cours de nos expériences sont réalisés exactement de la même manière que celle décrite dans l'article.

En résumé, l'activité électrique des neurones est enregistrée à une fréquence d'échantillonnage de 10 KHz par électrode et visualisée à l'aide du logiciel MC_Rack. Ce logiciel permet la visualisation simultanée de l'activité électrique enregistrée sur chacune des 60 électrodes ([Figure 26](#)). L'activité électrique des cultures de neurones recueillie sur chacune des phases d'enregistrement est ensuite analysée grâce au logiciel SPYCODE, développé sous MATLAB. Ce logiciel dispose d'une interface graphique facile d'utilisation, offrant la possibilité aux utilisateurs non expérimentés en MATLAB d'effectuer des traitements de données sans connaître les détails du code source. Avec ce logiciel nous

pouvons effectuer toutes les opérations nécessaires à l'analyse des signaux collectés : conversion des fichiers, filtrage, calcul des différentes métriques, représentation graphique des données etc. Dans le cadre de nos expériences, nous nous sommes principalement intéressés à quatre métriques caractérisant l'activité en spikes et en bursts des neurones : le Mean Firing Rate (MFR), le Mean Bursting Rate (MBR), le Mean Burst Duration (MBD) et le Mean Outside Burst Firing Rate (M_{OBFR}). La définition de ces métriques, ainsi que les méthodes de calcul qui leur sont associées, ont été décrites dans l'article.

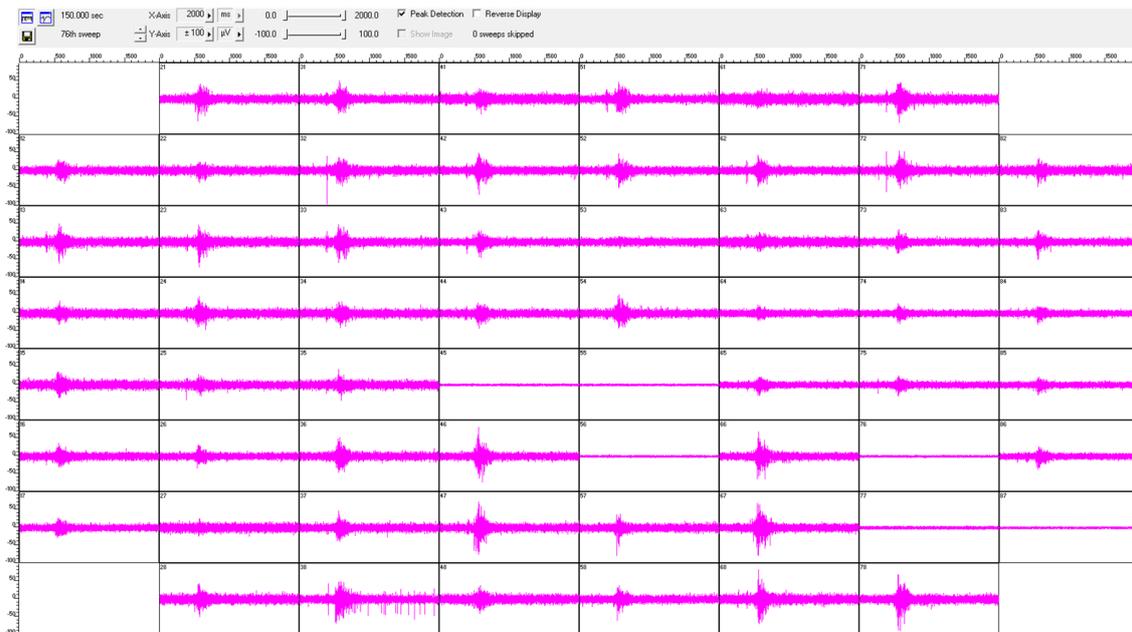


Figure 26 - Capture d'écran d'une session d'enregistrement avec le logiciel MC_Rack, révélant à la fois la présence de bursts et de spikes isolés.

Initialement, pour l'analyse statistique des données, nous avons l'intention d'effectuer une ANOVA. Cependant, la taille des échantillons était relativement restreinte et l'hypothèse d'homoscédasticité (i.e. homogénéité des variances) n'était généralement pas vérifiée. Par conséquent, nous nous sommes tournés vers une approche non paramétrique en utilisant le test de Kruskal-Wallis, puis les tests post-hoc de Conover. Toutes les analyses ont été effectuées via le logiciel R et la bibliothèque PMCMRplus en fixant le seuil de significativité alpha à 5%.

2.2.2.4. Réglage des profils de température

Pour ajuster les profils de température auxquels les neurones devaient être exposés, des mesures de température ont été effectuées au sein de MEAs ne contenant que du milieu de culture (sans cellules). Ces mesures ont été réalisées au cours des 5 phases du protocole d'enregistrement, la phase correspondant au chauffage des neurones par la plaque chauffante se situant entre $t = 30$ et $t = 45$ minutes (phase E). Les paramètres de la plaque chauffante ont été ajustés afin d'obtenir différentes cinétiques

d'augmentation de la température, chacune correspondant à un saut de 1°C de la température (Figure 27 et Figure 28). Dans une dernière condition expérimentale, les paramètres de la plaque chauffante ont été adaptés pour provoquer un saut plus important de la température (+ 2°C) (Figure 30). Pour ces trois conditions expérimentales, la température de la plaque chauffante était maintenue à 37°C pendant les 30 premières minutes de l'expérience, correspondant aux phases S1 et S2 du protocole d'enregistrement. De plus, à la fin de la période de chauffage des neurones (phase E), la plaque chauffante était systématiquement éteinte.

La Figure 27B illustre les paramètres de la plaque chauffante utilisés pour l'obtention de la condition « cinétique lente ». Dans cette condition, la température de la plaque chauffante était ajustée pour augmenter de 0,2°C par minute au cours des 5 premières minutes de la phase de chauffage. Cela permettait d'atteindre progressivement la température cible de 38°C, correspondant à une élévation maximale de 1°C de la température. La Figure 27A montre la variation de température (ΔT) réellement mesurée au fond du puits de culture. À la fin des 15 minutes de chauffage (à $t = 45$ minutes), l'augmentation moyenne de la température était de $0,9 \pm 0,15$ °C. Dans cette condition, la cinétique d'élévation de la température était d'environ **0,16°C/min**. Nous qualifierons cette cinétique de « lente ».

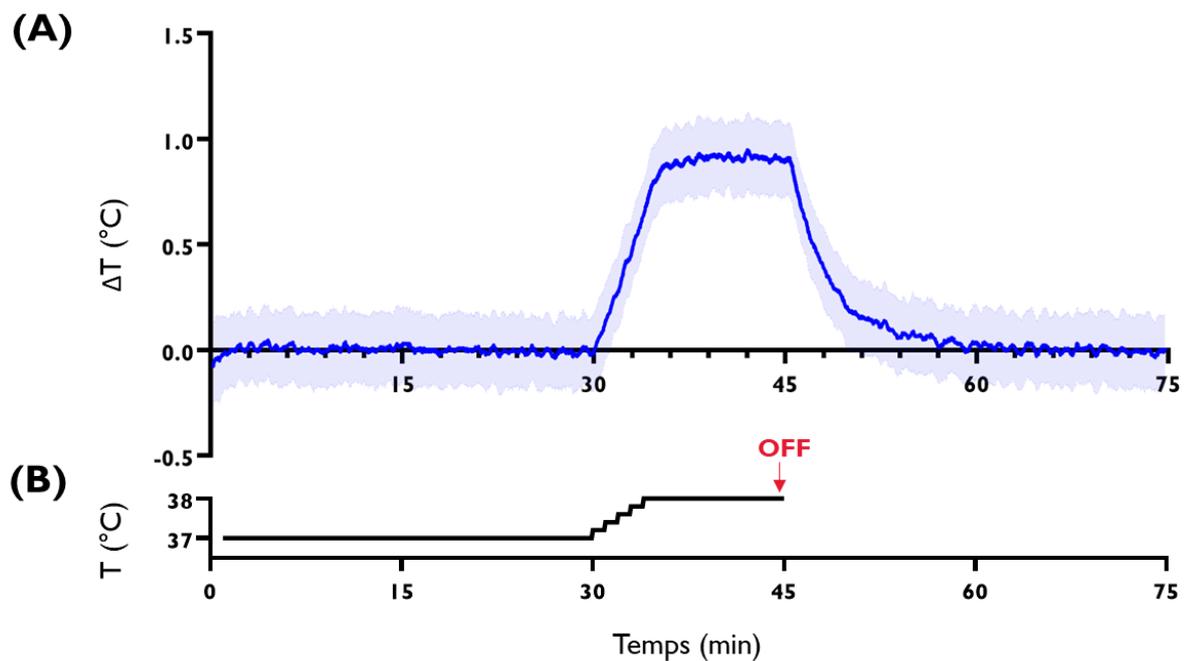


Figure 27 - (A) Variation de la température (ΔT) réelle mesurée au fond du puits de culture pendant le chauffage avec une cinétique « lente » de montée en température ($n = 3$). Le trait plein représente l'élévation moyenne de la température tandis que la zone claire représente l'écart-type. (B) Réglage de la plaque chauffante lors des expériences visant à mimer une élévation « lente » de la température.

La Figure 28B, quant à elle, présente les réglages de la plaque chauffante qui ont été utilisés pour obtenir la condition « **cinétique rapide** », déjà présentée dans le cadre de l'article. Dans ce cas, la plaque chauffante était réglée pour augmenter rapidement (en quelques millisecondes) sa température de 1°C. La variation de température (ΔT) réellement mesurée dans le milieu de culture des neurones est illustrée en Figure 28A. L'augmentation moyenne de température à la fin des 15 minutes de chauffage était de $1,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ et la cinétique d'élévation de température était d'environ **0,38 °C/min**. Nous qualifierons cette cinétique de « rapide ».

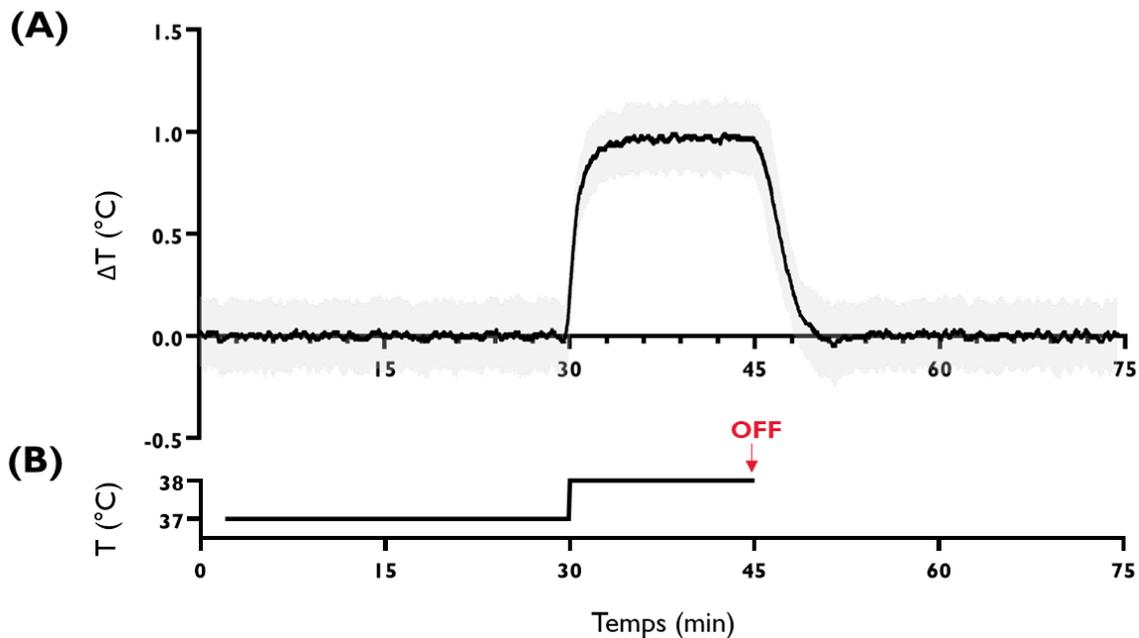


Figure 28 - (A) Variation de la température (ΔT) réelle mesurée au fond du puits de culture pendant le chauffage avec une cinétique « rapide » de montée en température (n = 3). Le trait plein représente l'élévation moyenne de la température tandis que la zone claire représente l'écart-type. (B) Réglage de la plaque chauffante lors des expériences visant à mimer une élévation « rapide » de la température.

Une superposition des courbes obtenues avec les cinétiques « rapide » et « lente » est illustrée en Figure 29, mettant en évidence les différences entre ces deux cinétiques. Dans la condition « cinétique lente », on observe en moyenne une augmentation légèrement moins importante de la température par rapport à la condition « cinétique rapide ». Cependant, les différences les plus marquées entre les deux conditions se manifestent, de manière prévisible, lors de la phase ascendante de la courbe, mais également lors de la phase descendante, lorsque l'interruption du chauffage par la plaque chauffante permet au milieu de culture de revenir à un équilibre thermique qui dépend uniquement de l'incubateur (37°C).

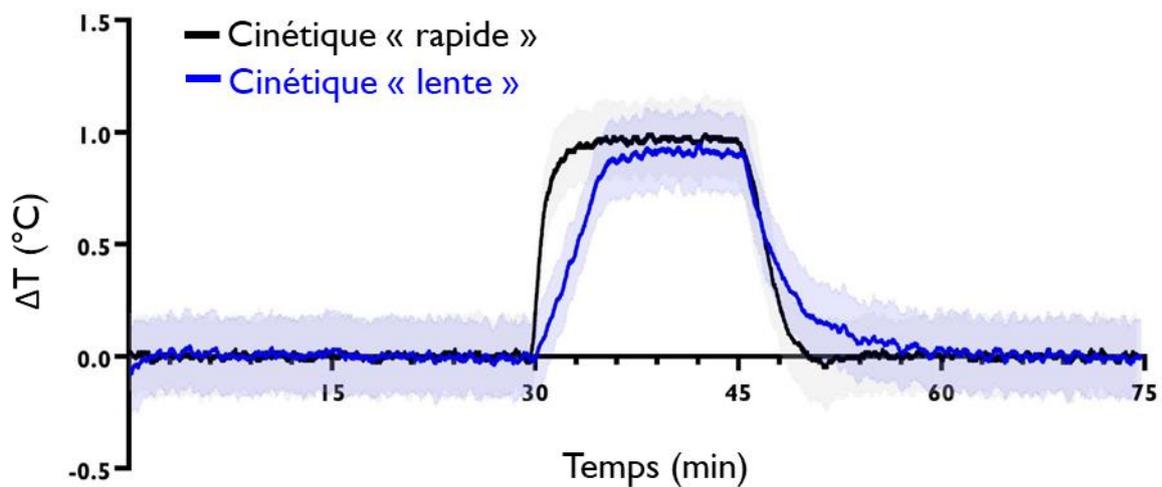


Figure 29 - Superposition des courbes correspondant aux conditions « cinétique lente » et « cinétique rapide » d'élévation de la température.

La Figure 30B présente les réglages de la plaque chauffante utilisés pour étudier l'impact d'un saut de température de 2°C sur l'activité neuronale. La plaque chauffante était paramétrée pour augmenter sa température de 2°C en quelques millisecondes. La variation de température (ΔT) réellement enregistrée au fond du puits de culture est représentée sur la Figure 30A. À la fin des 15 minutes de chauffage (à $t = 45$ min), on observe une élévation moyenne de la température d'environ $1,8 \pm 0,2$ °C. La vitesse de montée en température était de **0,5 °C/min**. Nous qualifierons cette cinétique de « très rapide » par rapport aux autres conditions.

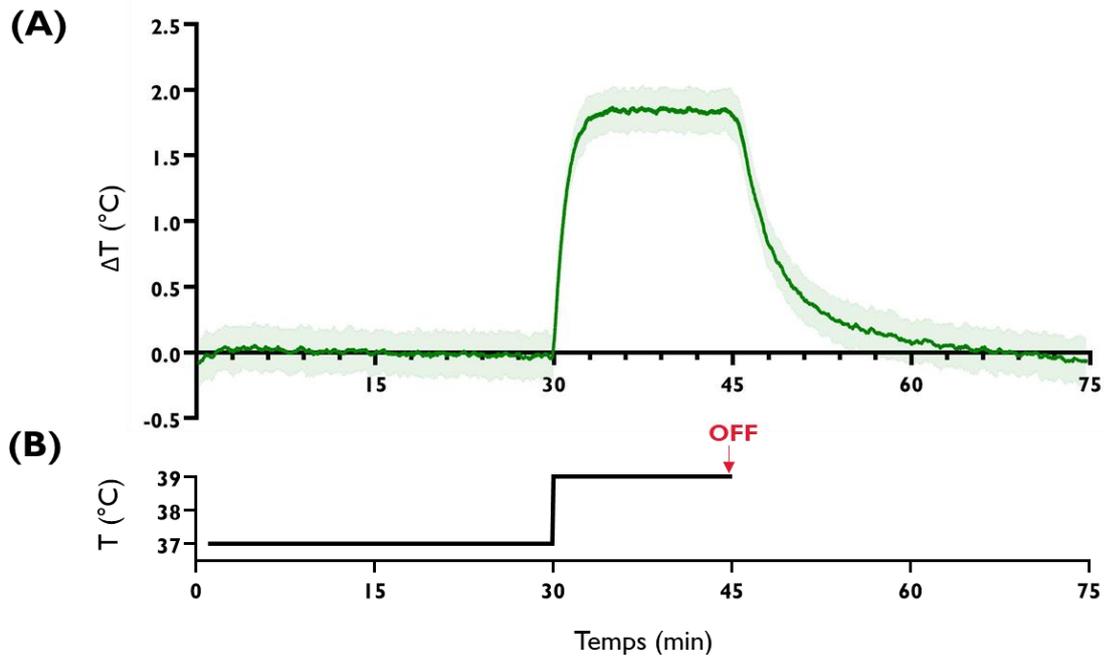


Figure 30 - Variation de la température (ΔT) réelle mesurée au fond du puits de culture pendant le processus de chauffage visant à induire une augmentation de 2°C de la température ($n = 3$). Le trait plein représente l'élévation moyenne de la température tandis que la zone claire représente l'écart-type. (B) Réglage de la plaque chauffante lors des expériences visant à étudier les effets d'un saut de température de 2°C sur l'activité électrique des neurones en culture.

2.2.3. Résultats

Les boîtes à moustaches (Figure 31) montrent les variations des différents paramètres caractérisant l'activité électrique des neurones (MBR, MFR, MBD, M_{OBFR}) au cours des 5 phases du protocole d'enregistrement (S1, S2, E, P1, P2). Pour chacune des conditions expérimentales, tous les paramètres analysés restent constants pendant les deux premières phases des enregistrements (S1 et S2), illustrant ainsi la stabilité de l'activité électrique des neurones.

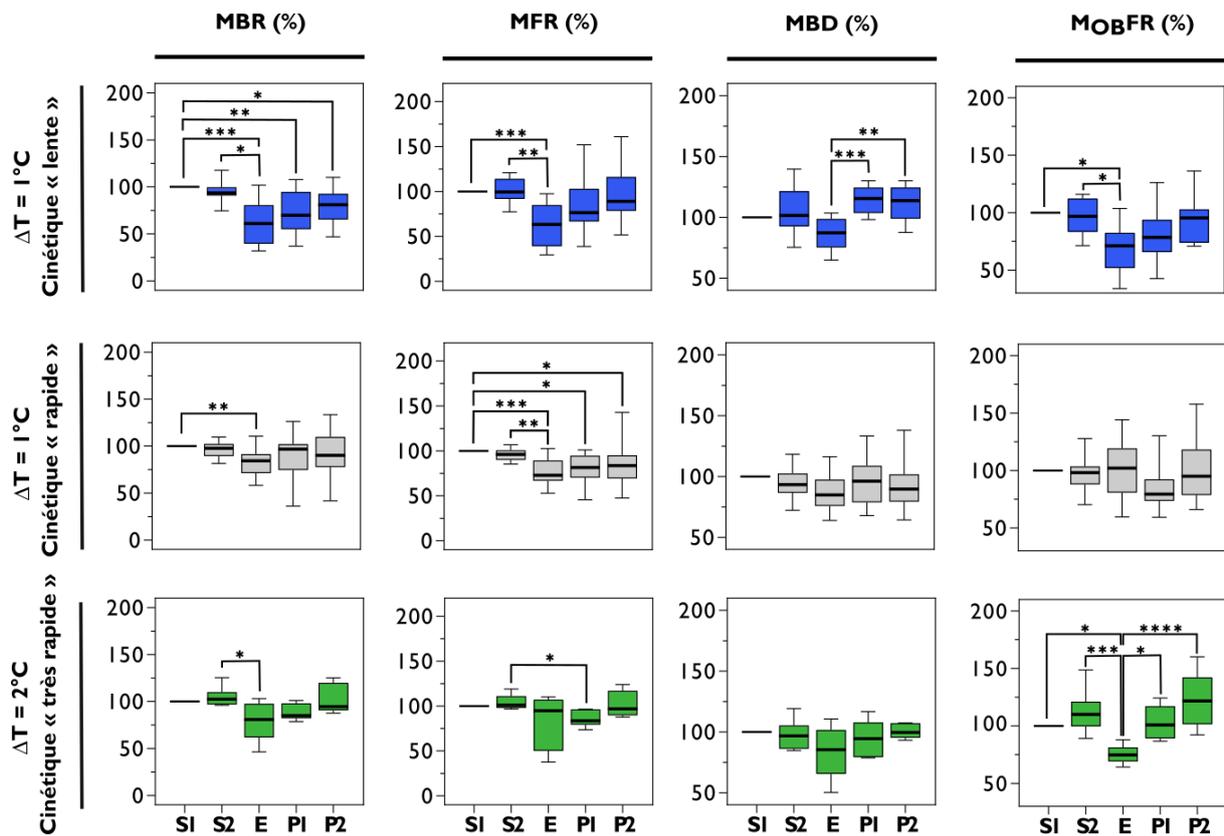


Figure 31 - Analyses statistiques des effets d'une augmentation de température de 15 minutes sur l'activité électrique de neurones en culture. Les boîtes à moustaches représentent le MBR, le MFR, le MBD et le MObFR mesurés sur les 5 phases du protocole d'enregistrement (S1, S2, E, P1, P2). Les données sont normalisées en prenant S1 comme référence à 100 %. De haut en bas : cultures soumises à une augmentation de 1°C de la température avec une cinétique « lente » (n = 9) ; cultures soumises à une augmentation de 1°C de la température avec une cinétique « rapide » (n = 13) ; cultures soumises à une augmentation de 2°C de la température avec une cinétique « très rapide » (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001, test de comparaison multiple de Conover).

2.2.3.1. Effet de la vitesse de montée en température sur l'activité neuronale

Cinétique « lente » d'élévation de la température

La première ligne de la [Figure 31](#) présente les paramètres normalisés (MBR, MFR, MBD, MObFR) des cultures chauffées de 1°C en suivant une **cinétique « lente »** d'élévation de la température. Pendant la phase de chauffage des neurones (E), on observe une réduction significative du MBR, du MFR et du MObFR par rapport aux phases S1 et S2 qui reflètent l'activité électrique basale des neurones. Une tendance à la diminution du MBD est également observée pendant le chauffage des neurones, mais celle-ci n'est pas statistiquement significative. De plus, les valeurs du MBR des phases P1 et P2 sont significativement plus faibles qu'en phase S1, suggérant que l'inhibition des bursts n'est pas totalement réversible à la fin de l'enregistrement. On observe une tendance similaire en ce qui concerne les spikes avec le MFR et le MObFR.

Pour quantifier l'amplitude des effets observés, les valeurs des médianes ont été comparées entre les différentes phases. Pendant la phase de chauffage des neurones, le MBR diminuait de 38,9 % et 32,5% par rapport aux phases S1 et S2, respectivement. Concernant le MFR, il diminuait de 36,6 % par rapport à la phase S1 et de 36 % par rapport à la phase S2. Enfin, pour le M_{OBFR} , des réductions de 28,8 % et 25,6 % par rapport aux phases S1 et S2 ont été observées, respectivement (Figure 31).

Cinétique « rapide » d'élévation de la température

La deuxième ligne de la Figure 31 montre les résultats obtenus lors d'un chauffage de 1°C des neurones en suivant une **cinétique « rapide »** d'élévation de la température. Ces résultats ont déjà été exposés dans l'article, mais nous faisons ici un rappel de ces données. Dans cette condition, nous observons un effet du chauffage des neurones uniquement sur le MBR et le MFR. En effet, pendant la phase de chauffage (E), le MBR et le MFR diminuent de façon significative de 15,7% et 27,1% respectivement, par rapport à la phase S1. De plus, le MFR des phases P1 et P2 est significativement plus faible qu'en phase S1, suggérant que l'inhibition des spikes n'est pas immédiatement réversible après l'arrêt du chauffage par la plaque chauffante.

2.2.3.2. Effet de l'amplitude de l'augmentation de la température sur l'activité neuronale

La dernière ligne de la Figure 31 illustre les résultats obtenus lors d'un chauffage de 2°C des neurones en suivant une cinétique « très rapide » d'élévation de la température. Comme pour les expériences précédentes, l'activité électrique basale des neurones (phases S1 et S2) est relativement stable, quelles que soient les métriques considérées. On observe une diminution significative du MBR pendant la phase de chauffage des neurones (E). En effet, le MBR diminue d'environ 21,7 % par rapport à la phase S2 qui enregistre l'activité électrique basale. Aucune variation significative n'est observée concernant le MBD et le MFR pendant la phase de chauffage des neurones, bien qu'une tendance légère à la baisse soit perceptible. En revanche, on constate une diminution significative du MFR après la période de chauffage (phase P1), par rapport à la phase précédent le chauffage (phase S2). Il est important de noter que le seuil de significativité de cet effet est relativement faible ($p = 0.0497$). C'est sur le M_{OBFR} que nous observons l'effet le plus important d'une augmentation de la température de 2°C sur l'activité neuronale. En effet, cette élévation de la température induit une nette diminution du M_{OBFR} par rapport aux phases de pré- et de post-chauffage (S1, S2 et P1, P2). Ces diminutions, pendant la phase de chauffage, sont de l'ordre de 25,9 %, 35,4 %, 26,1 % et 47,1% par rapport aux phases S1, S2, P1 et P2, respectivement.

2.2.4. Discussion

	Condition «cinétique lente »			Condition «cinétique rapide »			Condition «cinétique très rapide »		
Saut de température (ΔT)	+ 1°C			+ 1°C			+ 2°C		
Vitesse d'augmentation de la température	0,16 °C/min			0,38 °C/min			0,5 °C/min		
Nombre d'échantillons (n)	n = 9			n = 13			n = 6		
% de diminution ou d'augmentation en E par rapport à S1	MBR	MFR	MOBFR	MBR	MFR	MOBFR	MBR	MFR	MOBFR
	-38,9	-36,6	-28,8	-15,7	-27,1	+2	-19,1	-5,3	-25,9
Seuil de significativité	***	***	*	**	***	N.S.	N.S.	N.S.	*

Tableau 8 - Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de notre étude sur l'effet de la température sur l'activité électrique des neurones.

2.2.4.1. Effet inhibiteur important de la cinétique « lente »

Dans cette dernière étude, nous nous sommes intéressés aux effets de la vitesse d'augmentation de la température sur l'activité électrique des neurones en culture. Nos résultats montrent qu'en utilisant une cinétique « lente » de montée en température (0,16°C/min), l'échauffement induit une inhibition relativement marquée de l'activité électrique des neurones (Tableau 8). En effet, dans ces conditions, les taux moyens de spikes (MFR) et de bursts (MBR) diminuent d'environ 36,6 % et 38,9 %, respectivement. De plus, nous observons une réduction du taux moyen de spikes en dehors des bursts (MOBFR), indiquant que l'effet ne cible pas uniquement les spikes présents au sein des bursts, mais englobe l'ensemble des spikes générés par les neurones. Ces effets ne sont pas immédiatement réversibles, en particulier en ce qui concerne le taux moyen de bursts (MBR).

2.2.4.2. Effet inhibiteur moindre de la cinétique « rapide »

Dans l'article (voir partie 2.1.2 de la thèse), nous nous sommes également intéressés aux effets d'une vitesse plus « rapide » d'augmentation de la température sur l'activité électrique des neurones. Les résultats obtenus indiquent qu'en utilisant une cinétique « rapide » d'élévation de la température (0,38°C/min), l'échauffement par conduction des neurones produit également une diminution de l'activité électrique. En effet, les taux moyens de spikes (MFR) et de bursts (MBR) sont réduits de 27,1 % et 15,7 %, respectivement (Tableau 8). Dans cette condition, la diminution des spikes n'est pas immédiatement réversible après l'interruption du chauffage des neurones par la plaque chauffante.

2.2.4.3. Comparaison des effets cinétique « lente » et cinétique « rapide »

Lorsqu'on compare les effets des deux cinétiques différentes (lente et rapide) sur les neurones, nos résultats suggèrent que **la vitesse à laquelle la température augmente joue un rôle important dans la réponse neuronale**. En effet, des effets inhibiteurs d'amplitudes différentes sont observés, alors même que les neurones sont exposés à un saut de température similaire (environ 1°C). **Les effets inhibiteurs exercés sur l'activité neuronale semblent être plus marqués lorsque la montée en température s'effectue de manière progressive.**

Dans ces deux conditions expérimentales, l'effet sur les spikes et les bursts ne semble pas immédiatement réversible dans les 30 minutes qui suivent la phase de chauffage des neurones. Cette observation est particulièrement évidente sur les bursts (MBR) dans la condition cinétique « lente » et sur les spikes (MFR) dans la condition cinétique « rapide ». Il convient cependant de noter que les profils de température qui suivent l'arrêt du chauffage des neurones diffèrent légèrement entre ces deux conditions (Figure 29).

2.2.4.4. Commentaire sur les expériences avec un saut de température de 2°C et une cinétique « très rapide »

En parallèle, nous voulions également examiner l'impact de l'amplitude de l'élévation de la température sur l'activité électrique des neurones en comparant différents sauts de température ($\Delta T = 1^\circ\text{C}$ et $\Delta T = 2^\circ\text{C}$) sans forcément contrôler la vitesse d'augmentation de la température.

Dans cette configuration, nos résultats montrent une tendance à l'inhibition, qui ressort légèrement sur les bursts (MBR) et de façon plus marquée sur les spikes isolés (M_{OBF}). Ces résultats doivent être abordés avec prudence, puisqu'ils reposent sur un nombre légèrement moins important d'échantillons. De plus, il est difficile de dire si les effets observés découlent directement du saut de température de 2°C, ou de la cinétique « très rapide » d'élévation de la température.

2.2.4.5. Comparaison des effets de l'exposition aux RF et du chauffage par conduction des neurones

Dans l'article (voir partie 2.1.2 de la thèse), nous nous sommes intéressés aux effets d'une exposition aux RF à 3,5 GHz sur l'activité électrique de réseaux de neurones *in vitro*. Les résultats obtenus indiquaient qu'à des niveaux de DAS élevés (28 W/kg), une exposition à des signaux non-modulés (CW) ou modulés (5G) entraînait une inhibition importante de l'activité électrique spontanée des neurones. En effet, nous observions une réduction d'environ 40 % du taux moyen de spikes (MFR) et de bursts (MBR) pendant l'exposition. Cette inhibition de l'activité électrique était immédiatement réversible après l'arrêt de l'exposition aux radiofréquences. Pour rappel, cette exposition à forte puissance (28 W/kg)

s'accompagnait d'une élévation de $0,8 \pm 0,2$ °C de la température, avec une vitesse moyenne d'augmentation de la température d'environ $0,09$ °C/min. Comme l'indique la Figure 32, les profils de montée en température obtenus avec la plaque chauffante et l'exposition aux radiofréquences ne sont pas rigoureusement comparables. À cette étape préliminaire de notre exploration, nous pouvons seulement constater qu'une augmentation d'environ $0,8$ °C de la température due à l'exposition aux radiofréquences s'accompagne d'effets inhibiteurs encore plus prononcés que ceux induits par le chauffage direct.

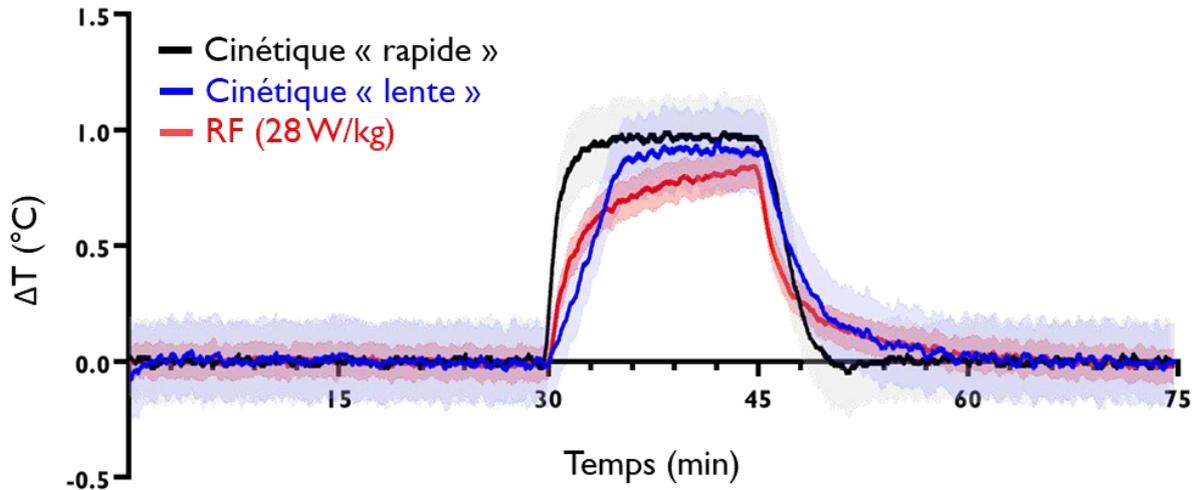


Figure 32 - Représentation des élévations de température induites par l'exposition aux RF à 28 W/kg (en rouge ; n = 6) ou par chauffage direct avec une cinétique « lente » (en bleu ; n = 3) et une cinétique « rapide » (en noir ; n = 3) d'élévation de la température.

Nos conclusions semblent aller à l'encontre des résultats présentés par Bolshakov et Alekseev (1986) qui observaient plutôt une inhibition de l'activité électrique lors d'une augmentation rapide de la température. Il est néanmoins important de souligner que leur étude était réalisée sur un modèle bien différent et plus simple : les neurones pacemakers de la grande limnée (*Lymnaea stagnalis*). Ce qui est intéressant c'est que dans une seconde étude (Alekseev et al., 1997), les auteurs signalent que pour reproduire les effets observés lors d'une exposition aux ondes millimétriques à 75 GHz, il est nécessaire de chauffer les neurones pacemakers en reproduisant à l'identique l'amplitude et la cinétique d'élévation de la température induites par l'irradiation. Ces conclusions vont dans le sens des nôtres, en soulignant que la cinétique d'élévation de la température joue un rôle crucial dans le développement de la réponse neuronale. Cependant, les études sur le sujet sont très limitées. Par conséquent, il serait intéressant de poursuivre nos recherches afin de mieux caractériser l'impact de l'amplitude et de la cinétique d'élévation de la température sur l'activité électrique des neurones.

CHAPITRE 3 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce chapitre récapitule les conclusions tirées de mes recherches, telles qu'elles ont été présentées dans le manuscrit, tout en suggérant des pistes pour de futures études, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de recherche.

3.1. Conclusion

Ce manuscrit résume mes trois années de recherche dans le domaine du **bioélectromagnétisme**, un domaine multidisciplinaire dans lequel les études se concentrent sur les effets biologiques et sanitaires de l'exposition aux champs électromagnétiques. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à l'échelle cellulaire, en se focalisant principalement sur l'impact des signaux 5G à 3,5 GHz sur l'activité électrique de neurones en culture.

Mes résultats montrent qu'à des niveaux proches des normes environnementales (1 et 3 W/kg), l'exposition aux RF à 3,5 GHz n'affecte pas l'activité électrique des neurones en culture, qu'il s'agisse de signaux modulés 5G ou non-modulés (CW). Sans prétendre extrapoler à l'Homme les données obtenues sur un modèle *in vitro*, ces résultats sont plutôt rassurants par rapport aux normes d'exposition actuelles.

Dans ce manuscrit, je présente également des preuves expérimentales qu'une exposition aux RF à 3,5 GHz, à des niveaux de DAS considérablement élevés (28 W/kg), dépassant largement les réglementations environnementales, provoque une inhibition réversible de l'activité électrique des neurones. À l'heure actuelle, sachant qu'une telle exposition s'accompagne d'une élévation de la température d'environ 1°C, nous ne pouvons pas exclure que ces effets inhibiteurs sur l'activité neuronale soient de nature thermique. Par conséquent, afin de distinguer les effets thermiques des effets non-thermiques, nous avons fait des expériences complémentaires pour étudier l'impact d'un échauffement sur l'activité neuronale. De manière intéressante, une inhibition de l'activité neuronale est également observée lorsque la température au niveau des neurones augmente par conduction, suggérant que les effets observés avec les radiofréquences ont une composante thermique. De plus, ces études préliminaires suggèrent que la vitesse à laquelle la température augmente joue un rôle dans l'amplitude de la réponse neuronale, avec des effets inhibiteurs plus marqués lorsque la montée en température est lente. Ces résultats devront être consolidés par une approche expérimentale plus exhaustive.

3.2. Perspectives à court terme

Effets d'une exposition à 3,5 GHz en fonction du DAS : Suite à nos résultats démontrant une inhibition significative de l'activité électrique des neurones lors d'une exposition aux RF à 3,5 GHz avec un DAS de 28 W/kg, une prochaine étape consisterait à identifier le niveau de DAS à partir duquel ces effets inhibiteurs se manifestent. Ces données pourraient être particulièrement intéressantes pour des organismes qui évaluent le risque d'une exposition aux radiofréquences en se basant sur la littérature disponible tels que l'OMS et l'ANSES.

Expériences de co-exposition à différents signaux de téléphonie mobile : Dans notre vie quotidienne, nous sommes constamment exposés à des signaux émis par différents réseaux de téléphonie mobile tels que la 2G, 3G, 4G et la 5G. Par conséquent, il devient important d'étudier les conséquences de cette co-exposition sur la santé. Pour étudier cette question, nous avons fait quelques expériences préliminaires visant à étudier les effets d'une exposition simultanée aux signaux de la 2G (GSM-1800 MHz) et de la 5G (NR-3500 MHz), sur l'activité électrique de neurones en culture. Au moment où s'achève la rédaction de ma thèse, les résultats de cette co-exposition n'ont pas encore été analysés. En effet, les enregistrements de l'activité neuronale effectués présentent des artefacts causés par des interférences avec le signal modulé en GSM (2G). Ces interférences produisent des « pics » négatifs qui surviennent à une fréquence de 217 Hz, avec une durée de 0,57 millisecondes chacun (Figure 33). Par conséquent, le logiciel SPYCODE, qui sert à l'analyse des signaux enregistrés, ne parvient pas à distinguer les pics résultants de l'activité neuronale des pics associés aux interférences.

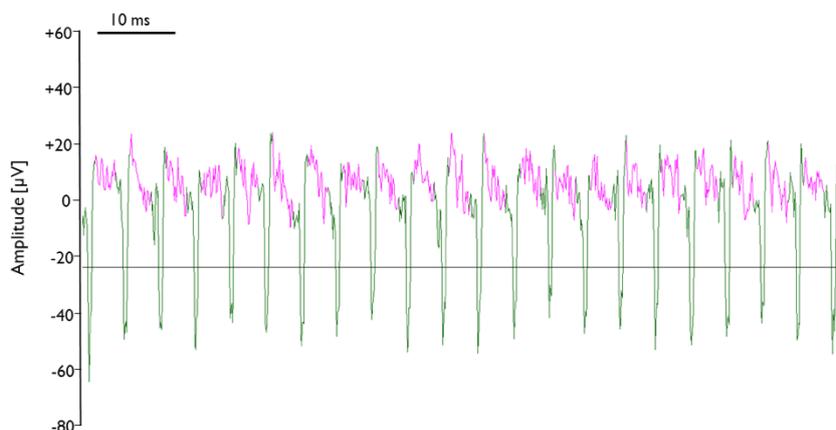


Figure 33 - Exemple d'un enregistrement lors d'une exposition à un signal GSM. L'interférence est visualisée par les pics négatifs (en vert), qui masquent l'activité électrique spontanée des neurones.

Lors de précédentes études menées par mon équipe, visant à étudier les effets d'une unique exposition à un signal GSM sur l'activité électrique des neurones (El Khoueiry et al., 2018; Moretti et al., 2013), un filtre spécifique avait été mis en place. Ce filtre avait pour objectif de supprimer les interférences GSM lors des étapes d'analyse des signaux en utilisant le logiciel SPYCODE. Cependant, par manque de temps, les paramètres de ce filtre n'ont pas encore été ajustés pour nos analyses actuelles. Ces

ajustements devront prochainement être réalisés afin de mener une analyse approfondie des résultats obtenus lors d'une co-exposition aux signaux émis par les réseaux 2G et 5G. De plus, une autre perspective pourrait consister à reproduire ces expériences de co-exposition en utilisant des signaux différents, tels que ceux associés à la technologie 3G (UMTS) et 4G (LTE). Ces expériences, qui reflètent davantage les conditions réelles d'exposition, nous permettront de mieux comprendre les interactions potentielles entre les nouvelles et les anciennes technologies, ainsi que leurs implications éventuelles sur l'activité électrique des neurones.

Nouvelles métriques pour la caractérisation de l'activité électrique des neurones : Nous envisageons d'approfondir la caractérisation de l'activité électrique des neurones en adoptant de nouvelles métriques. Nous envisageons notamment d'appliquer un algorithme de « Spike sorting », un processus permettant d'extraire les potentiels d'action (spikes) d'un enregistrement électrophysiologique extracellulaire. Cette approche nous donnerait la possibilité d'obtenir des informations sur la forme des potentiels d'action (amplitude et largeur), offrant ainsi une meilleure compréhension de l'effet d'une exposition aux RF sur l'activité neuronale. Cette approche séduisante suscite un grand intérêt et répondrait aux interrogations de certaines études qui suggèrent que l'exposition aux RF pourrait altérer la forme des potentiels d'action (Echchgadda et al., 2022; Romanenko et al., 2014; Pikov et al., 2010).

Expériences plus approfondies sur l'effet de la température sur l'activité électrique des neurones : Dans le but de mieux comprendre le rôle d'une élévation de la température sur l'activité neuronale, nous envisageons d'entreprendre de nouvelles expériences en chauffant des cultures de neurones avec une plaque chauffante. Ces expériences nous permettront d'explorer des cinétiques supplémentaires d'augmentation de la température et de consolider nos observations préliminaires, qui laissent entendre que la vitesse à laquelle la température s'élève joue un rôle critique dans le développement de la réponse neuronale.

Nous aspirons également à reproduire avec une grande précision les changements de température induits par les RF à une puissance de 28 W/kg. Notre objectif consistera à reproduire à la fois l'amplitude et la cinétique de montée en température induite par cette exposition aux radiofréquences. Cette démarche vise à mieux caractériser l'effet inhibiteur de l'exposition aux RF et à identifier plus particulièrement la part thermique du mécanisme d'action.

3.3. Perspectives à long terme

Expériences in vivo : Après avoir conduit des expériences à l'échelle cellulaire, il serait intéressant d'augmenter l'échelle de complexité biologique en réalisant des expériences sur des modèles animaux (*in vivo*). Pour cela, nous envisageons de suivre en temps réel l'activité cérébrale de rongeurs exposés aux RF en utilisant une technologie novatrice récemment développée, à savoir l'imagerie fonctionnelle

par ultrasons (fUS)(Tiran et al., 2017; Osmanski et al., 2014; Macé et al., 2013, 2011). Cette technologie offre une très grande sensibilité pour détecter les variations subtiles du flux sanguin dans les petits vaisseaux cérébraux, variations indirectement liées à l'activité neuronale. Cette technique de fUS a été utilisée précédemment par mon équipe pour examiner les modifications potentiellement induites par une exposition au signal GSM-1800 MHz sur l'activation cérébrale de souris anesthésiées (Orlacchio et al., 2022). Dans cette étude, une configuration expérimentale spécifique était utilisée, combinant le fUS à une antenne dipôle, permettant ainsi une exposition locale de la tête des souris aux radiofréquences (Figure 34). Dans ce contexte, nous aimerions reproduire une expérience similaire en exposant cette fois-ci les souris à des signaux 5G dans le but d'évaluer leur impact sur l'activité cérébrale des rongeurs. Si cela est possible, nous ferons ces expériences sur des animaux vigiles.

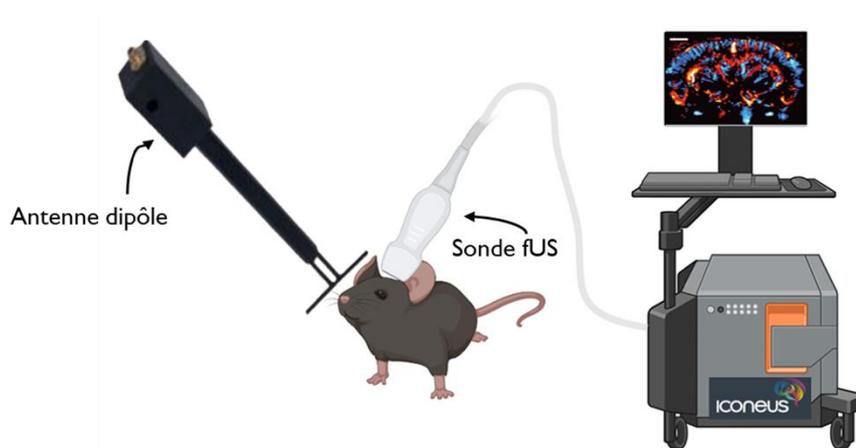


Figure 34 – Représentation schématique d'un système combinant exposition RF et neuroimagerie par fUS. Le dispositif fUS est commercialisé par Iconeus.

Méthodes alternatives à l'utilisation d'électrodes métalliques pour l'enregistrement de l'activité électrique des neurones in vitro : Comme nous le discutons dans l'article (voir partie 2.1.2 de la thèse), les électrodes métalliques situées au fond des puits de culture peuvent interférer avec le champ électromagnétique pendant l'exposition, introduisant de potentiels biais dans les résultats obtenus. Par conséquent, nous sommes à la recherche d'une méthode alternative permettant d'évaluer en temps réel les effets d'une exposition aux RF sur l'activité électrique des neurones, sans recourir à l'utilisation d'éléments métalliques.

Dans cette optique, nous collaborons actuellement avec une équipe de l'I2M¹⁰ à Bordeaux afin de développer une nouvelle méthode non invasive permettant de détecter indirectement l'activité neuronale à partir de mesures thermiques. Cette approche repose sur l'hypothèse selon laquelle les neurones émettent naturellement de la chaleur lorsqu'ils génèrent des signaux électriques. Par conséquent, nous

¹⁰ Institut de Mécanique et d'Ingénierie (<https://www.i2m.u-bordeaux.fr/>)

envisageons d'utiliser une caméra thermique pour surveiller en temps réel les changements de température au sein d'une culture de neurones. Actuellement, nous analysons les résultats des premières expériences visant à évaluer la capacité de détection, à l'aide d'une caméra thermique, des faibles émissions de chaleur émises par les neurones. Bien que prometteuse sur le plan de la détection indirecte de l'activité électrique, cette technique n'est peut-être pas compatible avec l'exposition aux RF qui induit généralement une élévation de la température. L'analyse en cours devrait révéler cette éventuelle limitation.

Nous envisageons également de faire de l'imagerie calcique pour détecter de façon indirecte les effets d'une exposition aux RF sur l'activité électrique des neurones en culture. Cette technique repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au calcium intracellulaire. En employant ces sondes fluorescentes, il devient possible de détecter les variations de concentration en ions calcium, lesquelles sont corrélées à l'activité électrique des neurones, en observant une population de neurones. L'adoption de cette approche nécessiterait cependant une reconfiguration de notre dispositif expérimental, notamment par l'intégration d'un microscope à fluorescence essentiel pour visualiser, en temps réel, les signaux émis par les sondes calciques à l'intérieur des neurones.

Les deux méthodes alternatives mentionnées dans cette partie présentent en commun l'inconvénient d'être des approches indirectes pour évaluer l'activité électrique des neurones.

CHAPITRE 4 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adair, E.R., Adams, B.W., 1980. Microwaves modify thermoregulatory behavior in squirrel monkey. *Bioelectromagnetics* 1, 1–20. <https://doi.org/10.1002/bem.2250010102>
- Adair, E.R., Adams, B.W., Akel, G.M., 1984. Minimal changes in hypothalamic temperature accompany microwave-induced alteration of thermoregulatory behavior. *Bioelectromagnetics* 5, 13–30. <https://doi.org/10.1002/bem.2250050103>
- Alekseev, S. i., Ziskin, M. c., Kochetkova, N. v., Bolshakov, M. a., 1997. Millimeter waves thermally alter the firing rate of the Lymnaea pacemaker neuron. *Bioelectromagnetics* 18, 89–98. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-186X\(1997\)18:2<89::AID-BEM1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-186X(1997)18:2<89::AID-BEM1>3.0.CO;2-0)
- Amiel-Tison, C., Gosselin, J., 2010. Système nerveux central : anatomie, physiologie, in: *Pathologie neurologique périnatale et ses conséquences*. Elsevier, pp. 5–13. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-70895-4.00001-3>
- Anane, R., Geffard, M., Taxile, M., Bodet, D., Billaudel, B., Dulou, P.E., Veyret, B., 2003. Effects of GSM-900 microwaves on the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) rat model of multiple sclerosis. *Bioelectromagnetics* 24, 211–213. <https://doi.org/10.1002/bem.10093>
- ANSES, 2022. Exposition aux champs électromagnétiques liée au déploiement de la technologie “5G.”
- ANSES, 2019. Exposition de la population aux champs électromagnétiques liée au déploiement de la technologie de communication « 5G » et effets sanitaires associés.
- Arendash, G.W., Sanchez-Ramos, J., Mori, T., Mamcarz, M., Lin, X., Runfeldt, M., Wang, L., Zhang, G., Sava, V., Tan, J., Cao, C., 2010. Electromagnetic field treatment protects against and reverses cognitive impairment. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 191–210. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1228>
- Barański, S., Edelwejn, Z., 1967. [Electroencephalographic and morphological studies on the effect of microwaves on the central nervous system]. *Acta Physiol Pol* 18, 517–532.
- Bawin, S.M., Bach, S.A., Lewis, S.A., 1960. Effects of radio-frequency energy on primate cerebral activity. *Neurology* 10, 178–178. <https://doi.org/10.1212/WNL.10.2.178>
- Bawin, S.M., Gavalas-Medici, R.J., Adey, W.R., 1973. Effects of modulated very high frequency fields on specific brain rhythms in cats. *Brain Res.* 58, 365–384. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90008-5)
- Beason, R.C., Semm, P., 2002. Responses of neurons to an amplitude modulated microwave stimulus. *Neurosci. Lett.* 333, 175–178. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00903-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00903-5)
- Berger, H., 1929. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Arch. Für Psychiatr. Nervenkrankh.* 87, 527–570. <https://doi.org/10.1007/BF01797193>
- Besset, A., Espa, F., Dauvilliers, Y., Billiard, M., De Seze, R., 2005. No effect on cognitive function from daily mobile phone use. *Bioelectromagnetics* 26, 102–108. <https://doi.org/10.1002/bem.20053>
- Bolshakov, M. a., Alekseev, S. i., 1986. [Changes in the electrical activity of pacemaker neurons of the snail depending on the heating rate]. *Biofizika* 31, 521–523.
- Canovi, A., Orlacchio, R., Poullietier De Gannes, F., Lévêque, P., Arnaud-Cormos, D., Lagroye, I., Garenne, A., Percherancier, Y., Lewis, N., 2023. In vitro exposure of neuronal networks to the 5G-3.5 GHz signal. *Front. Public Health* 11, 1231360. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1231360>

- Castaño-Rodríguez, C., Honrubia, J.M., Gutiérrez-Álvarez, J., DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Verdia-Báguena, C., Queralt-Martín, M., Kochan, G., Perlman, S., Aguilera, V.M., Sola, I., Enjuanes, L., 2018. Role of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroproins E, 3a, and 8a in Replication and Pathogenesis. *mBio* 9, e02325-17, /mbio/9/3/mBio.02325-17.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.02325-17>
- Chiappalone, M., Vato, A., Berdondini, L., Koudelka-Hep, M., Martinoia, S., 2007. Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons. *Int. J. Neural Syst.* 17, 87–103. <https://doi.org/10.1142/S0129065707000968>
- Chung-Kwang Chou, Guy, A.W., 1978. Effects of Electromagnetic Fields on Isolated Nerve and Muscle Preparations. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 26, 141–147. <https://doi.org/10.1109/TMTT.1978.1129334>
- Cook, C.M., Thomas, A.W., Prato, F.S., 2004. Resting EEG is affected by exposure to a pulsed ELF magnetic field. *Bioelectromagnetics* 25, 196–203. <https://doi.org/10.1002/bem.10188>
- Coureau, G., Bouvier, G., Lebailly, P., Fabbro-Peray, P., Gruber, A., Leffondre, K., Guillamo, J.-S., Loiseau, H., Mathoulin-Pélissier, S., Salamon, R., Baldi, I., 2014. Mobile phone use and brain tumours in the CERENAT case-control study. *Occup. Environ. Med.* 71, 514–522. <https://doi.org/10.1136/oemed-2013-101754>
- Courtney, K.R., Lin, J.C., Guy, A.W., Chou, C., 1975. Microwave Effect on Rabbit Superior Cervical Ganglion. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 23, 809–813. <https://doi.org/10.1109/TMTT.1975.1128687>
- Crawford, M.L., 1974. Generation of Standard EM Fields Using TEM Transmission Cells. *IEEE Trans. Electromagn. Compat. EMC-16*, 189–195. <https://doi.org/10.1109/TEMC.1974.303364>
- Croft, R., Chandler, J.S., Burgess, A.P., Barry, R.J., Williams, J.D., Clarke, A.R., 2002. Acute mobile phone operation affects neural function in humans. *Clin. Neurophysiol.* 113, 1623–1632. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(02\)00215-8](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(02)00215-8)
- Croft, R.J., Hamblin, D.L., Spong, J., Wood, A.W., McKenzie, R.J., Stough, C., 2008. The effect of mobile phone electromagnetic fields on the alpha rhythm of human electroencephalogram. *Bioelectromagnetics* 29, 1–10. <https://doi.org/10.1002/bem.20352>
- Croft, R.J., Leung, S., McKenzie, R.J., Loughran, S.P., Iskra, S., Hamblin, D.L., Cooper, N.R., 2010. Effects of 2G and 3G mobile phones on human alpha rhythms: Resting EEG in adolescents, young adults, and the elderly. *Bioelectromagnetics* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/bem.20583>
- Crouzier, D., Debouzy, J.C., Bourbon, F., Collin, A., Perrin, A., Testylier, G., 2007. Neurophysiologic effects at low level 1.8 GHz radiofrequency field exposure: a multiparametric approach on freely moving rats. *Pathol. Biol.* 55, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.06.007>
- Curcio, G., Ferrara, M., Moroni, F., D’Inzeo, G., Bertini, M., De Gennaro, L., 2005. Is the brain influenced by a phone call? *Neurosci. Res.* 53, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.07.003>
- D’Andrea, J.A., DeWitt, J.R., Gandhi, O.P., Stensaas, S., Lords, J.L., Nielson, H.C., 1986. Behavioral and physiological effects of chronic 2,450-MHz microwave irradiation of the rat at 0.5 mW/cm². *Bioelectromagnetics* 7, 45–56. <https://doi.org/10.1002/bem.2250070106>
- De Lorge, J.O., Ezell, C.S., 1980. Observing-responses of rats exposed to 1.28- and 5.62-GHz microwaves. *Bioelectromagnetics* 1, 183–198. <https://doi.org/10.1002/bem.2250010208>

- Deltour, I., Poulsen, A.H., Johansen, C., Feychting, M., Johannesen, T.B., Auvinen, A., Schüz, J., 2022. Time trends in mobile phone use and glioma incidence among males in the Nordic Countries, 1979–2016. *Environ. Int.* 168, 107487. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107487>
- Dewhirst, M.W., Viglianti, B.L., Lora-Michiels, M., Hanson, M., Hoopes, P.J., 2003. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 19, 267–294. <https://doi.org/10.1080/0265673031000119006>
- Echchgadda, I., Cantu, J.C., Tolstykh, G.P., Butterworth, J.W., Payne, J.A., Ibey, B.L., 2022. Changes in the excitability of primary hippocampal neurons following exposure to 3.0 GHz radiofrequency electromagnetic fields. *Sci. Rep.* 12, 3506. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06914-0>
- El Khoueiry, C., Moretti, D., Renom, R., Camera, F., Orlacchio, R., Garenne, A., Poulletier De Gannes, F., Poque-Haro, E., Lagroye, I., Veyret, B., Lewis, N., 2018. Decreased spontaneous electrical activity in neuronal networks exposed to radiofrequency 1,800 MHz signals. *J. Neurophysiol.* 120, 2719–2729. <https://doi.org/10.1152/jn.00589.2017>
- Eltiti, S., Wallace, D., Ridgewell, A., Zougkou, K., Russo, R., Sepulveda, F., Fox, E., 2009. Short-term exposure to mobile phone base station signals does not affect cognitive functioning or physiological measures in individuals who report sensitivity to electromagnetic fields and controls. *Bioelectromagnetics* 30, 556–563. <https://doi.org/10.1002/bem.20504>
- Fox, M.D., Raichle, M.E., 2007. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 700–711. <https://doi.org/10.1038/nrn2201>
- Fritzer, G., Göder, R., Friege, L., Wachter, J., Hansen, V., Hinze-Selch, D., Aldenhoff, J.B., 2007. Effects of short- and long-term pulsed radiofrequency electromagnetic fields on night sleep and cognitive functions in healthy subjects. *Bioelectromagnetics* 28, 316–325. <https://doi.org/10.1002/bem.20301>
- Ghosn, R., Villégier, A.-S., Selmaoui, B., Thuróczy, G., De Sèze, R., 2013. Effets des radiofréquences sur le système nerveux central chez l’homme : EEG, sommeil, cognition, vascularisation. *Comptes Rendus Phys.* 14, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2013.02.004>
- Ghosn, R., Yahia-Cherif, L., Hugueville, L., Ducorps, A., Lemaréchal, J.-D.D., Thuróczy, G., de Seze, R., Selmaoui, B., 2015. Radiofrequency signal affects alpha band in resting electroencephalogram. *J Neurophysiol* 113, 2753–9. <https://doi.org/10.1152/jn.00765.2014>
- Gielen, M., 2010. Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate: Des proteines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *médecine/sciences* 26, 65–72. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026165>
- Green, A.C., Scott, I.R., Gwyther, R.J., Peyman, A., Chadwick, P., Chen, X., Alfadhl, Y., Tattersall, J.E.H., 2005. An investigation of the effects of TETRA RF fields on intracellular calcium in neurones and cardiac myocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 869–885. <https://doi.org/10.1080/09553000600555389>
- Haarala, C., Takio, F., Rintee, T., Laine, M., Koivisto, M., Revonsuo, A., Hämäläinen, H., 2007. Pulsed and continuous wave mobile phone exposure over left versus right hemisphere: Effects on human cognitive function. *Bioelectromagnetics* 28, 289–295. <https://doi.org/10.1002/bem.20287>
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 391, 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Hammond, C., Tritsch, D., 1990. *Neurobiologie cellulaire*. Doin, Paris.

- Hao, Y., Liu, W., Liu, Yujie, Liu, Ying, Xu, Z., Ye, Y., Zhou, H., Deng, H., Zuo, H., Yang, H., Li, Y., 2023. Effects of Nonthermal Radiofrequency Stimulation on Neuronal Activity and Neural Circuit in Mice. *Adv. Sci.* 2205988. <https://doi.org/10.1002/advs.202205988>
- Hardell, 2011. Pooled analysis of case-control studies on malignant brain tumours and the use of mobile and cordless phones including living and deceased subjects. *Int. J. Oncol.* 38. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.947>
- Hardell, L., Carlberg, M., 2015. Mobile phone and cordless phone use and the risk for glioma – Analysis of pooled case-control studies in Sweden, 1997–2003 and 2007–2009. *Pathophysiology* 22, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2014.10.001>
- Hietanen, M., Kovala, T., Hämäläinen, A.-M., 2000. Human brain activity during exposure to radiofrequency fields emitted by cellular phones. *Scand. J. Work. Environ. Health* 26, 87–92. <https://doi.org/10.5271/sjweh.516>
- Hinrikus, H., Bachmann, M., Lass, J., Tomson, R., Tuulik, V., 2008. Effect of 7, 14 and 21 Hz modulated 450 MHz microwave radiation on human electroencephalographic rhythms. *Int. J. Radiat. Biol.* 84, 69–79. <https://doi.org/10.1080/09553000701691679>
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1939. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144, 710–711. <https://doi.org/10.1038/144710a0>
- Huber, R., Treyer, V., Borbely, A.A., Schuderer, J., Gottselig, J.M., Landolt, H.-P., Werth, E., Berthold, T., Kuster, N., Buck, A., Achermann, P., 2002. Electromagnetic fields, such as those from mobile phones, alter regional cerebral blood flow and sleep and waking EEG. *J. Sleep Res.* 11, 289–295. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2869.2002.00314.x>
- ICNIRP, 2020. Guidelines for Limiting Exposure to Electromagnetic Fields (100 kHz to 300 GHz). *Health Phys.* 118, 483–524. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001210>
- ICNIRP, 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Phys* 74, 494–522.
- INRS, 2018. Les ondes électromagnétiques : Actions et effets sur le corps humain - Fiche ED4350.
- INRS, 2001. Guide pour l'établissement de limites d'exposition aux champs électriques, magnétiques et électromagnétiques. Cahiers de notes documentaires - Hygiène et sécurité du travail.
- Inskip, P.D., Tarone, R.E., Hatch, E.E., Wilcosky, T.C., Shapiro, W.R., Selker, R.G., Fine, H.A., Black, P.M., Loeffler, J.S., Linet, M.S., 2001. Cellular-Telephone Use and Brain Tumors. *N. Engl. J. Med.* 344, 79–86. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101113440201>
- IT'IS Foundation, n.d. Tissue Properties - Dielectric properties [WWW Document]. URL <https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/dielectric-properties/> (accessed 7.26.23).
- Jain, G., Muley, N., Soni, P., Singh, J.N., Sharma, S.S., 2009. Patch clamp Technique: Conventional to Automated 10, 8.
- Jeong, Y., Kang, G.-Y., Kwon, J., Choi, H.-D., Pack, J.-K., Kim, N., Lee, Y.-S., Lee, H.-J., 2015. 1950 MHz Electromagnetic Fields Ameliorate A β Pathology in Alzheimer's Disease Mice. *Curr. Alzheimer Res.* 12, 481–492. <https://doi.org/10.2174/156720501205150526114448>

- Joseph, W., 2022. Présentation générale “ Exposition aux radiofréquences.”
- Kholodov, Iu. A., Ianson, Z.A., 1962. [Changes in the electrical activity of the cerebral cortex of rabbits under the influence of a high-frequency electromagnetic field. The influence of a high-frequency field on the electroencephalogram of intact rabbits.]. *Biull Eksp Biol Med* 54, 8–12.
- Koester, P., Sakowski, J., Baumann, W., Glock, H.-W., Gimsa, J., 2007. A new exposure system for the in vitro detection of GHz field effects on neuronal networks. *Bioelectrochemistry* 70, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.03.039>
- Köhler, T., Wölfel, M., Ciba, M., Bochtler, U., Thielemann, C., 2018. Terrestrial Trunked Radio (TETRA) exposure of neuronal in vitro networks. *Environ. Res.* 162, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.12.007>
- Lemercier, C.E., Garenne, A., Gannes, F.P. de, Khoueiry, C.E., Arnaud-Cormos, D., Levêque, P., Lagroye, I., Percherancier, Y., Lewis, N., 2022. Comparative study between radiofrequency-induced and muscimol-induced inhibition of cultured networks of cortical neuron. *PLOS ONE* 17, e0268605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268605>
- Leveque, P., Reineix, A., Jecko, B., 1992. Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas: application of FDTD method. *Electron. Lett.* 28, 539–541.
- López-Martín, E., Bregains, J., Relova-Quinteiro, J.L., Cadarso-Suárez, C., Jorge-Barreiro, F.J., Ares-Pena, F.J., 2009. The action of pulse-modulated GSM radiation increases regional changes in brain activity and c-Fos expression in cortical and subcortical areas in a rat model of picrotoxin-induced seizure proneness. *J. Neurosci. Res.* 87, 1484–1499. <https://doi.org/10.1002/jnr.21951>
- Lorrain, J., Raoul, D., 2002. *Téléphonie mobile et santé.*
- Loughran, S.P., McKenzie, R.J., Jackson, M.L., Howard, M.E., Croft, R.J., 2012. Individual differences in the effects of mobile phone exposure on human sleep: Rethinking the problem. *Bioelectromagnetics* 33, 86–93. <https://doi.org/10.1002/bem.20691>
- Maby, E., Le Bouquin Jeannes, R., Faucon, G., 2006. Short-term effects of GSM mobiles phones on spectral components of the human electroencephalogram, in: 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Presented at the Conference Proceedings. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE, New York, NY, pp. 3751–3754. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.259283>
- Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., Tanter, M., 2011. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods* 8, 662–4. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1641>
- Macé, E., Montaldo, G., Osmanski, B.-F., Cohen, I., Fink, M., Tanter, M., 2013. Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60, 492–506. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2013.2592>
- Merla, C., Ticaud, N., Arnaud-Cormos, D., Veyret, B., Leveque, P., 2011. Real-Time RF Exposure Setup Based on a Multiple Electrode Array (MEA) for Electrophysiological Recording of Neuronal Networks. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 59, 755–762. <https://doi.org/10.1109/TMTT.2010.2100404>
- Moisescu, M.G., Leveque, P., Bertrand, J.-R., Kovacs, E., Mir, L.M., 2008. Microscopic observation of living cells during their exposure to modulated electromagnetic fields. *Bioelectrochemistry* 74, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2007.11.003>
- Momoli, F., Siemiatycki, J., McBride, M.L., Parent, M.-É., Richardson, L., Bedard, D., Platt, R., Vrijheid, M., Cardis, E., Krewski, D., 2017. Probabilistic Multiple-Bias Modeling Applied to the

- Canadian Data From the Interphone Study of Mobile Phone Use and Risk of Glioma, Meningioma, Acoustic Neuroma, and Parotid Gland Tumors. *Am. J. Epidemiol.* 186, 885–893. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx157>
- Moretti, D., Garenne, A., Haro, E., Poullietier de Gannes, F., Lagroye, I., Lévêque, P., Veyret, B., Lewis, N., 2013. In-vitro exposure of neuronal networks to the GSM-1800 signal. *Bioelectromagnetics* 34, 571–8. <https://doi.org/10.1002/bem.21805>
- Muscat, J.E., 2000. Handheld Cellular Telephone Use and Risk of Brain Cancer. *JAMA* 284, 3001. <https://doi.org/10.1001/jama.284.23.3001>
- Nefzi, A., Orlacchio, R., Carr, L., Lemercier, C.E., El Khoueiry, C., Lewis, N., Leveque, P., Arnaud-Cormos, D., 2022. Dosimetry of Microelectrodes Array Chips for Electrophysiological Studies Under Simultaneous Radio Frequency Exposures. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 1–1. <https://doi.org/10.1109/TMTT.2021.3136296>
- Occelli, F., Lameth, J., Adenis, V., Huetz, C., Lévêque, P., Jay, T.M., Edeline, J.-M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.002>
- O'Connor, R.P., Madison, S.D., Leveque, P., Roderick, H.L., Bootman, M.D., 2010. Exposure to GSM RF Fields Does Not Affect Calcium Homeostasis in Human Endothelial Cells, Rat Pheocromocytoma Cells or Rat Hippocampal Neurons. *PLoS ONE* 5, e11828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011828>
- Orlacchio, R., Percherancier, Y., Poullietier De Gannes, F., Hurtier, A., Lagroye, I., Leveque, P., Arnaud-Cormos, D., 2022. In Vivo Functional Ultrasound (fUS) Real-Time Imaging and Dosimetry of Mice Brain Under Radiofrequency Exposure. *Bioelectromagnetics* 43, 257–267. <https://doi.org/10.1002/bem.22403>
- Osmanski, B.-F., Pezet, S., Ricobaraza, A., Lenkei, Z., Tanter, M., 2014. Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nat. Commun.* 5, 5023. <https://doi.org/10.1038/ncomms6023>
- Oster, S., Daus, A.W., Erbes, C., Goldhammer, M., Bochtler, U., Thielemann, C., 2016. Long-term electromagnetic exposure of developing neuronal networks: A flexible experimental setup: Exposure of Developing Neuronal Networks. *Bioelectromagnetics* 37, 264–278. <https://doi.org/10.1002/bem.21974>
- Perentos, N., Croft, R.J., McKenzie, R.J., Cosic, I., 2013. The Alpha Band of the Resting Electroencephalogram Under Pulsed and Continuous Radio Frequency Exposures. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 60, 1702–1710. <https://doi.org/10.1109/TBME.2013.2241059>
- Perrin, A., Souques, M., 2010. Champs électromagnétiques, environnement et santé. Springer Paris, Paris. <https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0133-9>
- Pikov, V., Arakaki, X., Harrington, M., Fraser, S.E., Siegel, P.H., 2010. Modulation of neuronal activity and plasma membrane properties with low-power millimeter waves in organotypic cortical slices. *J. Neural Eng.* 7, 045003. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/7/4/045003>
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., White, L.E., 2011. *Neurosciences*. Groupe De Boeck, Bruxelles.
- Regel, S.J., Achermann, P., 2011. Cognitive Performance Measures in Bioelectromagnetic Research - Critical Evaluation and Recommendations. *Environ. Health* 10, 10. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-10>

- Regel, S.J., Gottselig, J.M., Schuderer, J., Tinguely, G., Rétey, J.V., Kuster, N., Landolt, H.-P., Achermann, P., 2007. Pulsed radio frequency radiation affects cognitive performance and the waking electroencephalogram. *NeuroReport* 18, 803–807. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3280d9435e>
- Romanenko, S., Siegel, P.H., Wagenaar, D.A., Píkov, V., 2014. Effects of millimeter wave irradiation and equivalent thermal heating on the activity of individual neurons in the leech ganglion. *J Neurophysiol* 112, 2423–31. <https://doi.org/10.1152/jn.00357.2014>
- Schüz, J., Jacobsen, R., Olsen, J.H., Boice, J.D., McLaughlin, J.K., Johansen, C., 2006. Cellular Telephone Use and Cancer Risk: Update of a Nationwide Danish Cohort. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1707–1713. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj464>
- Souffi, S., Lameth, J., Gaucher, Q., Arnaud-Cormos, D., Lévêque, P., Edeline, J.-M., Mallat, M., 2022. Exposure to 1800 MHz LTE electromagnetic fields under proinflammatory conditions decreases the response strength and increases the acoustic threshold of auditory cortical neurons. *Sci. Rep.* 12, 4063. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07923-9>
- SSM, 2018. Recent Research on EMF and Health Risk.
- Stafstrom, C.E., Carmant, L., 2015. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a022426–a022426. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022426>
- Stern, S., Margolin, L., Weiss, B., Lu, S.T., Michaelson, S.M., 1979. Microwaves: effect on thermoregulatory behavior in rats. *Science* 206, 1198–1201. <https://doi.org/10.1126/science.505008>
- Streit, J., Tschertner, A., Heuschkel, M.O., Renaud, P., 2001. The generation of rhythmic activity in dissociated cultures of rat spinal cord: Rhythmic activity in dissociated spinal cultures. *Eur. J. Neurosci.* 14, 191–202. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01636.x>
- Taflove, A., Hagness, S.C., 1995. *Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time-Domain Method*, 3rd edition. ed. Artech House, Boston.
- Tattersall, J.E.H., Scott, I.R., Wood, S.J., Nettell, J.J., Bevir, M.K., Wang, Z., Somasiri, N.P., Chen, X., 2001. Effects of low intensity radiofrequency electromagnetic fields on electrical activity in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 904, 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02434-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02434-9)
- Teulon, J., 2004. Le patch-clamp en bref. *médecine/sciences* 20, 550–550. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004205550>
- The Interphone Study Group, 2010. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 39, 675–694. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq079>
- Thomas, C.A., Springer, P., Loeb, G., Berwaldnetter, Y., Okun, L., 1972. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* 74, 61–66. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90481-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90481-8)
- Thuröczy, G., Kubinyi, G., Bodó, M., Bakos, J., Szabó, L.D., 1994. Simultaneous Response of Brain Electrical Activity (EEG) and Cerebral Circulation (REG) to Microwave Exposure in Rats. *Rev. Environ. Health* 10. <https://doi.org/10.1515/REVEH.1994.10.2.135>
- Tiran, E., Ferrier, J., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Pezet, S., Lenkei, Z., Tanter, M., 2017. Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound Med. Biol.* 43, 1679–1689. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011>

- Unterlechner, M., Sauter, C., Schmid, G., Zeitlhofer, J., 2008. No effect of an UMTS mobile phone-like electromagnetic field of 1.97 GHz on human attention and reaction time. *Bioelectromagnetics* 29, 145–153. <https://doi.org/10.1002/bem.20374>
- Van Pelt, J., Corner, M.A., Wolters, P.S., Rutten, W.L.C., Ramakers, G.J.A., 2004a. Longterm stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays. *Neurosci. Lett.* 361, 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.062>
- Van Pelt, J., Wolters, P.S., Corner, M.A., Rutten, W.L.C., Ramakers, G.J.A., 2004b. Long-Term Characterization of Firing Dynamics of Spontaneous Bursts in Cultured Neural Networks. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51, 2051–2062. <https://doi.org/10.1109/TBME.2004.827936>
- Van Rongen, E., Croft, R., Juutilainen, J., Lagroye, I., Miyakoshi, J., Saunders, R., de Seze, R., Tenforde, T., Verschaeve, L., Veyret, B., Xu, Z., 2009. Effects of Radiofrequency Electromagnetic Fields on the Human Nervous System. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 12, 572–597. <https://doi.org/10.1080/10937400903458940>
- Vecchio, F., Babiloni, C., Ferreri, F., Buffo, P., Cibelli, G., Curcio, G., Dijkman, S.V., Melgari, J.-M., Giambattistelli, F., Rossini, P.M., 2010. Mobile phone emission modulates inter-hemispheric functional coupling of EEG alpha rhythms in elderly compared to young subjects. *Clin. Neurophysiol.* 121, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2009.11.002>
- Vecchio, F., Babiloni, C., Ferreri, F., Curcio, G., Fini, R., Del Percio, C., Rossini, P.M., 2007. Mobile phone emission modulates interhemispheric functional coupling of EEG alpha rhythms: Mobile phone emission and EEG rhythms. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1908–1913. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05405.x>
- Vecchio, F., Buffo, P., Sergio, S., Iacoviello, D., Rossini, P.M., Babiloni, C., 2012. Mobile phone emission modulates event-related desynchronization of alpha rhythms and cognitive–motor performance in healthy humans. *Clin. Neurophysiol.* 123, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.06.019>
- Wachtel, H., Seaman, R., Joines, W., 1975. Effects of low-intensity microwaves on isolated neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 247, 46–62. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35982.x>
- Wagenaar, D.A., Pine, J., Potter, S.M., 2006. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci.* 7, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-11>
- Wallace, J., Selmaoui, B., 2019. Effect of mobile phone radiofrequency signal on the alpha rhythm of human waking EEG: A review. *Environ. Res.* 175, 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.05.016>
- Wallace, J., Yahia-Cherif, L., Gitton, C., Hugueville, L., Lemaréchal, J.-D., Selmaoui, B., 2022. Human resting-state EEG and radiofrequency GSM mobile phone exposure: the impact of the individual alpha frequency. *Int. J. Radiat. Biol.* 98, 986–995. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.2009146>
- Xu, S., Ning, W., Xu, Z., Zhou, S., Chiang, H., Luo, J., 2006. Chronic exposure to GSM 1800-MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 398, 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.004>
- Yaghmazadeh, O., Vöröslakos, M., Alon, L., Carluccio, G., Collins, C., Sodickson, D.K., Buzsáki, G., 2022. Neuronal activity under transcranial radio-frequency stimulation in metal-free rodent brains in-vivo. *Commun. Eng.* 1, 15. <https://doi.org/10.1038/s44172-022-00014-7>

Yang, L., Chen, Q., Lv, B., Wu, T., 2017. Long-Term Evolution Electromagnetic Fields Exposure Modulates the Resting State EEG on Alpha and Beta Bands. *Clin. EEG Neurosci.* 48, 168–175. <https://doi.org/10.1177/1550059416644887>

Yarmolenko, P.S., Moon, E.J., Landon, C., Manzoor, A., Hochman, D.W., Viglianti, B.L., Dewhirst, M.W., 2011. Thresholds for thermal damage to normal tissues: An update. *Int. J. Hyperthermia* 27, 320–343. <https://doi.org/10.3109/02656736.2010.53452>

Titre : Effets des signaux RF environnementaux de cinquième génération, sur l'activité électrique des neurones en culture.

Résumé : À l'heure où les transformations numériques irriguent nos sociétés, où les équipements et les usages sont devenus connectés, la population est toujours plus exposée aux ondes radiofréquences (RF). Ces ondes électromagnétiques émises par les appareils sans fil tels que les téléphones mobiles, les antennes relais, les équipements Wi-Fi et bien d'autres, font désormais partie de notre vie quotidienne. Depuis plusieurs décennies, les effets potentiels des signaux RF sur les systèmes biologiques sont un sujet de préoccupation important. Jusqu'à présent, le seul effet biologique identifié et expliqué de l'exposition aux RF est l'échauffement des tissus vivants. Afin de protéger les populations des effets thermiques indésirables, des limites d'exposition ont été établies, limites généralement exprimées en termes de Débit d'Absorption Spécifique (DAS, W/kg) représentant la puissance électromagnétique absorbée par unité de masse.

La recherche est aujourd'hui tournée vers l'exploration d'effets biologiques non-thermiques, en particulier sur le système nerveux central (SNC). En effet, le SNC pourrait être l'une des cibles principales de l'exposition aux RF en raison de la proximité entre le téléphone portable et le cerveau pendant les appels téléphoniques ainsi que de la nature excitable des neurones.

Récemment, la cinquième génération (5G) de téléphonie mobile a été conçue pour améliorer la quatrième génération (4G), en offrant notamment des débits plus élevés. Pour ne pas engorger les réseaux actuels qui arrivent déjà à saturation, deux nouvelles bandes de fréquences ont été allouées à la technologie 5G : la bande à 3,5 GHz est en cours de déploiement et celle à 26 GHz le sera ultérieurement. Dans ce contexte, mon projet de thèse vise à évaluer l'impact des nouveaux signaux 5G à 3,5 GHz sur l'activité électrique de neurones en culture.

Notre approche repose sur l'utilisation d'un banc expérimental combinant électrophysiologie et exposition aux RF. Pour réaliser des mesures en temps réel de l'activité neuronale, des cultures primaires de neurones de rat ont été réalisées sur des matrices de microélectrodes (MEA). Ces MEAs ont ensuite été placées dans un système d'exposition, plus précisément dans une cellule transverse électromagnétique (TEM), afin d'exposer de façon uniforme les neurones aux signaux 5G à 3,5 GHz.

À des valeurs de DAS proches des normes environnementales (1 et 3 W/kg), fixées à 2 W/kg pour une exposition locale de la tête, nous n'apportons aucune preuve significative que l'exposition à des signaux 5G affecte l'activité électrique des neurones *in vitro*. En revanche, à des niveaux de DAS élevés (28 W/kg) et par conséquent bien au-delà des normes, nous observons une inhibition de l'activité électrique des neurones, principalement sur le nombre moyen de bursts. Cette exposition à fort DAS s'accompagnant d'une élévation de température mesurable, les cultures de neurones ont également été soumises à un échauffement équivalent par chauffage direct. La discussion met en avant les différences et similitudes des effets induits par l'exposition RF ou le chauffage direct, afin de cerner l'éventuelle part thermique de l'effet inhibiteur des RF à forte puissance d'exposition.

Mots clés : Radiofréquences ; 5G-3,5 GHz ; Réseaux de neurones ; *In Vitro* ; MEA ; Activité électrique.

Title : Effects of 5G environmental RF signals on the electrical activity of neurons in culture.

Abstract : With rapid technological advances, the population is increasingly exposed to radiofrequency (RF) electromagnetic fields (EMF). These electromagnetic waves, emitted by wireless devices such as mobile phones, relay antennas, Wi-Fi equipment, and many others, have become an integral part of our daily lives. The potential effects of these RF-EMF radiations on human health have raised concerns for the last two decades. So far, the only established effects of RF fields are related to the heating of biological tissues. To protect people against these adverse thermal effects, exposure limits have been established for wireless communications devices. These limits are expressed in terms of Specific Absorption Rate (SAR, W/kg).

Research is now focused on exploring non-thermal biological effects, especially on the central nervous system (CNS). Indeed, the CNS could be one of the primary targets of RF exposure due to the proximity between the mobile phone and the brain during phone calls, as well as the excitable nature of neurons.

Recently, the fifth generation (5G) of wireless communication was designed to improve on the fourth generation (4G) by offering higher data rates. To avoid network saturation, two new frequency bands have been attributed to 5G technology: the 3.5 GHz band is currently being deployed, and the 26 GHz band will be deployed in the future. In this context, my thesis project aims to evaluate the impact of the new 5G signals at 3.5 GHz on the electrical activity of cultured neurons.

Our approach relies on the proven use of an experimental bench coupling electrophysiology and RF exposure. To measure neuronal activity in real-time, primary rat neuron cultures are performed on microelectrode arrays (MEA). These MEAs are then placed in an exposure system, which is an open transverse electromagnetic (TEM) cell, to allow uniform exposure to the 5G signals.

At SAR values close to environmental standards (1 and 3 W/kg), which are set at 2 W/kg for localized head exposure, we found no significant evidence that exposure to 5G signals affects the electrical activity of neurons *in vitro*. However, at high SAR levels (28 W/kg), well above the guidelines, we observed an inhibition of neuronal electrical activity, mainly on the average number of bursts. Exposure to high SAR was associated with an increase in temperature. The neuronal cultures were therefore also subjected to an equivalent temperature rise through direct heating. The discussion highlights the differences and similarities in the effects induced by RF exposure or by direct heating, in order to identify the possible thermal part of the inhibitory effect of RF at high levels of exposure.

Keywords : Radiofrequency fields ; 5G-3.5 GHz ; Neuronal networks ; *In Vitro* ; MEA ; Electrical activity.