



HAL
open science

**EFFETS NON THERMIQUES DES CHAMPS DE
RADIOFREQUENCES SUR LE SYSTEME NERVEUX
CENTRAL : ETUDE MULTIPARAMETRIQUE
REALISEE SUR LE RAT VIGILE**

David Crouzier

► **To cite this version:**

David Crouzier. EFFETS NON THERMIQUES DES CHAMPS DE RADIOFREQUENCES SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL : ETUDE MULTIPARAMETRIQUE REALISEE SUR LE RAT VIGILE. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00012197

HAL Id: tel-00012197

<https://theses.hal.science/tel-00012197>

Submitted on 3 May 2006

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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

THÈSE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

DISCIPLINE : TOXICOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

DAVID CROUZIER

Le 26 avril 2006

**EFFETS NON THERMIQUES DES CHAMPS DE
RADIOFREQUENCES SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL :
ETUDE MULTIPARAMETRIQUE REALISEE SUR LE RAT VIGILE**

DIRECTEURS DE THESE : DR GUY TESTYLIER
PR JEAN-CLAUDE DEBOUZY

MEMBRES DU JURY : DR MARIE-PIERRE ROLS (RAPPORTEUR)
DR GUY CHOUVET (RAPPORTEUR)
DR RENE MALABIAU
PR JEAN-CLAUDE DEBOUZY
DR GUY TESTYLIER

*THESE PREPAREE AU SEIN DE L'UNITE DE BIOPHYSIQUE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
CENTRE DE RECHERCHE DU SERVICE DE SANTE DES ARMEES (CRSSA)*

A Isabelle
A mes parents

Remerciements

Je remercie particulièrement,

Mme Marie Pierre Rols et Mr Guy Chouvet d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et d'en être rapporteur.

Mr René Malabiau pour avoir bien voulu participer au jury de cette thèse.

L'ensemble de ce travail a bénéficié du soutien financier de la DGA au titre du PEA 010806.

Pour ces trois ans de travail,

Je tiens à remercier en premier lieu Monsieur le professeur Jean-Claude Debouzy, qui outre un directeur de laboratoire aux grandes qualités scientifiques ainsi qu'une aide précieuse dans le domaine de la RMN, est devenu avant tout un ami, de quasi constante bonne humeur, et un véritable guide dont j'ai scientifiquement et humainement beaucoup appris.

Mes remerciements vont également à Guy Testylier qui a bien voulu diriger cette thèse, et dont l'aide a été précieuse au cours des différentes mises au point mais également durant les phases de rédaction (particulièrement en anglais). Je tiens également à le remercier pour m'avoir laissé libre et autonome dans cette étude toute en m'apportant son expérience indispensable dans les moments délicats.

Merci à Florence Fauvelle d'avoir accepté de mettre au point, d'entreprendre et de réaliser les expérimentations en RMN HR-MAS.

Merci à Fred qui m'a suivi durant les deux ans de sa formation et dont l'aide m'a été précieuse durant les expérimentations.

Ces remerciements s'adressent également à Dominique Baubichon qui m'a apporté ses compétences techniques et conseils au début de la phase expérimentale.

Un grand merci à tout le reste de l'équipe de biophysique Vincent, Christine, Yannick et Anne dont la présence à toujours été agréable et encourageante.

Merci à mes proches et amis (surtout Laurent et Séverine) d'avoir été présent durant ces trois ans et un exutoire toujours efficace aux problèmes scientifiques.

Enfin merci à mes parents, Annie et Philippe, de m'avoir donné la chance et la possibilité de réaliser ce travail.

Et merci Isa de ton soutien perpétuel, de ta bienveillance et de toujours être présente pour moi.

Résumé

De nombreuses craintes sont aujourd'hui formulées quant à l'innocuité des champs de radiofréquences sur la santé. Parmi celles-ci des perturbations de la neurophysiologie et plus spécifiquement du système cholinergique central ont été évoquées.

Un modèle d'étude multiparamétrique a été développé chez le rat vigile présentant à la fois un aspect électrophysiologique, neurochimique obtenu par microdialyse, comportemental par quantification des états de vigilance et thermophysiological par le suivi de la température corporelle.

Lors de l'exposition à un champ électromagnétique de 1,8 GHz ou 2,45 GHz pour des puissances athermiques, aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence sur la neurophysiologie. Parallèlement à cette étude, une étude de la composition lipidique du tissu cérébral et une étude de ses métabolites ont été réalisées par spectroscopie RMN. Ces études également n'ont pas montré d'effets des ondes électromagnétiques.

Mots clés : micro-ondes ; acétylcholine ; rythme thêta ; cycles circadiens ; GSM; cerveau

Abstract

Deleterious effects on healthcare and particularly disruption of the cholinergic system have been reported after exposure to radiofrequency field at low power density.

This work present a multiparametric study of freely moving rat where neurophysiology was investigated using a neurochemical (by microdialysis technique), electrophysiological, behavioral (by vigilance stages quantification) and thermophysiological approaches.

No neurophysiological effect has been noticed after electromagnetic exposure at 1,8 GHz and 2,45 GHz frequencies and for low power (no thermic level) density. Similarly complementary studies of metabolic and lipidic composition of brain tissue was performed using NMR spectrometry and failed studies by NMR and failed to show any significant effect.

Keywords : microwaves ; acetylcholine ; Theta rhythm; circadian cycle ; GSM; brain

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE _____ 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE _____ 6

CHAPITRE 1: LE SYSTEME CHOLINERGIQUE CENTRAL 7

1.1. L'ACETYLCHOLINE.....	7
1.2. LA NEUROTRANSMISSION CHOLINERGIQUE.....	10
1.2.1. Synthèse de l'ACh.....	10
1.2.2. Stockage de l'ACh.....	11
1.2.3. Libération de l'ACh.....	12
1.2.4. Fixation de l'ACh sur ses récepteurs.....	13
1.2.4.1. Les récepteurs nicotiniques.....	13
A. Structure.....	13
B. Mode d'action.....	14
C. Localisation et fonction des nAChR.....	15
1.2.4.2. Les récepteurs muscariniques.....	15
A. Structure.....	15
B. Mode d'action.....	16
C. Localisation et fonction des mAChR.....	18
1.2.4.3. Tableau comparatif des nAChR et mAChR.....	19
1.2.5. Dégradation de l'ACh.....	20
A. Structure et localisation de l'AChE.....	20
B. Propriétés catalytiques de l'AChE.....	21
1.2.6. Schéma récapitulatif de la transmission cholinergique.....	22
1.3. NEUROANATOMIE FONCTIONNELLE.....	23
1.3.1. Les différents groupes de cellules cholinergiques.....	23
1.3.2. Le voie septo-hippocampique.....	25
1.3.2.1. Composition.....	25
1.3.2.2. Voie septo-hippocampique et mémoire.....	25
1.3.2.3. Voie septo-hippocampique et rythme thêta.....	26
1.3.3. Le complexe pontomésencéphalotegmental.....	26

CHAPITRE 2: LES ONDES ELECTROMAGNETIQUES NON IONISANTES 27

2.1. LES CHAMPS HYPERFREQUENCES.....	27
2.1.1. Définition.....	27

2.1.2. Bases physiques des champs électromagnétiques	28
2.1.2.1. Rappel des unités et constantes physiques	28
2.1.2.2. Fréquence et longueur d'onde	29
2.1.2.3. Intensité et puissance	30
2.2. INTERACTIONS DES CHAMPS HYPERFREQUENCES AVEC LES SYSTEMES	
BIOLOGIQUES.....	32
2.2.1. Pénétration des ondes HF dans un système biologique.....	32
2.2.2. Effets biologiques	33
2.2.2.1. Les effets thermiques	34
2.2.2.2. Les effets non thermiques	34
2.2.2.3. Les effets indirects	35
2.3. DOSIMETRIE	36
2.3.1. Notion de champ lointain	36
2.3.2. Débit d'absorption spécifique	37
2.3.2.1. Formulation théorique.....	37
2.3.2.2. Evaluation du débit d'absorption spécifique	39
A. <i>Technique numérique</i>	39
B. <i>Technique expérimentale</i>	40
2.3.3. Normes d'exposition aux champs hyperfréquences	40

CHAPITRE 3: LES EFFETS SPECIFIQUES DES ONDES ELECTROMAGNETIQUES NON IONISANTES SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....43

3.1. ETUDES REALISEES CHEZ L'HOMME.....	43
3.1.1. Effets sur l'électroencéphalogramme et sur le sommeil.....	43
3.1.2. Effets sur le comportement et la cognition	46
3.2. ETUDES REALISEES CHEZ L'ANIMAL	49
3.2.1. Effets sur l'électroencéphalogramme.....	49
3.2.2. Effets sur la mémoire et le comportement	50
3.2.3. Effets sur la barrière hémato encéphalique	52
3.2.4. Effets sur la neurochimie	53

METHODOLOGIE 55

CHAPITRE 1: ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE	56
1.1. MODELE ANIMAL.....	56
1.2. CHIRURGIE	56
1.3. MONITORAGE DES ANIMAUX	59

1.3.1. Mise en place des animaux.....	59
1.3.2. Enregistrement et analyse de l'EEG et de l'EMG	60
1.3.3. Analyse de la vigilance	62
1.3.4. Mesure de la température	64
1.3.5. Mesure de la concentration d'acétylcholine	65
1.3.5.1. Microdialyse	65
1.3.5.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	67
1.4. FIN DE L'EXPERIMENTATION.....	69
1.4.1. Prélèvement pour analyse histologique	69
1.4.2. Prélèvement de structures cérébrales et dosage de l'activité acétylcholinésterasique .	70
1.4.3. Prélèvement de structures cérébrales en vue d'analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN)	71
1.5. STATISTIQUES.....	72

CHAPITRE 2: ANALYSE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN).....73

2.1. RMN LIQUIDE HAUTE RESOLUTION.....	73
2.1.1. RMN du proton ¹ H	73
2.1.2. RMN du carbone ¹³ C	75
2.1.3. RMN de l'azote ¹⁴ N.....	77
2.1.4. RMN du phosphore ³¹ P	78
2.2. RMN HR-MAS (¹ H)	79

CHAPITRE 3: EXPOSITIONS MICRO-ONDES ET DOSIMETRIE81

3.1. EXPOSITIONS.....	81
3.1.1. Conditions d'expositions.....	81
3.1.2. Système d'exposition.....	82
3.1.2.1. Chambre anéchoïque	82
3.1.2.2. Sources micro-ondes.....	83
3.1.2.3. Système de pilotage.....	84
3.2. DOSIMETRIE	85
3.2.1. Cartes de champs	85
3.2.1.1. Cartes de champs réalisées par mesures directes.....	85
3.2.1.2. Cartes de champs réalisées par simulation numérique.....	89
3.2.2. Débit d'absorption spécifique	93

CHAPITRE 1: RYTHMES CIRCADIENS ET CORRELATIONS ENTRE PARAMETRES..... 100

1.1. INFLUENCE D'UN ANTICHOLINESTERASIQUE SUR LES PARAMETRES EEG ET LA VIGILANCE	101
1.1.1. Contexte de l'étude.....	101
1.1.2. Contexte expérimental spécifique	102
1.1.2.1. Animaux	102
1.1.2.2. Procédure.....	102
1.1.3. Résultats de l'étude	103
1.2. CYCLES ET CORRELATIONS.....	132
1.2.1. Contexte de l'étude.....	132
1.2.2. Contexte expérimental spécifique	133
1.2.2.1. Procédure.....	133
1.2.2.2. Paramètres EEG spécifiques.....	134
1.2.3. Résultats de l'étude	134
1.2.3.1. Rythmes et corrélations.....	134
1.2.3.2. Résultats et discussion complémentaires	163
1.3. CONCLUSION	172

CHAPITRE 2: EFFETS NEUROPHYSIOLOGIQUES SPECIFIQUES DES CHAMPS DE RADIOFREQUENCES A 1,8 GHz et 2,45 GHz. 173

2.1. INTRODUCTION.....	173
2.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL SPECIFIQUE	175
2.3. ETAT GENERAL DES ANIMAUX.....	176
2.3.1. Comportement.....	176
2.3.2. Suivi du poids	177
2.3.3. Température	179
2.4. PARAMETRES NEUROPHYSIOLOGIQUES.....	182
2.4.1. Analyse spectrale des EEG.....	182
2.4.1.1. Energie relative dans la bande delta.....	182
2.4.1.2. Energie relative dans la bande thêta.....	184
2.4.2. Analyse de la vigilance	186
2.4.2.1. Eveil	186
2.4.2.2. Sommeil paradoxal.....	188
2.4.3. Sécrétion d'acétylcholine.....	190
2.4.4. Discussion	192

2.4.4.1. Considération dosimétrique	193
2.4.4.2. Effets sur le système cholinergique	194
2.4.4.3. Limites de l'étude	197
2.5. DONNEES RMN	198
2.5.1. Analyse de la constitution lipidique par RMN liquide haute résolution.....	198
2.5.1.1. RMN du proton ¹ H.....	198
2.5.1.2. RMN du ¹³ C.....	200
2.5.1.3. RMN du ¹⁴ N.....	201
2.5.2. RMN HR-MAS (¹ H).....	202
2.5.3. Discussion	204

CONCLUSION GENERALE _____ 206

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____ 210

Liste des Abréviations

ACh	: Acétylcholine
AChE	: Acétylcholinestérase
Acétyl CoA	: Acétylcoenzyme A
BHE	: Barrière hémato encéphalique
ChAT	: Choline acétyltransférase
CLHP	: Chromatographie liquide haute performance
DAS	: Débit d'absorption spécifique
DAG	: Diacylglycerol
DSP	: Densité surfacique de puissance
EEG	: Electroencéphalogramme
EMG	: Electromyogramme
ERG	: Electrorétinogramme
FDTD	: Finite difference time domain
GABA	: Acide gamma aminobutyrique
GDP	: Guanosine di phosphate
GPC	: Glycérophosphocholine
GSM	: Global system for mobiles
GTP	: Guanosine tri phosphate
HF	: Hyperfréquences
ICNIRP	: l'International Commission of Non-Ionizing Radiation Protection
mAChR	: Récepteur cholinergique de type muscarinique
NAA	: N-Acétyl Aspartate
nAChR	: Récepteur cholinergique de type nicotinique
PA	: Potentiel d'action
PC	: Phosphatidyl choline
PE	: Phosphatidyl éthanolamine
PEPL	: Phosphatidyl éthanolamine plasmalogène
PI	: Phosphatidyl inositol
PKA	: Protéine kinase A
PKC	: Protéine kinase C
PL	: Phospholipide totaux

PLC : Phospholipase C
PS : Phosphatidyl serine
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SAR : Specific absorption rate
SM : Sphingomyéline
SNC : Système nerveux central
VACHT : Vesicular-acetylcholin-transporter

INTRODUCTION GENERALE

Les sources électromagnétiques et plus particulièrement les champs hyperfréquences (HF) ou micro-ondes, dont les fréquences se situent dans la gamme 300 MHz - 300 GHz, sont devenues omniprésentes dans les sociétés industrielles actuelles.

Initialement réservées à de rares utilisations militaires après la guerre (détection Radar et communication essentiellement), l'utilisation des champs micro-ondes s'est peu à peu étendue pour gagner progressivement l'industrie (chauffage industriel, soudure...), le milieu médical (diathermie), les foyers (four à micro-ondes), et récemment la communication individuelle avec l'avènement de « l'ère sans fil » matérialisée par le succès des téléphones portables GSM (Global System for Mobiles). Aujourd'hui, l'International Telephone Union, estime qu'un milliard et demi de personnes sont équipées d'un téléphone portable dans le monde, dont 45 millions en France. Cette progression sans précédent du nombre et de la diversité des sources électromagnétiques continue de s'amplifier avec l'essor de nouvelles technologies telles que le Wi-fi ou le Bluetooth, technologies qui permettent les échanges de données à courte distance au moyen de champs HF à 2,45 GHz. La bande de fréquence HF est donc de plus en plus encombrée en fréquence et en puissance émise.

Ce développement a entraîné directement une augmentation du nombre de personnes exposées, du temps d'exposition moyen, de la gamme de fréquences subie et globalement de la quantité de rayonnements absorbés. L'existence d'un faible risque pour la santé au niveau individuel pourrait alors se traduire par des conséquences non négligeables au niveau d'une population.

De nombreuses interrogations sont donc nées quant à l'innocuité de ces technologies. Cette question est devenue un réel problème de santé publique et inscrit maintenant les ondes électromagnétiques comme un élément potentiellement toxique.

Les pouvoirs publics se sont intéressés très tôt aux effets des ondes électromagnétiques non ionisantes sur les systèmes biologiques. Les premières études furent menées par des centres de recherches militaires dès la deuxième guerre mondiale. Le but de ces travaux était alors d'évaluer les risques encourus par les personnels et en particulier par les radaristes. Les premiers effets biologiques

délétères furent identifiés pour des hauts niveaux d'énergie induisant une augmentation de température, ou la production de courants de décharge responsables de chocs électriques. Par la suite des perturbations de l'électroencéphalogramme (EEG), de l'électrorétinogramme (ERG) et de l'électromyogramme (EMG) furent également identifiées, mais toujours suite à une élévation de température, locale ou généralisée.

Ces premiers résultats ont été utilisés comme référence pour la création des niveaux limites d'exposition en dessous desquels aucun effet délétère ne devait être observé.

Cependant à ce jour, avec l'augmentation du nombre de personnes soumises à des expositions aux ondes électromagnétiques, le nombre de plaintes et de symptômes ressentis s'est également multiplié. Il est donc envisageable que les limites d'exposition initialement exprimées soient inadaptées aujourd'hui. De nombreuses publications rapportent la survenue d'une grande variété d'effets potentiellement délétères pour des puissances bien inférieures à celle préconisées par les normes (Santini *et al.*, 2001, 2002, 2003). Ces effets porteraient notamment sur l'incidence potentielle de cancers (Balcer-Kubiczek et Harrison, 1985), de leucémies (Szmigielski, 1996), de perturbations endocriniennes, immunologiques (Betti *et al.*, 2004), des atteintes de la barrière hémato encéphalique (Williams *et al.*, 1984b; Williams *et al.*, 1984d; Williams *et al.*, 1984c; Williams *et al.*, 1984a), mais aussi sur des perturbations neurologiques subjectives telles que des maux de tête, des difficultés de concentration ou des perturbations du sommeil (Santini *et al.*, 2002). Ces perturbations neurologiques peuvent être rattachées à d'autres travaux mettant en évidence des perturbations neurochimiques spécifiques du système cholinergique (Lai, 1992).

L'acétylcholine est un neuromédiateur possédant un rôle important dans le contrôle de l'excitabilité cérébrale. La sécrétion d'acétylcholine est indispensable à l'activation et au maintien de l'éveil, et est impliquée dans la survenue du sommeil paradoxal ; elle permet la plasticité neuronale et contribue au phénomène de mémorisation. La génération de certains rythmes électroencéphalographiques est également sous contrôle cholinergique, comme le rythme thêta (4-9 Hz) hippocampique.

Etant donné l'importance du système cholinergique dans le fonctionnement du système nerveux central, les conséquences de l'exposition aux ondes électromagnétiques apparaît donc comme un point important à approfondir.

De nombreux travaux ont été récemment réalisés à des niveaux de puissances non thermiques. Ces différentes études sont cependant souvent confuses et non reproductibles. Pour certaines, il ressort des perturbations de l'électroencéphalogramme, ainsi que des perturbations significatives de la mémoire temporo-spatiale. Parallèlement de nombreuses études ont obtenu des résultats négatifs, et la réplication de certaines dans les mêmes conditions expérimentales n'ont pas confirmé les résultats préalablement obtenus. Face à ces données contradictoires, il est donc nécessaire de conduire de nouvelles investigations et de tenter de confirmer ou d'infirmer l'action spécifique des ondes électromagnétiques non ionisantes à des niveaux non thermiques.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'existence d'effets neurologiques liés à une exposition de radiations électromagnétiques non ionisantes à des puissances inférieures ou égales aux limites d'exposition légalement admises. Pour cela nous avons mené durant trois jours une approche multiparamétrique chez le rat vigile. Cette approche s'est faite d'un point de vue neurochimique par une technique de microdialyse « en ligne », d'un point de vue électrophysiologique avec le suivi de l'électroencéphalogramme et de l'électromyogramme, d'un point de vue comportementale par le suivi de la vigilance et d'un point de vue thermophysiological par le suivi de la température. Finalement, l'impact des ondes électromagnétiques sur le système nerveux central a été apprécié au travers d'une étude de ses métabolites par RMN HR-MAS et d'une étude de sa composition membranaire par RMN sur des extraits lipidiques.

La première partie de cette thèse sera consacrée à des rappels sur le système cholinergique et les ondes électromagnétiques. Une revue bibliographique sur les effets des ondes électromagnétiques, à puissance non thermique, sur le système nerveux central sera ensuite réalisée.

Après l'exposé des méthodes utilisées, le travail expérimental sera présenté en deux parties.

Dans la première nous nous sommes consacrés exclusivement à l'étude des cycles circadiens des paramètres étudiés. Nous avons cherché à explorer les corrélations existant entre les différents éléments mesurés, et à observer comment les fluctuations de la sécrétion d'acétylcholine pouvaient se refléter sur le rythme thêta, la vigilance et la température.

La deuxième partie a traité de l'étude des modifications des paramètres observés sur des animaux exposés aux rayonnements électromagnétiques non ionisants durant 24 heures. Dans cette étude, deux fréquences ont été utilisées à deux puissances différentes, un rayonnement 1800 MHz aux normes d'exposition grand public et à un niveau 5 fois inférieur, et un rayonnement à 2450 MHz à la norme grand public et à la norme en environnement contrôlé.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Le système cholinergique central

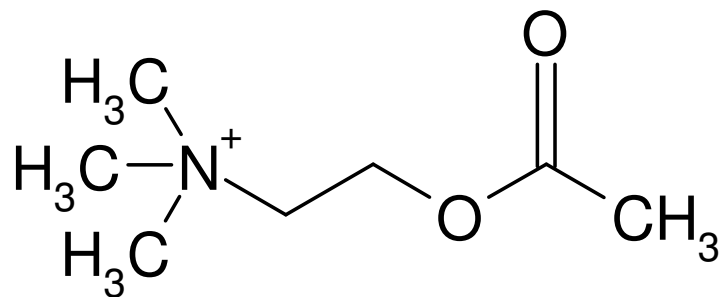
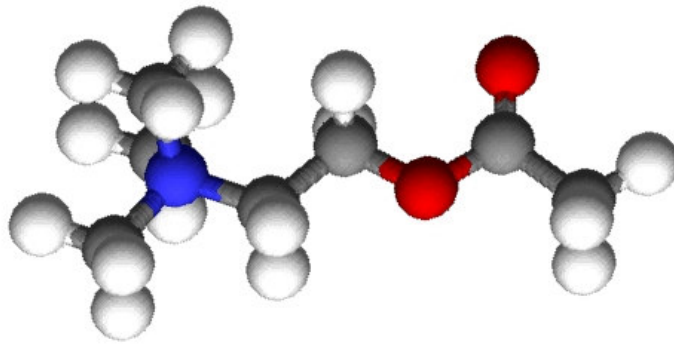
Chapitre 2 : Les ondes électromagnétiques non ionisantes

Chapitre 3 : Les effets spécifiques des ondes électromagnétiques non ionisantes sur le système nerveux central

CHAPITRE 1: LE SYSTEME CHOLINERGIQUE CENTRAL

1.1. L'ACÉTYLCHOLINE

L'acétylcholine (ACh), neuromédiateur du système cholinergique central, est le premier médiateur à avoir été découvert et identifié comme tel. C'est un ester aminé d'un poids moléculaire de 146 g/mole.



Structure de l'acétylcholine (représentation tridimensionnelle et formule développée)

Isolée en 1914 par Henry Dale, ses premières fonctions furent établies en 1921 par Otto Loewi. Dans ses travaux, Loewi démontra que la transmission entre le cœur et le nerf vague se faisait par l'intermédiaire d'une substance chimique qui pouvait ralentir les battements cardiaques. Ces travaux mirent en évidence pour la première fois la transmission nerveuse au moyen d'un messenger chimique.

Par la suite, Loewi identifia l'ACh comme le transmetteur de l'influx nerveux au niveau de la plaque motrice des muscles striés chez les vertébrés.

Ces études conduirent Dale et Loewi à l'obtention du prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1936 pour leurs travaux sur la transmission chimique de l'influx nerveux.

L'ACh a depuis été identifiée comme un neurotransmetteur présent au sein de nombreuses synapses et ceci de manière universelle aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Elle intervient au niveau du système nerveux central (SNC), du système nerveux autonome et de la transmission neuromusculaire.

Au niveau de la terminaison neuromusculaire, il s'agit du seul neurotransmetteur présent ; c'est le seul médiateur agissant au niveau du système nerveux somatique, responsable de la contraction musculaire.

Concernant le système nerveux autonome, l'ACh est présente aussi bien au sein du système sympathique que parasympathique. C'est le médiateur des neurones pré-ganglionnaires des deux systèmes et des neurones post ganglionnaires du système parasympathique. L'ACh aura donc un rôle au niveau des organes innervés par le système autonome. Ce rôle varie d'un organe à l'autre : ainsi au niveau cardiovasculaire, un effet vasodilatateur, bradycardisant et ionotrope négatif est observé. Au niveau du tractus gastro intestinal, elle induit une augmentation du péristaltisme et une augmentation de l'amplitude des contractions. L'ACh induit également au niveau urinaire une augmentation du tonus lisse responsable d'une baisse de la capacité et d'une augmentation de la pression vésicale. Elle agit également au niveau pulmonaire et stimule les sécrétions de toutes les glandes recevant des afférences parasympathiques.

L'ACh est présente dans de nombreuses structures du système nerveux central. Elle possède des rôles essentiellement activateurs tel que le maintien de l'éveil (Marrosu *et al.*, 1995), de l'attention, la mémorisation (Yamamura *et al.*, 1974; Butt *et al.*, 1997), la plasticité neuronale (Dykes, 1992). Elle agit également au niveau

de la thermorégulation où elle induit une diminution de la température corporelle (Birendra et Melvi, 1997).

1.2. LA NEUROTRANSMISSION CHOLINERGIQUE

L'ACh comme tout neuromédiateur permet la transmission de l'influx nerveux sous forme de médiateur chimique au niveau d'une synapse. La neurotransmission cholinergique peut être divisée en plusieurs étapes :

- Synthèse de l'ACh
- Stockage de l'ACh
- Libération de l'ACh dans la fente synaptique
- Fixation de l'ACh sur un récepteur synaptique
- Dégradation de l'ACh

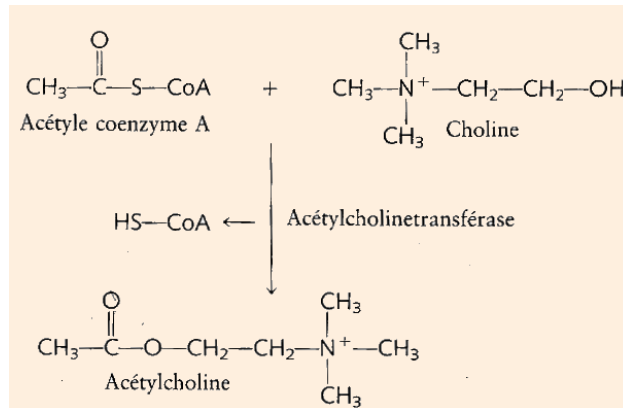
1.2.1. SYNTHÈSE DE L'ACh

L'ACh est synthétisée dans les terminaisons axonales à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A (Acétyl CoA).

L'Acétyl CoA est présent dans les mitochondries ; il provient de la dégradation du glucose en pyruvate, lui-même dégradé en Acétyl CoA par une enzyme mitochondriale, la pyruvate deshydrogénase.

La choline est captée par un mécanisme de transport actif Na^+ dépendant à haute affinité, saturable, et localisé spécifiquement au niveau des terminaisons axonales cholinergiques. Cette capture est proportionnelle à la synthèse d'ACh et représente l'étape limitante de sa vitesse de synthèse (Breer et Knipper, 1990; Gyls et Jenden, 1996). A côté de ce transport, il existe également un système de transport à faible affinité peu actif. La présence de choline dans le milieu extracellulaire est due à la dégradation de l'acétylcholine précédemment libérée et à l'apport de choline par le sang (dégradation des phospholipides membranaires, alimentation).

La réaction de synthèse de l'ACh est catalysée par la choline acétyltransférase (ChAT). Cette enzyme, présente uniquement dans les neurones cholinergiques, est une enzyme cytoplasmique synthétisée dans le corps cellulaire puis apportée jusqu'aux terminaisons axonales par le transport axonal antérograde. Sa vitesse d'action varie en fonction du tissu étudié, elle est d'environ 1 nmole/s/g pour le cortex.



Synthèse de l'acétylcholine

1.2.2. STOCKAGE DE L'ACH

L'acétylcholine, synthétisée dans le cytoplasme des terminaisons axonales est transportée activement dans des vésicules synaptiques où elle est stockée. Les vésicules sont préalablement formées au niveau de puits à clathrine de la membrane de l'axone. Le transport au sein des vésicules se fait grâce à un transporteur présent à la surface des membranes des vésicules, les vesicular-acetylcholin-transporters (VACHT). Les VACHT sont des transporteurs de type antiport, ils fonctionnent en utilisant l'énergie d'un gradient de protons H⁺ établi par le transport actif d'ions H⁺ du cytoplasme vers l'intérieur des vésicules par une pompe H⁺/ATPase (Anderson *et al.*, 1982). En plus de l'ACh, les vésicules incorporent de l'ATP, du GTP, un protéoglycane et du Ca²⁺. Les vésicules ayant incorporé le neuromédiateur (environ 4000 molécules d'ACh) se fixent à des protéines à la face interne de la terminaison présynaptiques dans l'attente de libérer leur contenu.

Dans les terminaisons axonales, l'acétylcholine est présente dans les vésicules et dans le cytoplasme, ces deux compartiments étant en équilibre l'un avec l'autre.

De plus il existe 2 compartiments vésiculaires distincts d'ACh, l'un dit "fonctionnel" contient le neurotransmetteur néosynthétisé pour la libération, et l'autre, "de réserve", est disponible en cas de sollicitations intenses.

1.2.3. LIBERATION DE L'ACH

L'ACh stockée au niveau de la partie pré-synaptique sera libérée dans la fente synaptique après la survenue d'un potentiel d'action (PA) excitateur. L'ACh libérée provient majoritairement du compartiment vésiculaire bien qu'il existe également une libération de l'ACh du compartiment cytoplasmique.

Le PA, responsable de la dépolarisation de la membrane de l'axone, provoque l'ouverture des canaux calciques « voltage-dépendants » situés au niveau du bouton terminal de l'axone.

Pour le compartiment vésiculaire, l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire provoque la fusion des vésicules avec la membrane cellulaire et ainsi l'exocytose de l'ACh (Katz et Miledi, 1967).

Pour le compartiment cytoplasmique, le calcium agirait sur des canaux spécifiques les médiatophores qui commandent le passage de l'ACh (Israel et Manaranche, 1985), (Tauc, 1982).

Le relargage d'ACh peut cependant être modulé par différents systèmes. Il existe un rétrocontrôle négatif basé sur la fixation de l'ACh libérée au niveau d'auto récepteurs pré synaptiques induisant une baisse de l'excitabilité. Il existe également un contrôle par le biais d'autres neurotransmetteurs se fixant sur leur récepteur à la surface des neurones cholinergiques. Ces neurotransmetteurs, qui ont un effet inhibiteur sur la sécrétion d'acétylcholine sont la dopamine, la noradrénaline, la sérotonine et l'acide gamma aminobutyrique (GABA).

1.2.4. FIXATION DE L'ACH SUR SES RECEPTEURS

Une fois libérée, l'acétylcholine peut se fixer sur 2 types de récepteurs, soit les récepteurs nicotiques (nAChR) soit les récepteurs muscariniques (mAChR). Les récepteurs nicotiques et muscariniques sont quelquefois présents au niveau d'une même synapse (synapse entre le neurone connecteur et le neurone effecteur du système nerveux végétatif) (Fossier *et al.*, 1988) ou bien sont indépendant l'un de l'autre.

Ces 2 types différents de récepteurs ont été déterminés en fonction de leur sélectivité pour leur agoniste spécifique, la nicotine et la muscarine (2 alcaloïdes naturels).

Les propriétés de ces 2 groupes sont très distinctes, que se soit sur leur localisation, leur structure, leurs propriétés pharmacologiques, ou sur leur temps de réponse.

1.2.4.1. Les récepteurs nicotiques

Les récepteurs nicotiques sont les premiers récepteurs cholinergiques dont l'existence a été reconnue.

En 1906, John Newport Langley évoque l'idée d'une "substance réceptrice" située à la jonction neuro-musculaire et qui serait sensible au curare (comme antagoniste) et à la nicotine (comme agoniste).

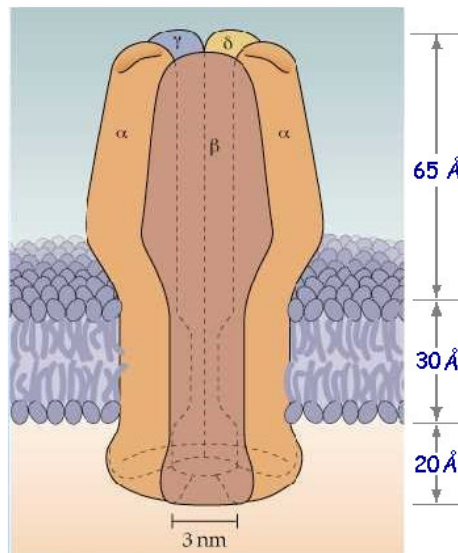
A. Structure

Les récepteurs nicotiques sont des récepteurs canaux dépendants des neurotransmetteurs. Ces récepteurs sont perméables à tous les cations en général, ceux-ci diffusant selon leur gradient de concentration.

Ce sont des protéines transmembranaires constituées de 5 sous-unités: 2α , β , γ et δ formant un canal ionique permettant le passage des ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Les récepteurs situés dans le SNC sont constitués seulement des sous-unités α et β . Le site actif fixant l'ACh est sur α . Outre ce site de liaison pour le ligand naturel, il existe à la surface du récepteur nicotique des sites de liaison

allostériques permettant la fixation d'autres molécules telles que les opiacés ou les stéroïdes.

La structure des sous-unités cérébrales est similaire à la structure des sous-unités des récepteurs périphériques (Sargent, 1993), (McGehee et Role, 1995).



Structure du récepteur nicotinique (d'après Neurosciences édition De Boeck Université)

B. Mode d'action

Lorsque aucun neurotransmetteur n'est fixé au récepteur, le pore est fermé. Un changement de conformation allostérique est possible lorsque l'ACh se lie aux deux sous-unités α . L'occupation des deux sites α est nécessaire pour l'ouverture du canal. Il s'en suit une torsion des sous-unités de la protéine qui résulte en l'ouverture du pore. La durée de l'ouverture dépend de l'affinité et de la concentration de l'agoniste. Les ions peuvent diffuser selon leur gradient de concentration.

Le canal peut également être activé par des agonistes compétitifs se fixant à la place de l'ACh (Nicotine), des agonistes allostériques (Huperzine) ne se fixant pas sur le site de liaison naturel.

Il peut être inhibé par des antagonistes compétitifs (curare), allostériques (barbiturate) et des inhibiteurs du canal bouchant celui-ci (hexametonium).

La réponse à la stimulation des récepteurs nicotiques est rapide et de courte durée.

C. Localisation et fonction des nAChR

Les récepteurs nicotiques sont principalement présents dans le système nerveux périphérique mais peuvent aussi être localisés dans le système nerveux autonome et au niveau du système nerveux central.

Au niveau du système nerveux périphérique ce sont les récepteurs exclusifs de la plaque motrice des muscles squelettiques. Leur stimulation entraîne la contraction musculaire.

Dans le système nerveux végétatif, ils sont présents au niveau des ganglions sympathiques et parasympathiques.

Au niveau du système nerveux central, ils représentent 5% de l'ensemble des récepteurs cholinergiques. Ce sont majoritairement des auto récepteurs pré synaptiques (McGehee et Role, 1995).

1.2.4.2. Les récepteurs muscariniques

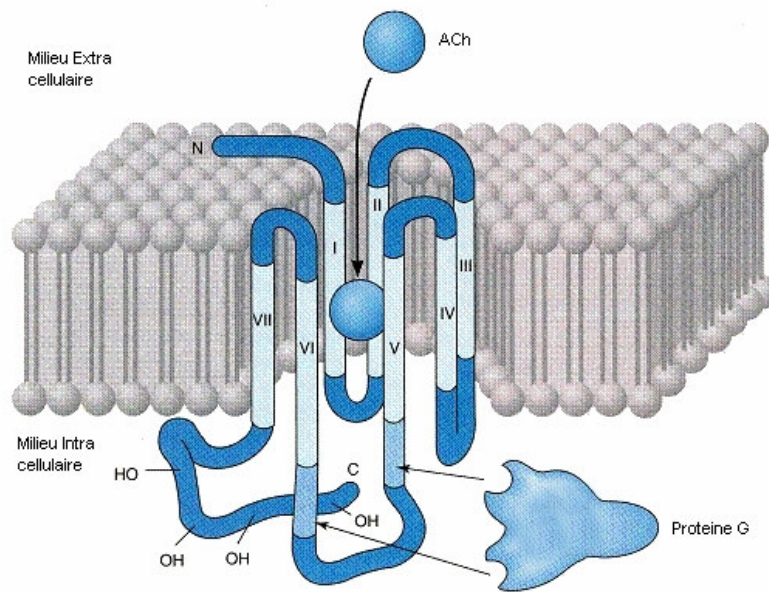
Les récepteurs muscariniques représentent la deuxième famille de récepteurs pouvant lier l'ACh. La réponse de ces récepteurs est plus lente et possède une durée d'action plus longue que celle des récepteurs nicotiques.

Il existe 5 sous familles de récepteurs muscariniques, les M₁, M₂, M₃, M₄ et M₅ codés par 5 gènes distinct m₁, m₂, m₃, m₄ et m₅. Ces récepteurs ont la même base structurale, mais possèdent des effets différents.

A. Structure

Les récepteurs muscariniques font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils possèdent 7 domaines transmembranaires formés d'acides aminés hydrophobes. La liaison avec l'ACh permet l'activation de la protéine G, hydrolysant alors le GTP (guanosine tri phosphates) en GDP (guanosine di phosphates) ce qui active une cascade de seconds messagers.

Tous les types de récepteurs muscariniques peuvent fixer la muscarine comme agoniste et l'atropine comme antagoniste.



Structure du récepteur muscarinique (d'après pharmacy.wsu.edu/courses)

B. Mode d'action

Bien que tous les récepteurs muscariniques agissent via l'activation d'une protéine G, la réponse sera différente qu'il s'agisse des récepteurs M_1 , M_3 et M_5 ou M_2 et M_4 .

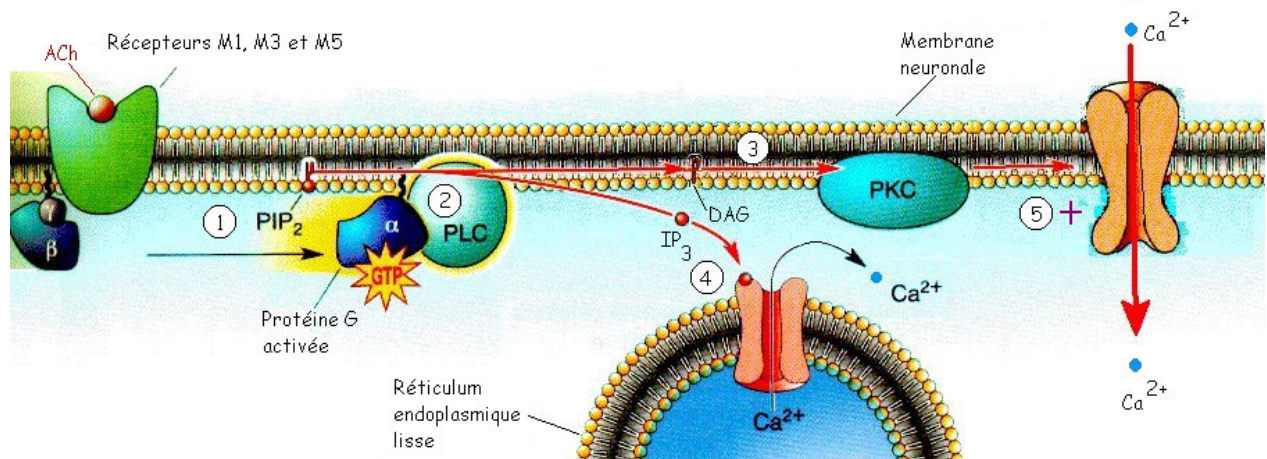
Action des M_1 , M_3 et M_5

Ces trois récepteurs sont liés à une protéine G_s (stimulatrice de l'adénylate cyclase).

La liaison de l'ACh au récepteur va activer la protéine G_s ; la sous-unité α liant le GTP se détache de la protéine. Cette sous-unité va activer d'une part l'adénylate cyclase et d'autre part la phospholipase C (PLC). L'adénylate cyclase est une enzyme membranaire qui transforme l'ATP en AMPc. L'élévation du taux d'AMPc dans le cytoplasme active la protéine kinase A qui va phosphoryler des canaux

potassiques membranaires, les rendant inactifs. La phospholipase C est également une enzyme membranaire qui coupe un phospholipide membranaire (le PIP₂ ou phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en deux molécules qui vont jouer le rôle de seconds messagers: le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). Le DAG, soluble dans les lipides, agit au sein de la membrane où il active la protéine kinase C qui va phosphoryler les canaux Ca²⁺ ; ils sont ainsi activés et une augmentation intracellulaire de calcium est observée. En empêchant la sortie de K⁺ et en augmentant la quantité de Ca²⁺ intra cellulaire, ces phénomènes induisent la dépolarisation de la cellule. L'IP₃, soluble dans l'eau, diffuse plus loin dans le cytosol et se fixe sur des récepteurs spécifiques du réticulum endoplasmique lisse, provoquant une libération du calcium vers le cytosol.

Ces récepteurs induisent une dépolarisation du neurone, ils ont donc un effet activateur.

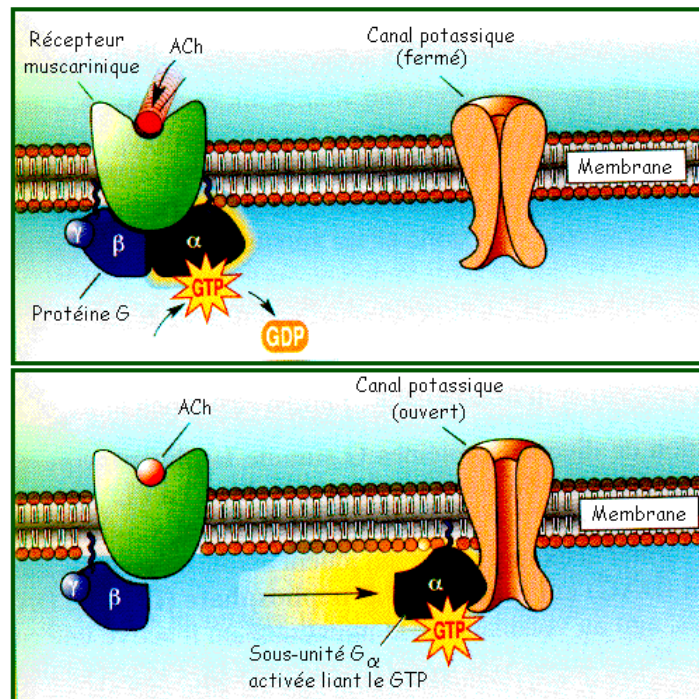


Mécanisme d'action des récepteurs M₁, M₃ et M₅ (d'après Neurosciences édition De Boeck Université)

Action des M₂ et M₄

La fixation de l'ACh au récepteur stimule la protéine Gi, inhibitrice de l'adénylate cyclase. La conséquence sera une inhibition de la formation d'AMPC. De plus, la sous-unité α activée provoque le blocage d'un canal calcium et l'ouverture

d'un canal potassique, ce qui a pour conséquence une hyper polarisation de la cellule. Ces récepteurs ont donc une activité inhibitrice.



Mécanisme d'action des récepteurs M₂ et M₄ (d'après Neurosciences édition De Boeck Université)

C. Localisation et fonction des mAChR

Les récepteurs muscariniques sont essentiellement présents au niveau du système nerveux central, où ils représentent 95% des récepteurs cholinergiques. Les récepteurs M₁, M₃ et M₅ sont des hétérorécepteurs permettant le transfert de l'influx nerveux, les récepteurs M₂ et M₄ sont à la fois des hétérorécepteurs bloquant l'influx nerveux et des autorécepteurs permettant de limiter la sécrétion d'ACh.

Ils sont distribués de manière variable suivant la structure étudiée (Yamamura *et al.*, 1974). Ils sont abondants dans les structures striatales et corticales (Perry *et al.*, 1989), le noyau caudé, l'hippocampe (structure dans laquelle se trouvent 50 %

des récepteurs muscariniques centraux), le noyau ventro-basal du thalamus, le cortex piriforme, le cortex cérébelleux, les corps genouillés externes et internes, la protubérance et la moelle épinière. Leur répartition varie également en fonction de leur nature, la plus grande proportion de récepteurs M₁ est retrouvée dans l'hippocampe alors que le cervelet et l'hypothalamus contiennent des fractions importantes de récepteurs M₂ (Giraldo *et al.*, 1987).

On trouve également des récepteurs muscariniques dans le système nerveux autonome essentiellement au niveau des poumons du cœur, des ganglions parasympathiques et des muscles lisses.

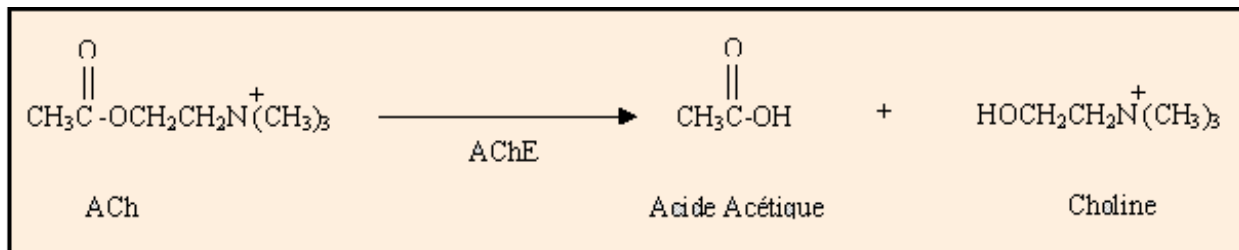
1.2.4.3. Tableau comparatif des nAChR et mAChR

	Récepteurs Nicotiniques	Récepteurs Muscariniques
Structure	Récepteurs Inotropiques Canaux ioniques	Récepteurs Métabotropiques Couplés aux protéines G
Vitesse d'action	Rapide	Lente
Durée d'action	Courte	Prolongée
Localisation dans le système nerveux central	Représentent 5% des récepteurs cholinergiques Majoritairement pré synaptiques	Représentent 95% des récepteurs cholinergiques Présynaptiques et Post synaptiques
Localisation dans le système nerveux autonome	Présent dans ganglions sympathiques et parasympathiques	Présent dans ganglions parasympathiques, au niveau de certains organes et des muscles lisses
Localisation dans le système nerveux périphérique somatique	Seul récepteur de la plaque motrice des muscles squelettiques	Absent des muscles striés

1.2.5. DEGRADATION DE L'ACH

L'acétylcholine présente dans la fente synaptique est dégradée par l'acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme hydrolyse l'acétylcholine en choline et acide acétique. 50% de la choline ainsi libérée est recaptée par la terminaison pré synaptique.

La dégradation de l'acétylcholine après fixation sur un récepteur est indispensable à la bonne transmission cholinergique.



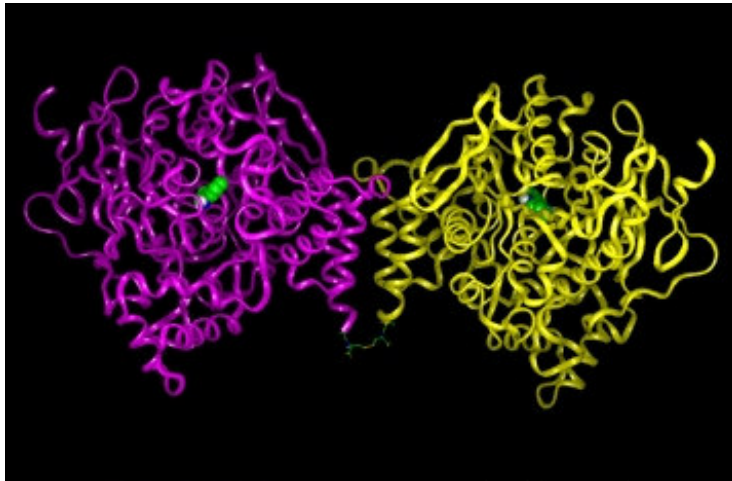
Hydrolyse de l'acétylcholine

A. Structure et localisation de l'AChE

L'AChE est une enzyme de type estérase faisant partie de la famille des protéases à serine. C'est une enzyme polymorphe pouvant comporter de 1 à 12 sous unités catalytiques. La forme prédominante dans le système nerveux central est la forme tétramérique.

Synthétisée dans le corps cellulaire des neurones, l'enzyme est principalement située à la surface de la terminaison post synaptiques où elle permet l'hydrolyse de l'ACh en acétate et choline.

L'AChE est largement distribuée, on la trouve dans le système nerveux central, dans le système nerveux périphérique, mais aussi à la surface des globules rouges.



Structure de l'Acetylcholinesterase sous forme dimérique

B. Propriétés catalytiques de l'AChE

L'AChE fait partie des enzymes ayant l'action catalytique la plus rapide. La dégradation d'une molécule d'ACh se fait en 80 ms environ ce qui équivaut pour une enzyme sous forme tétramérique à la dégradation de 50 000 molécules d'ACh par seconde.

L'AChE est la cible de nombreux inhibiteurs, réversibles ou irréversibles. L'inhibition de l'AChE conduit à une augmentation du temps d'action de l'ACh sur ces récepteurs et donc à une augmentation de la réponse cholinergique. Les inhibiteurs réversibles sont utilisés dans le traitement de maladies, telle que la maladie d'Alzheimer où leur emploi conduit à une amélioration des performances cognitives et mnésiques. Les inhibiteurs irréversibles sont par ailleurs de redoutables neurotoxiques pouvant être utilisés comme arme de guerre.

Il est à noter que d'autres estérases (Butyrylcholinestérase entre autres) pouvant hydrolyser l'Acétylcholine existent dans l'organisme, cependant elles représentent une très faible proportion de l'activité totale de la dégradation de l'ACh.

1.2.6. SCHEMA RECAPITULATIF DE LA TRANSMISSION CHOLINERGIQUE

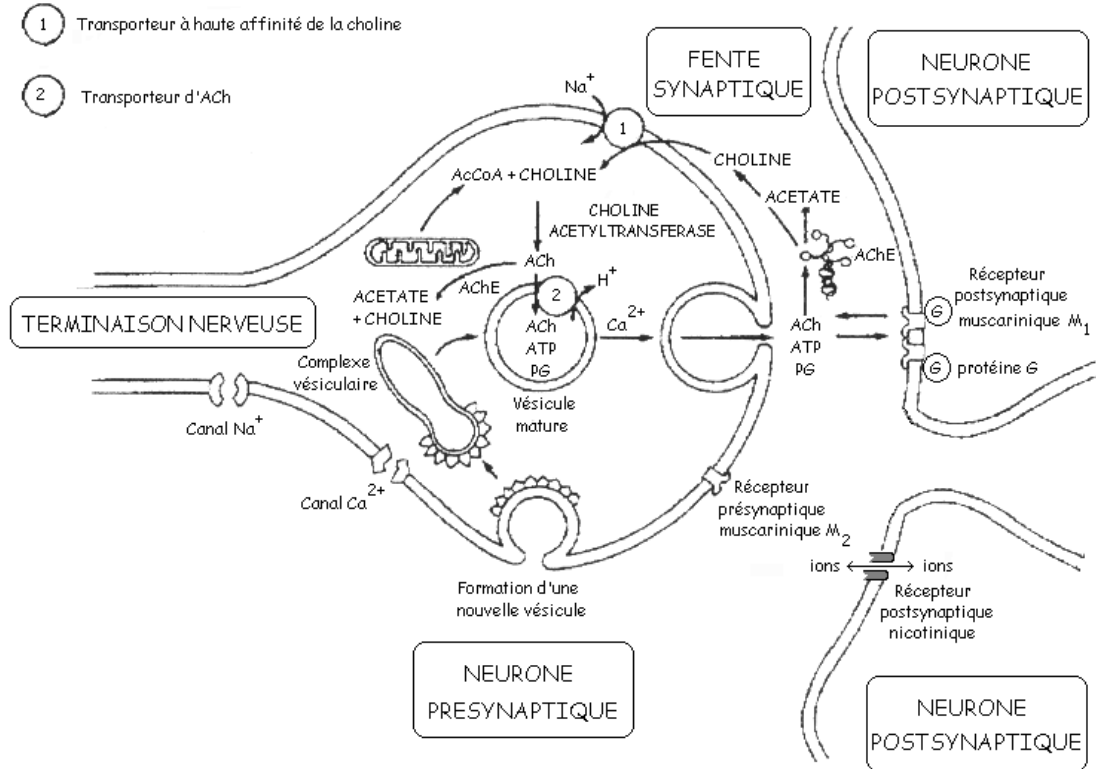


Schéma récapitulatif de la transmission cholinergique

1.3. NEUROANATOMIE FONCTIONNELLE

La recherche de la distribution de l'ACh ne s'est pas faite directement en raison de l'absence de méthodes histochimiques suffisamment sensibles pour détecter les faibles concentrations de ce neuromédiateur dans le cerveau (26 nmol/g de tissus frais (Stavinoha *et al.*, 1973)). L'établissement d'une cartographie des voies cholinergiques a été réalisé grâce à la combinaison de différentes techniques telles que la détection histochimique de la ChAT, la microdissection du tissu nerveux, la visualisation des récepteurs cholinergiques par autoradiographie. La répartition de l'AChE n'a pas été prise en compte car ce n'est pas un marqueur suffisamment spécifique des neurones cholinergiques.

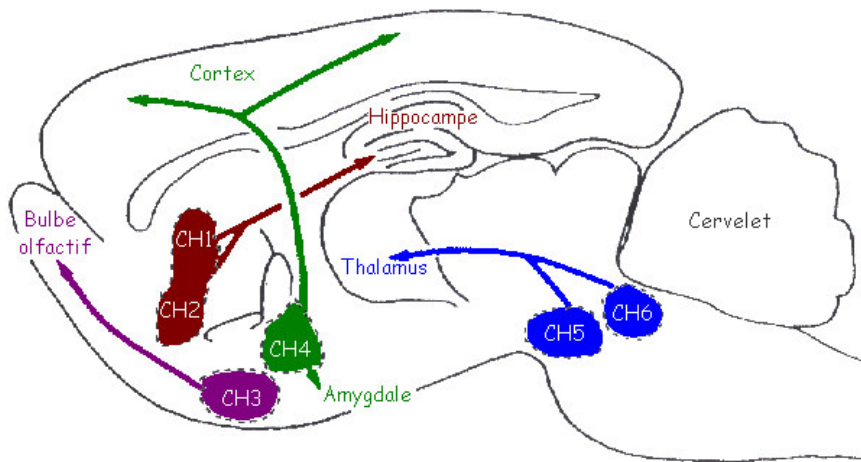
1.3.1. LES DIFFERENTS GROUPES DE CELLULES CHOLINERGIQUES

D'après la classification de Mesulam *et al.* (Mesulam *et al.*, 1983), réalisée sur le cerveau de rat, il est possible de classer les cellules cholinergiques du système nerveux central en 6 groupes. Le premier groupe (Ch1) est composé des cellules cholinergiques du septum médian ; ce groupe se distingue d'un autre groupe voisin (Ch2), les cellules de la partie verticale de la bande diagonale de Broca. Ces 2 groupes se projettent au niveau de l'hippocampe formant ainsi la voie septo-hippocampique. Les cellules cholinergiques de la partie horizontale de la bande diagonale de Broca se projettent au niveau des bulbes olfactif et forment ainsi le troisième groupe Ch3. Le néocortex et les amygdales sont innervés par le quatrième groupe de cellules, Ch4. Le groupe Ch4 est formé de cellules situées de manière plus diffuse dans les noyaux magnocellulaires de la base (noyau de Meynert chez l'homme) et dans la partie horizontale de la bande diagonale de Broca. Les cellules des 2 derniers groupes Ch5 et Ch6 innervent le thalamus. Ces cellules sont situées pour Ch5 au niveau des noyaux pédonculopontiques et latérodorsaux pour Ch6 du tegmentum. Ces groupes forment le complexe pontomésencéphalotegmental.

Il est nécessaire de préciser que les groupes de cellules (Ch1 à Ch6), bien que considérés comme cholinergiques, contiennent d'autres types de cellules. Les

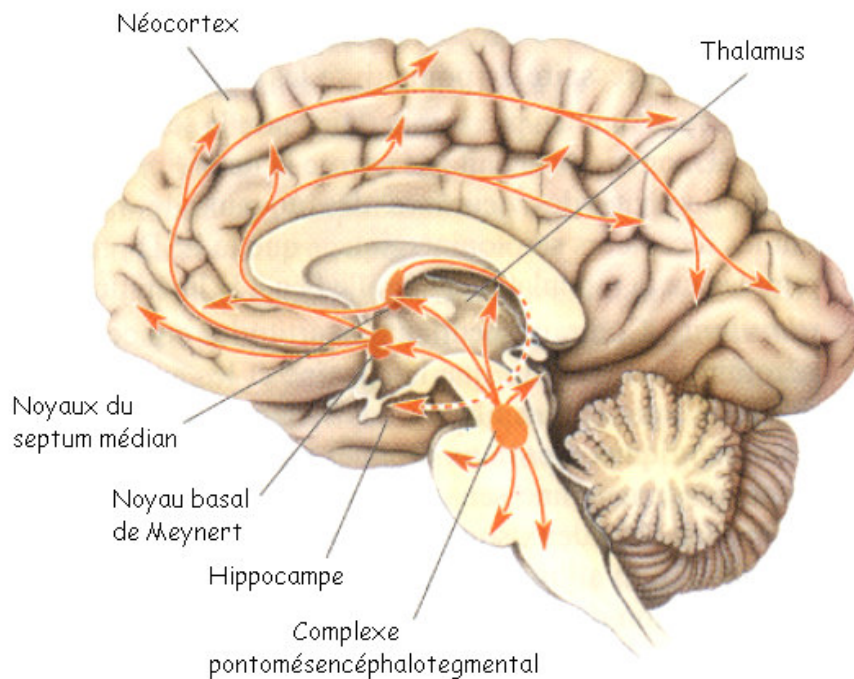
cellules cholinergiques représentent seulement 10-20% des cellules de Ch3, alors qu'elles représentent 80-90% dans Ch4.

Cette classification réalisée chez le rat est aussi valable chez l'homme.



- CH1: noyau du septum
- CH2: bande diagonale de Broca
- CH3: partie latérale de la bande diagonale de Broca
- CH4: noyau magnocellulaire de la base
- CH5: noyau pédonculopontique du tegmentum
- CH6: noyau latérodorsal du tegmentum

Voies cholinergiques centrales chez le rat

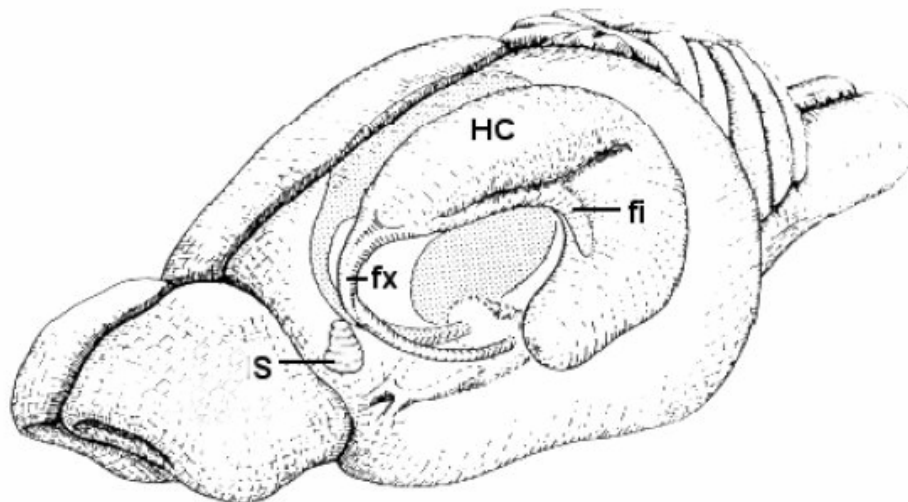


Voies cholinergiques centrales chez l'homme (d'après Neurosciences édition De Boeck Université)

1.3.2. LE VOIE SEPTO-HIPPOCAMPIQUE

1.3.2.1. Composition

La voie septo-hippocampique fait partie des principales voies cholinergiques. Elle est constituée du septum, de l'hippocampe ainsi que de leurs voies efférentes et afférentes. Le septum et l'hippocampe sont interconnectés de manière réciproque à travers la fimbria et le faisceau dorsal du fornix. Les connexions ascendantes, du septum à l'hippocampe, proviennent essentiellement du septum médian et de la partie verticale de la bande diagonale de Broca. Ces connexions sont à 40-50% cholinergique et 10-20% GABAergiques. Les connexions descendantes se projettent majoritairement de l'hippocampe sur le septum latéral.



Organisation de la voie septo-hippocampique (modification d'après Amaral et Witter 1995). HC= hippocampe, S= Septum, fx= fornix, fi = Fimbria

1.3.2.2. Voie septo-hippocampique et mémoire

La voie septo-hippocampique et plus particulièrement l'hippocampe jouent un rôle important dans l'établissement de la mémoire. Ce rôle a été mis en évidence chez des patients ayant subi une ablation des hippocampes dans le but de traiter la survenue de crises d'épilepsie. Ces patients après l'opération étaient totalement incapables de créer de nouveaux souvenirs.

De telles observations ont conduit à étudier chez l'animal le rôle de l'hippocampe sur la mémoire. Ainsi, la dégradation totale ou partielle de l'hippocampe conduit également à une dégradation de la mémoire (Jarrard, 1993). La mémoire spatiale semble plus particulièrement sensible (Morris *et al.*, 1982).

1.3.2.3. Voie septo-hippocampique et rythme thêta

Le rythme thêta hippocampique est une oscillation électroencéphalographique régulière comprise entre 4 et 12 Hz enregistrée au niveau de l'hippocampe, durant les phases d'éveil et de sommeil paradoxal.

La génération de ce rythme semble provenir du septum. Cette hypothèse est apparue depuis la découverte de cellules pace maker dans cette région (Petsche *et al.*, 1962). Elle a été confirmée par la suite par des études montrant la suppression du thêta hippocampique suite à des lésions réalisées au niveau de cette zone (Andersen *et al.*, 1979), (Leung *et al.*, 1994).

Des études pharmacologiques ont montré que la principale régulation du rythme thêta provenait des afférences cholinergiques du septum médian. Ainsi de nombreux agonistes cholinergiques induisent la survenue d'un rythme thêta (Monmaur et Breton, 1991), y compris *in vitro* sur des tranches d'hippocampe (Konopacki *et al.*, 1987), alors que des antagonistes l'atténuent (Kramis *et al.*, 1975).

Le rythme thêta semble avoir un rôle dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. L'utilisation d'antagonistes muscariniques dégrade le rythme thêta mais également la mémoire spatiale (Bennett *et al.*, 1971).

Ainsi le rythme thêta aurait un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'hippocampe, et le septum est essentiel dans la génération de ce rythme.

1.3.3. LE COMPLEXE PONTOMESENCÉPHALOTEGMENTAL

Ce complexe se compose des cellules du pont et du tegmentum mésencéphalique. Ce système se projette vers le thalamus dorsal, où avec les systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques, il régule l'excitabilité des relais sensoriels spécifiques. Ce système est activé durant l'éveil mais également durant le sommeil paradoxal.

CHAPITRE 2: LES ONDES ELECTROMAGNETIQUES NON IONISANTES

2.1. LES CHAMPS HYPERFREQUENCES

2.1.1. DEFINITION

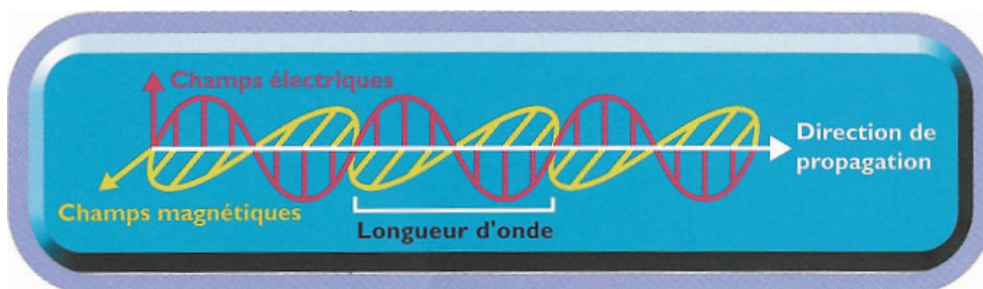
Tout transport ou utilisation de l'énergie électrique produit un champ électrique et un champ magnétique. Le champ électrique résulte de la présence de charges électriques, le champ magnétique apparaît lui avec le déplacement de ces charges.

Par définition un champ électromagnétique est l'association de ces deux composantes. Les champs sont orthogonaux, en phase, se propagent dans l'espace et varient dans le temps. L'impédance des champs est constante et vaut 377 Ohm (en champ lointain).

Les champs hyperfréquences ou micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de même nature que la lumière visible ou les rayons X. Leur fréquence est comprise entre 300 kHz et 300 GHz.

Le spectre électromagnétique peut être divisé en deux parties principales :

- Les radiations ionisantes, dont l'énergie est suffisante pour arracher des électrons à la matière, c'est le cas des rayons X ou des rayons γ .
- Les radiations non ionisantes dont l'énergie est insuffisante pour avoir une ionisation directe, c'est le cas des champs hyperfréquences



Représentation d'une onde électromagnétique (documentation INRS)

2.1.2. BASES PHYSIQUES DES CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES

Les ondes électromagnétiques sont caractérisées par plusieurs paramètres physiques, dont les principales sont leur fréquence ou leur longueur d'onde, leur intensité, et leur puissance.

2.1.2.1. Rappel des unités et constantes physiques

Rappel des unités et constantes physiques du système international utilisées pour caractériser les champs électromagnétiques et définir les normes.

Quantité	Symbole	Unité	Abréviation
Intensité de champ électrique	E	Volt par mètre	V/m
Conductivité électrique	σ	Siemens par mètre	S/m
Fréquence	F ou ν	Hertz	s^{-1} ou Hz
Intensité de champ magnétique	H	Ampère par mètre	A/m
Densité de flux magnétiques	B	Tesla (8.10^5 A/m)	T
Perméabilité	μ	Henry par mètre	H/m
Permittivité	ϵ	Farad par mètre	F/m
Densité de puissance	S	Watt par mètre carré	W/m ²
Débit d'absorption spécifique	DAS	Watt par Kilogramme	W/kg
Longueur d'onde	λ	mètre	m

Tableau des grandeurs et unités du système international

Constante physique	Symbole	Valeur
Vitesse de la lumière	c	$2,997.10^8$ m/s
Permittivité dans le vide	ϵ_0	$8,854.10^{-12}$ F/m
Perméabilité dans le vide	μ_0	$4\pi.10^{-7}$ H/m
Impédance dans le vide	Z_0	120π ou 377Ω
Constante de Planck	h	$6.62.10^{-34}$ J.s

Tableau des constantes physiques

2.1.2.2. Fréquence et longueur d'onde

La fréquence d'une onde électromagnétique est le nombre d'oscillations du champ par seconde. Elle s'exprime en Hertz (Hz) ou cycles par seconde, et s'étend théoriquement de zéro à l'infini.

Fréquence (ν) et longueur d'onde (λ) sont liées par la formule $\lambda=c/\nu$ (c étant la vitesse de propagation de l'onde dans le vide, approximativement $3 \cdot 10^8$ m/s). A chaque fréquence est associé un photon d'énergie $E=h\nu$ (h étant la constante de Planck, $h=6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s)

Les propriétés physiques ainsi que le domaine d'application des ondes électromagnétiques dépend également de leur fréquence. Les rayonnements X et γ possèdent suffisamment d'énergie pour rompre les liaisons moléculaires, les rayonnements ultraviolets, visibles et infrarouges peuvent modifier les niveaux d'énergie au sein d'une molécule, cependant les rayonnements micro-ondes ne possèdent pas suffisamment d'énergie pour rompre les liaisons moléculaires.

Les fréquences concernées par les micro-ondes se trouvent dans la bande 300 MHz - 300 GHz soit une longueur d'onde variant respectivement de 1 mètre à 1 millimètre.

Fréquence ou longueur d'onde	Gamme	Exemple d'applications
0 Hz	Champs statiques	Electricité statique
50 Hz	Extrêmement basses Fréquences	Lignes électriques et courant domestique
20 kHz	Fréquences intermédiaires	Ecrans vidéo, plaques à induction culinaires
88 - 107 MHz	Radiofréquences	Radiodiffusion FM
300 MHz - 300 GHz	Hyper fréquences ou Micro-ondes	Téléphones analogiques (400-800 MHz) GSM (900-1800 MHz) UMTS (1900-2200 MHz) Four à micro-ondes (900-2450 MHz) Radar (3-100 GHz)
300 GHz- 10^5 GHz	Infra-rouges	Détecteur anti-vol, télécommandes
10^5 - 10^6 GHz = 0,8-0,4 μ m	Visible	Lumière, lasers
0,4-0,01 μ m	Ultra-violets	Soleil, photothérapie
10^{-1} - 10^{-2} μ m	Rayon X	Radiologie
$<10^{-2}$ μ m	Rayon γ	Physique nucléaire

Classification des fréquences du spectre électromagnétique

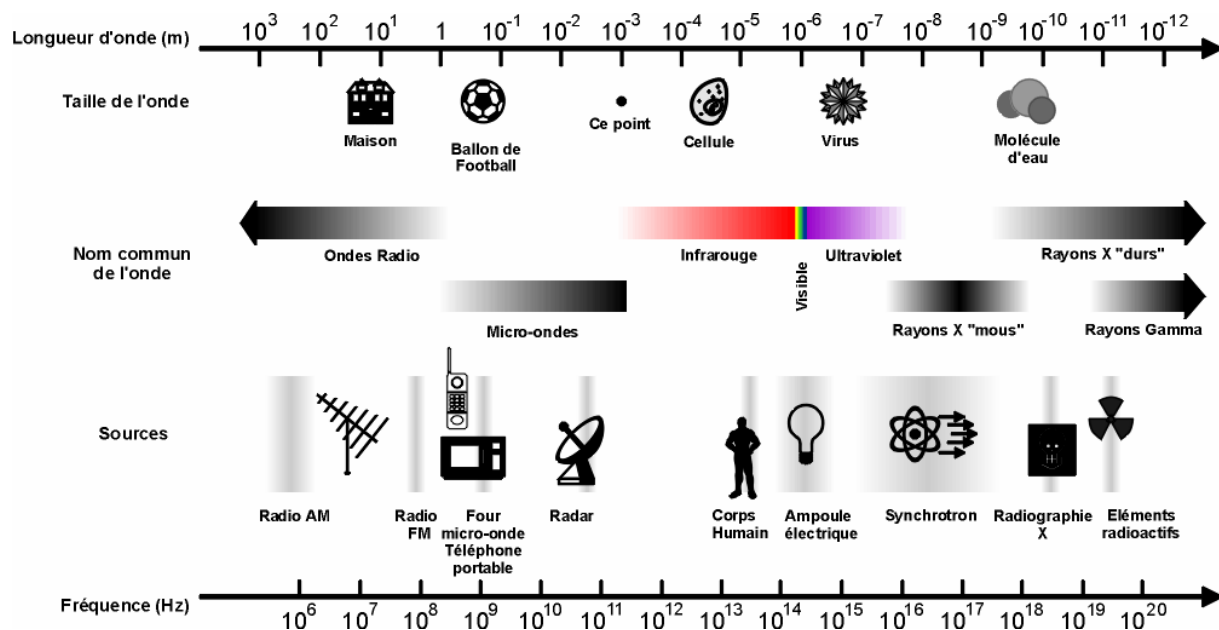


Illustration du spectre électromagnétique (document DFP)

2.1.2.3. Intensité et puissance

Pour les fréquences étudiées ici, l'intensité d'un champ électromagnétique peut être appréhendée soit à partir du champ électrique, soit à partir du champ magnétique, le champ électrique étant déterminé en V/m, et le champ magnétique en A/m ou en Tesla ($1 \text{ A/m} = 1,27 \mu\text{T}$).

De ces valeurs de champ, il est alors possible de déterminer la densité surfacique de puissance, la DSP. La DSP correspond à la puissance traversant une surface de 1 m^2 , elle s'exprime en W/m^2 . Elle est proportionnelle au produit du champ électrique et du champ magnétique et est donnée pour une onde plane par :

$$\text{DSP} = E \times H = \frac{E^2}{377} = 377 \times H^2$$

La puissance globale contenue dans le champ électromagnétique s'exprime en W.

Il est important de noter que lors d'une émission impulsionnel, il est nécessaire de différencier la puissance maximale, dite puissance crête, de la puissance moyenne résultant de la modulation. Dans une émission type radar avec des impulsions d'une durée de 1 μ s toutes les 1 ms, la puissance moyenne est 1000 fois plus faible que la puissance crête.

2.2. INTERACTIONS DES CHAMPS HYPERFREQUENCES AVEC LES SYSTEMES BIOLOGIQUES

Les champs hyperfréquences peuvent déplacer des charges électriques, ou orienter des molécules polarisées. Les systèmes biologiques contenant des ions et des molécules polaires en grands nombres sont donc susceptibles d'être perturbés par ces interactions.

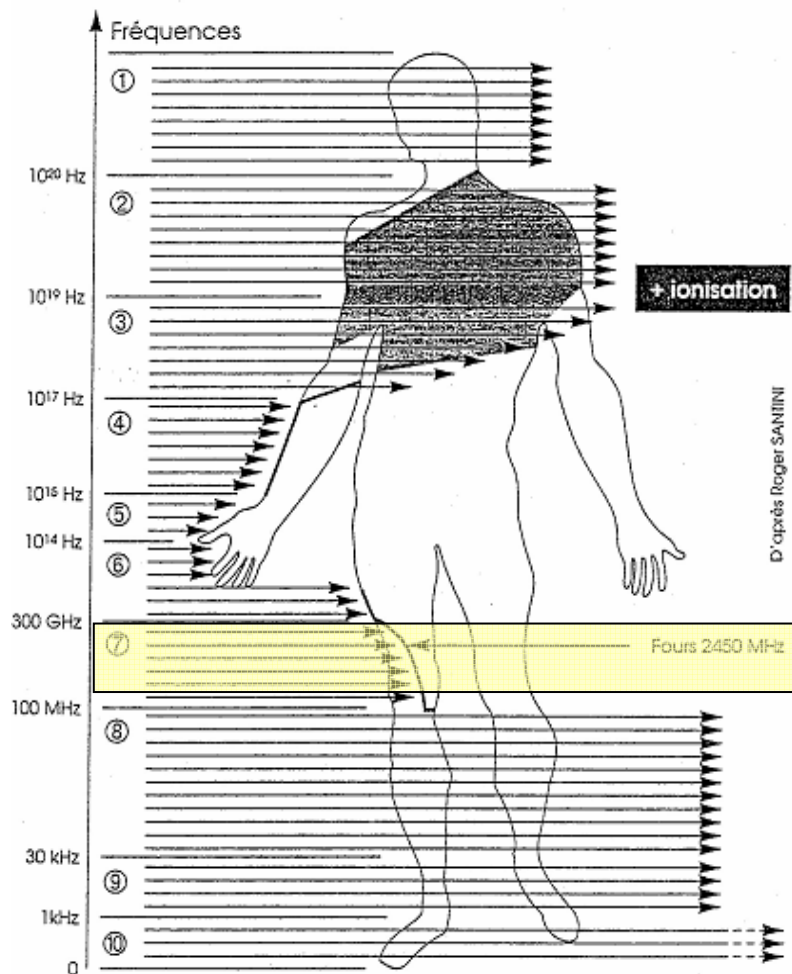
2.2.1. PENETRATION DES ONDES HF DANS UN SYSTEME BIOLOGIQUE

Lorsqu'un tissu biologique est soumis à un champ HF, seule une partie du champ est absorbée par le système, l'autre étant réfléchi ou transmise. C'est cette partie absorbée qu'il est important de quantifier et qui *a priori* peut être à l'origine d'effets biologiques.

Le rayonnement qui pénètre dans le tissu est absorbé plus ou moins rapidement en fonction des constantes diélectriques (permittivité) de la matière traversée ainsi que de la longueur d'onde du rayonnement. Plus la longueur d'onde est grande plus l'onde pénètre ; plus le tissu a une conductivité électrique importante plus l'onde est réfléchi et moins elle se propage dans le système.

Cependant l'absorption dépend également des dimensions et de l'orientation du grand axe du système par rapport au champ électrique. L'énergie électromagnétique est préférentiellement absorbée pour certaines fréquences, les fréquences de résonances. Pour ces fréquences, la longueur d'onde du champ HF et la longueur du système sont égales ou multiples. Cette particularité est responsable de la sensibilité préférentielle de certains organes pour certaines fréquences, ainsi la rétine et le cristallin seront plus sensibles à un champ de 9 GHz, les organes creux tel que l'estomac ou l'intestin grêle à un champ de 3 GHz.

Quand le champ hyperfréquence a pénétré dans l'organisme, l'hétérogénéité et la structure des tissus rend le comportement de l'onde complexe, il est ainsi possible d'observer des points chauds suite à la focalisation ou à la réflexion du champ.



Pénétration des ondes électromagnétiques dans le corps humain en fonction de leur fréquence (d'après Roger Santini)

2.2.2. EFFETS BIOLOGIQUES

Les interactions des champs HF avec les systèmes biologiques peuvent induire des effets potentiellement délétères pour l'organisme.

Il est possible de différencier 3 grandes catégories d'effets biologiques : les effets thermiques, les effets non thermiques et les effets indirects. La prévalence d'un type d'effet par rapport aux autres dépendant de la puissance, mais également de la fréquence du champ électromagnétique.

2.2.2.1. Les effets thermiques

Les effets thermiques résultent directement de la dissipation de l'énergie électromagnétique sous forme de chaleur au cours de son absorption à l'intérieur de la matière.

Ces effets thermiques sont directement liés à la quantité d'énergie dissipée dans l'organisme, ils apparaissent pour des densités de puissance importantes supérieures ou égales à 500 W/m².

L'échauffement résultant peut être général provoquant une hyperthermie, ou être localisé à certains organes induisant des lésions spécifiques sur ceux-ci. Les lésions observées sont celles causées par l'augmentation de la température, tel que la coagulation des protéines, des cataractes, des lésions testiculaires, ou des crises convulsives en cas d'hyperthermie globale. De plus, les rayonnements hyperfréquences de par leurs propriétés de pénétration, induisent une production de chaleur à l'intérieur des tissus et non à la surface de la peau ce qui entraîne un retard dans la perception des brûlures.

2.2.2.2. Les effets non thermiques

Les effets non thermiques sont des effets observés sur les systèmes biologiques, alors que la quantité d'énergie absorbée est trop faible pour induire une élévation de la température. Il faut préciser cependant que les effets observés dans les cas où des expositions RF n'entraînent pas une augmentation de température, suite à la mise en place d'un moyen de thermorégulation, ne sont pas considérés comme des effets non thermiques. Ainsi on parle d'effets non thermiques ou spécifiques pour des effets observés à des puissances inférieures à 500 W/m². Ils apparaissent généralement suite à des expositions de longues durées.

Contrairement aux effets thermiques, le mécanisme de ces effets n'est pas connu avec certitude et semble avoir des origines multiples. Les hypothèses explicatives évoquent des micro échauffements locaux, des changements de conformation moléculaire, des perturbations enzymatiques, des modifications de répartitions ioniques.

Il existe un grand nombre d'effets non thermiques décrits, tels que des effets cellulaires (promotion de cancer entre autre), endocriniens, immunologiques,

neurobiologiques, mais aussi l'existence d'effets potentialisateurs associés avec d'autres agents agressifs.

A ce jour les effets non thermiques demeurent un réel problème de santé publique de par l'omniprésence des champs de micro-ondes de faible puissance, mais leurs effets nuisibles restent très controversés.

2.2.2.3. Les effets indirects

Indépendamment de leurs effets directs thermiques ou non sur les êtres vivants, les micro-ondes peuvent avoir des effets indirects.

Les champs électriques mis en jeu au voisinage des antennes peuvent être suffisants pour provoquer des décharges électriques et entraîner des accidents liés aux lâchers d'objets (un individu qui toucherait un véhicule soumis à un champ d'exposition de 200 V/m entre 10 kHz et 300 MHz, ressentirait de telles décharges Chatterjee, 1986). De plus la présence de corps métalliques focalise les champs électromagnétiques, induisant ainsi la possibilité de brûlures qui n'auraient pas eu lieu en leur absence : c'est le cas pour certaines prothèses ou implants dentaires, cause de brûlures internes localisées.

En outre des interférences de radiofréquences avec les stimulateurs cardiaques sont théoriquement possibles. Il s'agit d'un problème de compatibilité électromagnétique, compliqué par l'environnement biologique que constitue le corps du patient. A une distance inférieure à 10 cm entre un radiotéléphone et un stimulateur cardiaque, seules des perturbations mineures ont cependant pu être enregistrées (Butrous *et al.*, 1983), (Kainz *et al.*, 2005).

2.3. DOSIMETRIE

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

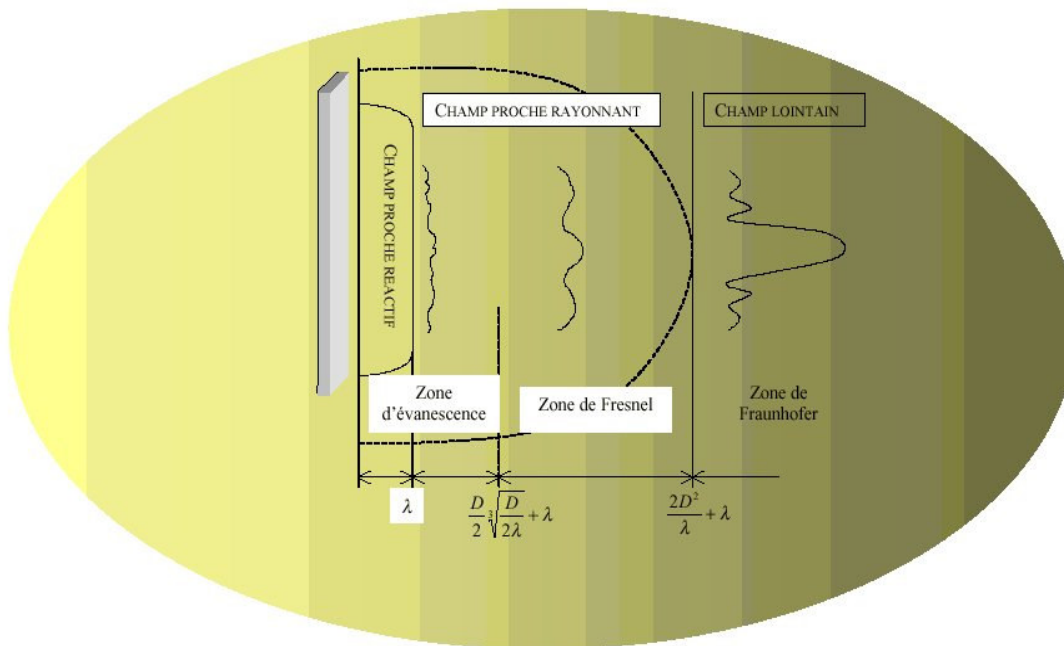
2.3.1. NOTION DE CHAMP LOINTAIN

Pour réaliser une dosimétrie, il est indispensable que le champ émis soit homogène. Pour cela il est nécessaire de tenir compte de la notion de champ lointain. Le champ produit par une antenne ou un aérien n'est homogène qu'à une certaine distance de celui-ci. Cette distance, dite distance de champ lointain, est évaluée par la formule $2D^2/\lambda + \lambda$, D étant la plus grande dimension de l'aérien (ou de l'antenne).

Au-delà de cette distance le faisceau homogène et l'énergie rayonnée est facilement évaluée (à partir de la mesure du champ électrique généralement). En champ lointain le faisceau est considéré comme formant un angle solide, l'onde électromagnétique est dite plane.

En deçà, le champ électromagnétique est très complexe, il n'y a pas de relation simple entre champ électrique et champ magnétique, la mesure est très difficile.

Il est à noter qu'il peut exister des lobes latéraux ou arrière pouvant entraîner l'irradiation de personnes placées hors de l'axe de l'aérien.



Champ proche / Champ lointain (document DFP)

2.3.2. DEBIT D'ABSORPTION SPECIFIQUE

2.3.2.1. Formulation théorique

Lorsqu'une onde est interceptée par un tissu biologique, une partie de l'énergie est renvoyée sous forme d'onde réfléchie, l'autre partie est transmise et absorbée. Cette dernière est à l'origine des interactions rayonnement-tissus. Cependant, il est très difficile d'établir une relation simple entre la mesure des champs électriques et magnétiques incidents et les effets biologiques. La quantité d'énergie absorbée par le tissu semble être le paramètre le plus important pour étudier ces interactions. Ainsi le débit d'absorption spécifique (DAS, ou SAR pour l'acronyme anglo-saxon) a été officiellement désigné comme paramètre dosimétrique de référence par la communauté scientifique. Le DAS est défini comme étant la puissance absorbée par unité de masse, il s'exprime en W/kg

$$DAS = \frac{d}{dt} \left(\frac{dW}{dm} \right) = \frac{d}{dt} \left(\frac{dW}{\rho \cdot dv} \right) \quad (\text{éq. 1})$$

Où dW est l'incrément d'énergie déposée dans l'élément de masse dm , de volume dv et de masse volumique ρ , pendant un temps dt .

La résolution de l'équation 1 (Laval 1999) aboutit à la formule :

$$DAS = \sigma \frac{\overline{E^2}}{\rho} \quad (\text{éq. 2})$$

Où E^2 est le carré de la valeur du champ électrique, σ la conductivité et ρ la masse volumique.

Or l'échauffement ΔT est provoqué par le passage d'un courant d'une amplitude E dans une suspension de volume V est de la forme pour un système adiabatique:

$$\Delta T = \frac{E^2 \cdot \sigma \cdot t}{C_p \cdot \rho} \quad (\text{éq. 3})$$

C_p est la capacité calorifique spécifique

Ainsi on obtient

$$E^2 = \frac{\Delta T}{\Delta t} \cdot \frac{C_p \cdot \rho}{\sigma} \quad (\text{éq. 4})$$

Le DAS est proportionnel à une augmentation de température de l'élément exposé et peut être défini par la relation

$$DAS = C_p \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (\text{éq. 5})$$

Ainsi le DAS peut être mesuré soit:

- Par la valeur du champ électrique généré par la source
- Par l'échauffement dégagé par l'élément exposé

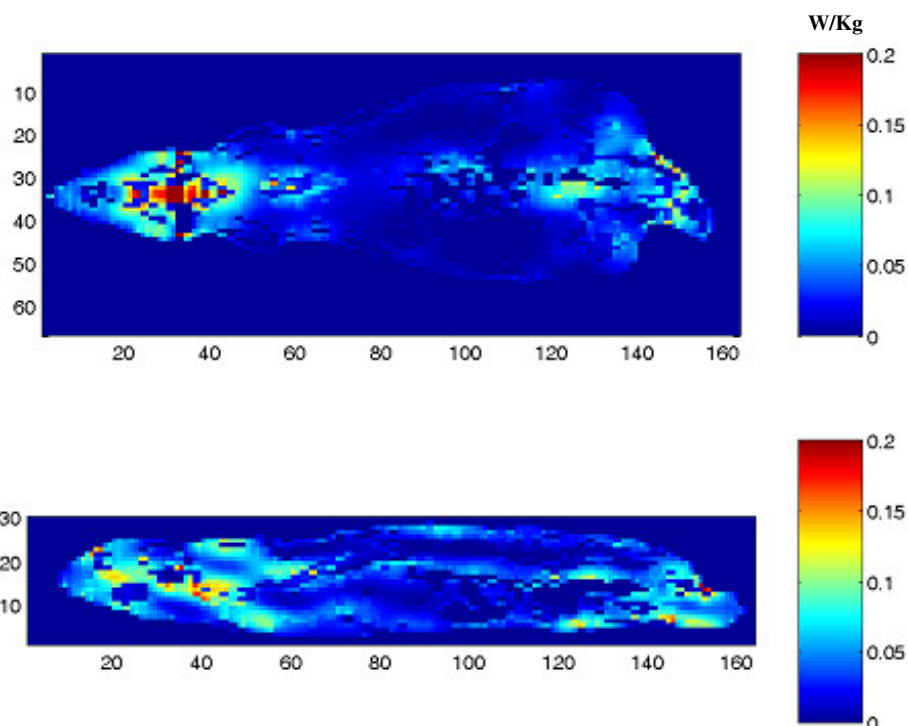
2.3.2.2. Evaluation du débit d'absorption spécifique

L'évaluation du DAS dans un système biologique fait appel soit à des techniques de simulations numériques soit à des mesures expérimentales.

A. Technique numérique

Cette technique est basée sur la modélisation du système exposé. L'évaluation numérique du DAS est rendue difficile car les paramètres de modélisation sont très complexes. En effet, les systèmes biologiques sont des objets hétérogènes et composés de différents tissus aux propriétés diélectriques très différentes.

Les modèles peuvent être construits à partir d'images de résonance magnétique (IRM) (Simunic *et al.*, 1996) ; cependant l'évaluation du DAS est plus souvent réalisé grâce à la méthode FDTD (Finite difference time domain). Cette technique permet des calculs dans des milieux anisotropiques complexes.



Exemple d'estimation de DAS par FDTD, sur un rat soumis à un champ de 1800 MHz

B. Technique expérimentale

Des estimations de DAS sont également possibles à travers des modèles expérimentaux. Ces techniques reposent sur la mesure de températures ou de champs électriques au sein d'un fantôme aux formes et aux propriétés diélectriques proches de celles du système biologique vivant. Cette technique possède une bonne résolution spatiale (Anderson et Joyner, 1995).

La thermographie infrarouge peut également être utilisée, elle permet d'observer la distribution spatiale et l'intensité de l'échauffement (Chou *et al.*, 1992).

2.3.3. NORMES D'EXPOSITION AUX CHAMPS HYPERFREQUENCES

Des limites d'expositions aux champs électromagnétiques ont été formulées dès les années 1980, par l'International Commission of Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). A partir de ces recommandations, chaque pays a pu établir ses propres normes et directives.

Ces limites ont été formulées à partir des risques aigus avérés, directement mis en évidence et reproductibles, elles ont donc été formulées à partir des effets thermiques. La valeur limite correspond ainsi à la valeur la plus basse à laquelle apparaît un effet, divisée par un coefficient de sécurité permettant de tenir compte des diverses incertitudes.

D'après l'organisation mondiale pour la santé (OMS), le DAS doit être supérieur à 4 W/kg pour que les effets des champs hyperfréquences soient délétères pour la santé. Dans le cas de ces champs, l'ICNIRP utilise deux marges de sécurité pour formuler ces limites d'exposition en fonction des populations considérées (professionnelles et public) (ICNIRP, 1998).

Pour les personnes travaillant au contact de sources de radiations HF, un facteur 10 est instauré entre la limite d'exposition et le seuil d'apparition des effets nocifs.

Une deuxième marge de sécurité est relative au grand public et instaure dans ce cas un facteur 50 afin de tenir compte de l'absence des contrôles que des personnes non informées ont sur leur environnement et de la possibilité de sensibilité variable entre les individus. La valeur ainsi déterminée pour l'exposition corps entier

dans le champ d'exposition est de 0,08 W/kg. Cependant des études dosimétriques ont montré qu'à cette limite corps entier, il est possible d'observer des puissances 25 fois supérieures dans certaines zones restreintes de l'organisme. Il a donc été mis en place la notion de DAS local, qui ne doit pas dépasser 1,6 W/kg, (8 W/kg chez les professionnels) pour la zone tête et tronc (localisation des organes vitaux) et 4 W/kg (20 W/kg chez les professionnels) pour les tissus périphériques tel que les membres. La limite d'exposition locale n'est donc pas fixée en fonctions des effets biologiques, mais à partir d'effets observés à la suite d'une exposition corps entier, selon une extrapolation dosimétrique.

Le DAS n'étant pas facilement accessible à la mesure, il a été nécessaire d'établir à l'aide d'équations de transfert les valeurs de champs électriques ou magnétiques susceptibles de produire dans le pire cas les DAS précédemment définis lorsqu'un individu est soumis à ce champ. Ces valeurs de champs qui peuvent être mesurées sont appelées des normes de références. Comme l'absorption dépend fortement de la fréquence, les valeurs de références varient en fonction de celle-ci. Pour les fréquences de téléphones portables les valeurs de champ électrique susceptible de produire un DAS de 0,08 W/m² sont de 41 et 58 V/m respectivement aux fréquences de 900 et 1800 MHz. Ces champs correspondent à des valeurs de densité de puissance de 4,5 et 9 W/m². Par rapport aux DAS maximaux autorisés, les niveaux de référence incorporent une marge de sécurité de manière à ce que les DAS ne soient jamais dépassés même dans les situations les plus défavorables.

L'OMS a repris ces recommandations de l'ICNIRP, ainsi que le Conseil de l'union européenne qui les a exprimées dans la recommandation 2004/40/CE du 29 avril 2004.

Les restrictions actuellement en vigueur ne sont pas figées, et peuvent évoluer en fonction des recherches scientifiques actuellement en cours.

Conditions d'exposition	Limites de SAR (W/kg) (10 kHz à 10 GHz)		Limite de densité de puissance à 1 800 MHz	
	Travailleurs	Public	Travailleurs	Public
Corps entier (moyenne sur corps entier)	0,4	0,08	45 W/m ²	9 W/m ²
Tête, cou, et tronc (moyenne sur 1g de tissus)	10	2		
Membres (moyenne sur 10 g de tissus)	20	4		

*Niveau d'exposition aux rayonnements électromagnétiques dans le domaine
des Hyperfréquences*

CHAPITRE 3: LES EFFETS SPECIFIQUES DES ONDES ELECTROMAGNETIQUES NON IONISANTES SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Cette partie est consacrée à une revue bibliographique des études réalisées en laboratoire concernant les effets des champs électromagnétiques sur le système nerveux central. Les études traitant des effets cancérigènes ou mutagènes touchant le SNC ne seront pas exposées.

3.1. ETUDES REALISEES CHEZ L'HOMME

3.1.1. EFFETS SUR L'ELECTROENCEPHALOGRAMME ET SUR LE SOMMEIL

Dès 1978 Bise (Bise, 1978) publie une étude montrant des perturbations de l'électroencéphalogramme pour des puissances de l'ordre de 1 pW/cm² et pour des fréquences allant de 0.1 à 960 MHz. Il observe des changements temporaires dans la forme des ondes cérébrales et dans le comportement des sujets. Cette étude apparaît aujourd'hui difficilement exploitable ; les études de réplication ont échoué, et le niveau d'exposition choisit se trouve sous le bruit environnemental (Tell et Mantiply, 1980).

Reite et al en 1994 (Reite *et al.*, 1994) ont observé une augmentation significative du sommeil chez des sujets soumis à un rayonnement de 27,12 MHz pour un DAS de 10 W/kg. Il apparaît cependant que ces résultats sont liés à une augmentation de la température au niveau de l'hippocampe et non à un effet spécifique des ondes électromagnétiques.

Borbely et al (Borbely *et al.*, 1999) ont également travaillé sur le sommeil et ont exposé des sujets à un signal GSM toutes les 15 minutes, durant 15 minutes sur une nuit pour un DAS de 1 W/kg. Ils ont pu observer une augmentation du temps de sommeil, ainsi qu'une modification de l'EEG durant celui-ci. Ces travaux ont été

confirmés en partie par Huber et al (Huber *et al.*, 2000) qui observent après 30 minutes d'exposition à un signal GSM pour un DAS de 0,5 W/kg une augmentation durant le sommeil lent de l'énergie dans l'EEG (plus spécifiquement la bande α 12-14 Hz). En 2002 Huber (Huber *et al.*, 2002) rapportera en plus des effets identiques sur l'EEG de vigilance, mais ne remet pas en évidence un effet hypnotique.

Des effets des téléphones portables sur l'EEG ont également été rapportés par Von Klitzing (Von Klitzing, 1995), Reiser et al (Reiser *et al.*, 1995). Ces expériences utilisent les mêmes (champ de 900 MHz pulsés à 217 Hz). L'antenne était placée à 40 cm de la tête et l'exposition durait 15 min. Von Klitzing observe une augmentation immédiate de l'activité α . Reiser observe lui une augmentation, 15 min plus tard, de l'énergie dans les bandes α_2 et β . Dans une étude de 1997 Roshke et Mann (Roschke et Mann, 1997) aucune différence sur les EEG de vigilance y compris dans la bande α n'a été observée.

Mann et Roshke (Mann et Roschke, 1996) ont travaillé sur des volontaires sains qu'ils ont exposés à ce même signal durant une nuit de 8 heures. Ils ont observé une baisse du temps passé en sommeil paradoxal, mais aucune modification du sommeil lent. Cette étude a été reconduite en 1998 par Wagner et al (Wagner *et al.*, 1998). 24 sujets ont été exposés à un signal de 900 MHz pulsé à 217 Hz pour une densité de puissance de 0,2 W/m². Dans ces conditions aucune différence significative n'a pu être enregistrée entre les témoins et les personnes exposées que se soit pour le sommeil ou pour l'EEG.

Hietanen et al (Hietanen *et al.*, 2000) ont testé 5 types de téléphones différents en observant l'EEG chez 19 sujets. L'exposition s'est réalisée durant 30 min soit à 900 MHz soit à 1800 MHz. Seule une modification significative de l'énergie dans la bande δ pour un type de téléphone a été observée. L'auteur interprète cette observation comme un risque statistique et non comme un effet des ondes électromagnétiques.

Des travaux plus récents réalisés en 2003, par Kramarenko et Tan (Kramarenko et Tan, 2003) ont mis en évidence, après enregistrement par télémétrie de l'EEG, l'apparition d'onde type δ (2,5-6,0 Hz) chez l'homme après exposition à un signal GSM-900 en état de veille. La présence d'activité δ est normalement pathologique chez l'homme sain, cependant face à l'absence de cartographie et le

fait que le signal EEG soit transmis par télémetrie utilisant des ondes radio rend ces résultats difficilement interprétables.

En 2003 D'Costa et al (D'Costa *et al.*, 2003) ont observé 10 sujets éveillés exposés, à intervalles randomisés de 5 min, à un signal GSM, téléphone derrière la tête. L'analyse des résultats montre des modifications dans la bande α et β dans le mode pleine puissance. Cependant l'absence de dosimétrie et la position du téléphone rendent ces résultats inutilisables.

En 2004 Kuster et al (Kuster *et al.*, 2004) ont montré un accroissement d'énergie dans la bande 9-14 Hz pour des DAS allant de 0,5 à 1,5 W/kg.

Contrairement aux études précédentes liées à l'activité électrique spontanée, d'autres travaux ont été réalisés sur la réponse à des stimulations. Ainsi Krause et al (Krause *et al.*, 2000) ont montré une modification de la répartition spectrale de l'EEG entre 4 et 12 Hz lors de l'audition d'un mot évoquant l'un des 4 mots cibles évoqués en début de test. Ces résultats n'ont cependant pas été reproduits dans une étude réalisée en 2004 (Krause *et al.*, 2004). Trois autres études ont donné des résultats divers : sur les potentiels visuels celle d'Urban et al (Urban *et al.*, 1998) n'a rien mis en évidence, tandis que Freude et al (Freude *et al.*, 1998) montrent une diminution d'amplitude de la réponse ; celle de Eulitz et al (Eulitz *et al.*, 1998) montre une altération de l'activité électrique cérébrale suite à des stimuli électriques. Bak et al (Bak *et al.*, 2003) ont également travaillé en 2003 sur la réponse cérébrale suite à des stimuli auditifs. L'étude réalisée chez 45 volontaires sains soumis à une émission GSM n'a montré aucun effet significatif. Arai et al (Arai *et al.*, 2003) utilisent la même approche et montrent qu'après 30 min d'exposition aucun effet n'est observé.

Plusieurs revues ont été publiées faisant état des connaissances actuelles sur cette problématique. En 2002 Hamblin et Wood (Hamblin et Wood, 2002) réalisent la revue de 14 articles traitant du sommeil et de l'activité électrique cérébrale chez l'homme. Il ressort une augmentation de l'énergie dans la bande α . Cependant pour les auteurs, les articles sont difficilement comparables entre eux et sont critiquables méthodologiquement.

Cook et al en 2002 (Cook *et al.*, 2002) révèlent que l'EEG, les potentiels évoqués et certaines tâches cognitives sont modifiées sous exposition aux signaux

de la téléphonie mobile. Les auteurs signalent que ces expériences sont difficiles à interprétées.

Une revue a également été publiée par d'Andréa et al (D'Andrea *et al.*, 2003b). Cette revue porte aussi bien sur des études réalisées chez l'homme que chez l'animal, et traite de l'effet des micro-ondes sur le système nerveux de manière générale. Pour l'auteur, concernant les perturbations de l'EEG, aucune conclusion ne peut être donnée par le manque de dosimétrie mais aussi par la grande divergence de résultats.

3.1.2. EFFETS SUR LE COMPORTEMENT ET LA COGNITION

L'échauffement du tissu cérébral est connu pour entraîner des perturbations comportementales et cognitives, plusieurs études ont cependant été réalisées afin de déterminer si les ondes électromagnétiques pouvaient agir autrement que via des mécanismes thermiques.

Preece et al (Preece *et al.*, 1999) ont appliqué un signal à 915 MHz, de 1 W continu ou 0,125 W par impulsion à 217 Hz, chez 36 volontaires. Ils ont étudié l'influence de cette émission sur les temps de réactions à des tâches d'attentions et la vitesse lors des tâches de mémorisation, en pondérant par le nombre d'erreurs de tâches. Aucun effet n'a pu être observé sur la mémoire. Une accélération significative du temps de choix a pu être constatée pour une exposition sous un champ continu à 1 W. Cet effet n'apparaît pas pour le champ pulsé.

Koivisto et al (Koivisto *et al.*, 2000b) en 2000 ont recherché des effets sur les fonctions cognitives. 48 volontaires ont été exposés à un signal GSM 902 MHz modulé à 217 Hz, pour une puissance de 0,125 W. Les résultats ont mis en évidence une augmentation de la vitesse de réaction ainsi qu'une diminution du temps nécessaire pour la réalisation de tests arithmétiques. Cette étude suggère donc que l'exposition aux ondes électromagnétiques améliore légèrement les processus cognitifs. Une autre étude (Koivisto *et al.*, 2000a) a mis en évidence un effet améliorateur sur la mémoire de travail. Ces résultats sont cependant contestés face à l'absence de dosimétrie, mais aussi par l'utilisation de tests cognitifs non validés. Haarala et al (Haarala *et al.*, 2003), (Haarala *et al.*, 2004) ont tenté de reproduire la première étude en améliorant la méthodologie par une dosimétrie précise ainsi

qu'une réalisation en double aveugle. Dans ces conditions aucune différence significative n'a donc pu être observée.

Lee et al (Lee *et al.*, 2001) retrouvent des résultats allant dans le sens de l'amélioration des performances cognitives suite à une exposition. Une première étude publiée en 2001, réalisée sur 72 étudiants compare les performances sur des tests cognitifs entre un groupe d'utilisateurs de téléphone portable et un groupe de non-utilisateurs. Ainsi il est possible d'observer une plus grande capacité de concentration chez les utilisateurs de portables. Cette étude ne fait mention d'aucun DAS et présente des anomalies de randomisation pouvant biaiser les résultats. Une deuxième étude (Lee *et al.*, 2003) confirme ces résultats et montre une amélioration des tests d'attention lorsqu'il y a exposition aux ondes électromagnétiques. Cette amélioration est dose dépendante.

Edelstyn et Oldershaw (Edelstyn et Oldershaw, 2002) rapportent des différences significatives allant dans le sens d'amélioration de l'attention. Cependant pour les mêmes raisons que l'étude de Lee et al. ces résultats apparaissent difficilement exploitables.

Curcio et al (Curcio *et al.*, 2004) ont examiné les effets des RF à la fois sur la performance cognitive et sur la température tympanique. Les sujets sont répartis en deux groupes l'un exposés au 900 MHz (DAS 0,5 W/kg) avant la session de test, l'autre exposé au même signal durant la session. Les sujets sont soumis à quatre épreuves de performance : un temps de réaction acoustique, une tâche de recherche visuelle, une soustraction arithmétique et une tâche de réaction de choix acoustique. En outre la température tympanique est mesurée cinq fois durant chaque session. Les résultats débouchent sur un meilleur score lors de l'exposition pour les deux tests de temps de réponse. Ces résultats sont accompagnés d'une augmentation de la température tympanique. Ces deux effets n'apparaissent qu'au bout de 25 minutes d'exposition. Les discussions rattachent ce délai à celui de la modification de la vascularisation cérébrale.

Hinrichs et Heinz (Hinrichs et Heinze, 2004) ont réalisé une étude évaluant l'effet des GSM 1800 sur la mémoire verbale. 12 sujets furent soumis à la présentation d'une liste de mots, puis dans une seconde séance, durent distinguer les mots nouveaux de ceux présentés la première fois. Chaque sujet a subi deux sessions, l'une avec exposition au GSM (DAS 0,61 W/kg), l'autre sans exposition. Les auteurs signalent une altération des composantes analysées.

L'ensemble de ces résultats tendrait à montrer un effet améliorateur des ondes électromagnétiques sur les performances cognitives et la mémoire. Cependant la dosimétrie fait souvent défaut et il existe des biais méthodologiques, que ce soit dans les tests utilisés ou dans l'exposition des statistiques.

3.2. ETUDES REALISEES CHEZ L'ANIMAL

Tout comme chez le volontaire sain, les études réalisées sur le système nerveux central de l'animal portent sur des données électrophysiologiques et comportementales. Cependant on trouve en plus, des études portant sur la perméabilité de la barrière hémato encéphalique (BHE) et sur la neurochimie.

3.2.1. EFFETS SUR L'ELECTROENCEHALOGRAMME

De nombreuses études ont porté sur les modifications électrophysiologiques chez l'animal suite à une exposition à des champs HF. Les premières études réalisées dans les années 1960-1970, mirent ainsi en évidence des altérations de l'EEG des animaux exposés ((LuA, 1963), (Johnson et Guy, 1972), (Bawin *et al.*, 1973)). Ces résultats furent cependant rapidement discutés en raison de l'utilisation d'électrodes métalliques pour l'enregistrement de l'EEG. Dans ces conditions, il a ainsi été montré une augmentation de plus de 50 fois du DAS au sein du cerveau (Johnson et Guy, 1972). Suite à cette observation, l'utilisation d'électrodes de verre remplies d'un électrolyte (Johnson et Guy, 1972) ou des électrodes de téflon recouvertes de carbone a été conseillée afin de minimiser les perturbations de champ (Tyazhelov *et al.*, 1977), (Chou et Guy, 1979).

Les études suivantes montrent des résultats contradictoires alternant entre perturbation de l'EEG et absence d'effet.

En 1979 Takashima (Takashima *et al.*, 1979) et al ont exposé des lapins à un champ électromagnétique de 1 à 30 MHz soit de manière aiguë à 500 V/m durant 2-3h, soit de manière chronique à 90 V/m, 2h/j, durant 4-6 semaines. Dans ces conditions ils ont observé une augmentation de l'énergie des basses fréquences uniquement dans le cas d'une exposition chronique.

En 1989, Mitchell et al (Mitchell *et al.*, 1989) exposent les résultats d'une double étude réalisée dans les mêmes conditions aux USA et en URSS. 344 rats ont été exposés à un champ de 2,45 GHz, pour un DAS de 2.7 W/kg : l'EEG a été enregistré au moyen d'électrodes de verre. Dans les deux groupes des effets significatifs ont

été démontrés, cependant ces résultats, incompatibles entre eux, limitent la portée de cette étude.

Thuroczy et al (Thuroczy *et al.*, 1994) ont réalisé des expositions (2.45 GHz en continu) corps entier chez le rat à différentes puissances. Ils ont pu observer des perturbations pour les plus fortes intensités (30 mW/kg) avec une augmentation de l'énergie totale de l'EEG. Aucun effet n'est enregistré à 10 mW/kg. Dans ce même travail, une exposition localisée au niveau du cerveau 4 GHz, 42 mW/kg induit une augmentation de l'énergie dans la bande δ et pas d'effets à 8.4 mW/kg.

Plus récemment Vorobyov et al (Vorobyov *et al.*, 1997) exposent des rats vigiles à un champ de 945 MHz, 0,1-0,2 mW/m², modulé à 4 Hz, 1 minute sur 2 durant 10 min. Aucun effet n'est mis en évidence mis à part une asymétrie de l'EEG dans la bande 10-14 Hz dans les 20 premières secondes de l'exposition.

Les derniers travaux réalisés en 2003 par Marino et al (Marino *et al.*, 2003) montrent une déstructuration aléatoire de l'EEG durant l'exposition à un téléphone portable en émission, l'absence de dosimétrie rend ces résultats difficilement exploitables.

Les résultats de ces études semblent ainsi révéler un effet sur l'électrophysiologie, cependant il ressort que ces effets apparaissent pour la plus part à des niveaux d'énergie élevés.

3.2.2. EFFETS SUR LA MEMOIRE ET LE COMPORTEMENT

Certaines études ont démontré des altérations des performances mnésiques chez l'animal suite à une exposition à des champs de radiofréquences. Les principaux résultats positifs dans ce domaine ont été mis en évidence par l'équipe de Lai.

Lai et al (Lai *et al.*, 1994) ont exposé des rats à un champ de 2.45 GHz impulsionnel durant 45 min à 1 mW/cm² soit un DAS moyen de 0,6 W/kg. Dans ces conditions les rats exposés ont montré un retard d'apprentissage dans le test du labyrinthe radial à 12 bras, caractérisant une altération de la mémoire de travail. Cette déficience disparaît si les animaux sont prétraités avec un agoniste cholinergique ou un antagoniste des opiacés. Ces résultats indiquent que la

déficience mnésique observée serait due à une interaction des micro-ondes avec le système cholinergique central et les opioïdes endogènes.

Par la suite l'équipe de Lai (Wang et Lai, 2000) a confirmé ces travaux au travers d'une étude utilisant le test du labyrinthe radial. Dans cette étude les animaux exposés (DAS de 1.2 W/kg) montrent également un ralentissement de l'apprentissage et des perturbations de la mémoire spatiale.

Les tests de réplication de ces travaux ont cependant échoué. Cobb et al (Cobb *et al.*, 2004) ont tenté de répliquer les travaux de Lai de 1994. En utilisant le même protocole ils n'observent aucun effet suite à l'exposition micro-onde mais une importante létalité lors du pré traitement à physostigmine. Cassel et al (Cassel *et al.*, 2004) ont également tenté de reproduire cette étude dans les mêmes conditions et n'ont pas observé d'effet des micro-ondes sur la mémoire.

D'autres études ont été réalisées dans des conditions différentes ou avec des protocoles différents de ceux de Lai et n'ont donné que des résultats négatifs. Sienkiewicz et al (Sienkiewicz *et al.*, 2000) exposent des souris à un signal GSM 900, pour un DAS de 0.05 W/kg. Dans ces conditions, aucune différence n'est observée au test du radial maze. Durbreuil et al (Dubreuil *et al.*, 2002) ont également utilisé un signal GSM 900 pour exposer des rats durant 45 min à un DAS de 1 à 3,5 W/kg et n'ont vu aucun effet sur les performances d'apprentissage. Yamaguchi et al (Yamaguchi *et al.*, 2003) ont utilisé le test du labyrinthe après exposition des rats à un signal TDMA. Ils ont observé une augmentation du nombre d'erreurs réalisées uniquement lors d'apparition d'effets thermiques.

D'un point de vu comportemental, Cosquer et al (Cosquer *et al.*, 2005) ont testé l'effet anxiogène des micro-ondes à travers le test du labyrinthe surélevé, et n'ont pas vu d'effet.

Mis à part les expériences par Lai, qui n'ont pas pu être répliquées, aucune étude n'a pu mettre en évidence des effets sur la cognition ou sur le comportement lorsque les niveaux d'exposition sont non thermiques.

3.2.3. EFFETS SUR LA BARRIERE HEMATO ENCEPHALIQUE

La barrière hémato encéphalique, formée par les capillaires du système nerveux central et des prolongements astrocytaires, permet de réguler le passage vers le cerveau des molécules présentes dans le plasma, elle protège le SNC d'agents potentiellement neurotoxiques. Elle peut cependant être altérée par différents facteurs tel qu'un œdème, l'anoxie, l'hypertension, les radiations ionisantes.

Les premières études portant sur les effets des champs HF sur la BHE ont pu mettre en évidence une perméabilisation de la BHE à des champs faibles (Williams *et al.*, 1984c), (Williams *et al.*, 1984a), (Williams *et al.*, 1984b), (Williams *et al.*, 1984d). Ces résultats ne sont pas cependant pas toujours observés (Merritt *et al.*, 1978), (Preston *et al.*, 1979), (Ward *et al.*, 1982), ou n'ont pas pu être répliqués (Ward et Ali, 1985), ou seulement pour des niveaux élevés de puissance entraînant une augmentation de la température du cerveau (Lin et Lin, 1980), (Goldman *et al.*, 1984), (Moriyama *et al.*, 1991).

Les travaux récents montrent eux des résultats contradictoires.

Fritze et al (Fritze *et al.*, 1997) ont montré que les micro-ondes émises par les téléphones portables ne provoquent pas d'extravasation des protéines pour des DAS inférieurs à 7,5 W/kg chez le rat.

En 2000 Tsurita et al (Tsurita *et al.*, 2000) étudient la perméabilité de la BHE suite à une exposition chronique d'une heure par jour à un signal de téléphonie japonaise TDMA à 1439 MHz pour un DAS de 2 W/kg dans le cerveau et 0,25 W/kg en corps entier. La perméabilité est évaluée par deux techniques, un marquage immunohistochimique et l'étude du passage du bleu d'Evans. Les résultats ne montrent aucun effet de l'exposition.

Les résultats de ces deux études sont confirmés par Finnie et al (Finnie *et al.*, 2001), (Finnie *et al.*, 2002). En 2001 l'étude est réalisée chez la souris avec des expositions pendant une heure à un signal GSM (DAS = 4 W/kg) et ne montre aucun effet. Dans l'étude de 2002, les souris sont exposées durant toute leur vie 1 heure par jour, 5 jours par semaine, à des DAS de 0,25, 1, 2 et 4 W/kg. Quelque soit le niveau d'exposition dans cette étude aucun effet n'est observé sur la perméabilisation de la BHE.

En 2001, une équipe de l'US air force a également testé l'hypothèse de l'altération de la perméabilité de la BHE à la pyridostigmine suite à une exposition micro-onde et à un stress (Mason *et al.*, 2001). Les rats ont été exposés durant 30 min à un champ de 915 MHz pulsé pour un DAS de 0,18 et 2,48 W/kg. Dans ces conditions avec ou sans stress aucun effet sur la BHE n'a été enregistré.

D'autres études ont cependant montré une augmentation de la perméabilité de la BHE pour DAS de faible niveau. Neubauer et al (Neubauer *et al.*, 1990), exposent des rats à un champ pulsé à 2,45 GHz pour un DAS de 2 W/kg. Cette étude montre une augmentation de la perméabilité de la BHE. Le groupe de Salford et Persson a effectué une série d'études sur rats soumis à différents signaux corps entier (Salford *et al.*, 1994), (Persson *et al.*, 1997). Ils ont rapporté une augmentation de 50 % de la perméabilité pour des DAS inférieurs à 0.3 W/kg. Au-dessus de ce seuil, la perméabilité augmente avec la puissance. Les derniers travaux de 2003 (Salford *et al.*, 2003) où des rats ont été exposés durant 2 heures à un signal GSM pour des niveaux de puissance non thermique confirment ces résultats.

3.2.4. EFFETS SUR LA NEUROCHIMIE

Une action sur les neurotransmetteurs et plus particulièrement sur le système cholinergique a été rapportée par plusieurs études. Tout comme pour les études comportementales, les études neurochimiques proviennent principalement du groupe de Lai.

Lai a fait un résumé de ses recherches sur les effets neurologiques des expositions HF (Lai, 1992). Il émet l'hypothèse que les micro-ondes peuvent agir avec le système opioïde endogène (Lai *et al.*, 1991), (Lai *et al.*, 1992) ainsi que sur le système cholinergique central (Lai *et al.*, 1988), (Lai *et al.*, 1989). Les micro-ondes réduiraient le recaptage de la choline par son transporteur spécifique sodium dépendant au niveau du cortex frontal et des hippocampes. Il est également observé une augmentation compensatoire des récepteurs muscariniques (Lai et Singh, 1995). Ces résultats sont en accord avec les effets observés par ce groupe sur la mémoire et le comportement. Testylier et al (Testylier *et al.*, 2002) décrit également une diminution significative de la sécrétion d'acétylcholine chez des rats exposés à un

signal de 800 MHz et 2,45 GHz. Cette diminution est due à la perte des variations circadiennes de la sécrétions d'acétylcholine qui reste à son niveau bas.

Maussuet et al (Mausset *et al.*, 2001) ont travaillé sur un autre neurotransmetteur au niveau du cervelet, le GABA. Les rats ont été exposés à un champ de 900 MHz durant deux heures, à un DAS de 4 W/kg lorsque le champ est pulsé, et à un DAS de 32 W/kg lorsque le champ est continu. Dans les deux cas une diminution de la quantité de GABA est enregistrée, cependant il apparaît vraisemblable pour l'auteur que l'effet constaté à ces forts niveaux d'exposition soit de nature thermique.

METHODOLOGIE

- Chapitre 1** : Analyse multiparamétrique
- Chapitre 2** : Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire
- Chapitre 3** : Exposition micro-ondes et dosimétrie

CHAPITRE 1: ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE

Cette étude est en accord avec les principes de protections des animaux de laboratoires établis par le Centre de Recherche du Service de Santé des Armées. L'ensemble des protocoles expérimentaux utilisés pour ce travail a été soumis et approuvé par le comité d'éthique de l'établissement.

1.1. MODELE ANIMAL

Les animaux utilisés dans ce travail sont des rats mâles de Souche Sprague-Dawley, provenant par l'élevage R.Janvier (France). Pesant entre 250-275 g à leur arrivée, les animaux sont gardés en stabulation une semaine à l'animalerie centrale afin qu'ils atteignent le poids de 300-350 g au début de l'expérimentation. Ils sont maintenus dans une pièce à température constante (24 °C), hygrométrie constante (60 % d'humidité) et cycle d'éclairage (6h-18h) contrôlés sur un cycle lumière obscurité 12h/12h. Les animaux ont un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau de boisson.

1.2. CHIRURGIE

Les rats sont anesthésiés au moyen d'une injection intra péritonéale d'hydrate de chloral (Sigma, France) à la dose de 400 mg/kg. Les animaux sont rasés au niveau du crâne et placés dans un appareil de stéréotaxie. Le scalp est nettoyé avec de la Bétadine dermique 10%. Les animaux subissent une injection sous-cutanée de d'anesthésique local (200 µl de Bupivacaïne à 5 % laboratoire Merck, France) au niveau du crâne. En plus d'insensibiliser la zone avant incision, ce traitement permet en outre de réduire la douleur qui pourrait être ressentie au réveil et contribuer ainsi à une récupération plus rapide.

De manière à prévenir la survenue d'infection, une injection intramusculaire de 100 µl d'antibiotique Borgal[®] 7,5% (soit 20 mg sulfadoxine et 4 mg triméthoprime,

laboratoire Hoeschst Roussel Vet, France) est pratiquée avant le début de l'opération. Les animaux sont placés dans un cadre de stéréotaxie.

Le scalp du rat est incisé selon un plan sagittal médian des yeux à la nuque, les muscles latéraux sont dégagés, permettant ainsi un accès aux os pariétaux du crâne. Afin d'enlever le périoste, les os sont grattés à l'aide d'un scalpel, puis décapés au moyen d'une solution d'acide citrique 10 % et de chlorure ferrique 3 %. L'os est par la suite enduit d'une couche d'adhésif dentaire (superbound[®]) permettant une meilleure tenue de la résine acrylique utilisée lors de la confection de l'implant.

Le crâne est percé au niveau des aires cérébrales corticales (milieu des os pariétaux) et des aires somesthésiques (coin antero-latéral des os pariétaux) afin d'implanter 4 électrodes épidurales (2 électrodes hippocampiques, 2 électrodes visuelles) permettant l'enregistrement de l'électroencéphalogramme. Les électrodes faites de fils d'argent sont mises en place à la surface du cerveau. L'électromyogramme est enregistré au moyen de 2 électrodes positionnées entre les muscles du cou. La température est mesurée par une thermistance (30 k Ω à 20 °C) placée entre les électrodes musculaires. Les 6 électrodes, ainsi que la thermistance sont soudées à un micro connecteur 8 broches. L'ensemble est partiellement immobilisé par de la résine acrylique dentaire (Duraliner II, Reliance, France).

Afin de permettre le passage du guide de sonde de microdialyse (MAB 6.14.IC, Microbiotech, Suède) , une fenêtre est aménagée dans le crâne. La zone dialysée se trouvant au niveau du CA 3 de l'hippocampe, le repérage se fait à partir du bregma, d'après l'atlas de Paxinos (Paxinos et Watson, 1986), aux coordonnées : -5,6 mm en antéropostérieur, -5 mm latéral. Après avoir percé la dure mère, le guide peut être descendu au moyen d'un micromanipulateur à -4 mm à partir de la surface du cerveau.

Connecteur et guide de sonde sont scellés par de la résine acrylique (Duraliner II, Reliance, France). La peau du crâne est suturée en avant et en arrière du connecteur. La plaie est désinfectée à la Bétadine dermique. Une pommade Néomycine-hydrocortisone (Vétoquinol, France) est appliquée au niveau des berges de l'incision afin de minimiser l'inflammation et les risques d'infection.

Pour limiter la douleur qui pourrait être ressentie au réveil et permettre une meilleure récupération, les animaux reçoivent une injection sous-cutanée

d'analgésique, 100 μ l de Finadine[®] (laboratoires Schering-Plough Vétérinaire, France) soit 1 mg de Flunixin.

Pour la récupération du choc opératoire les animaux sont mis au repos 7 jours.

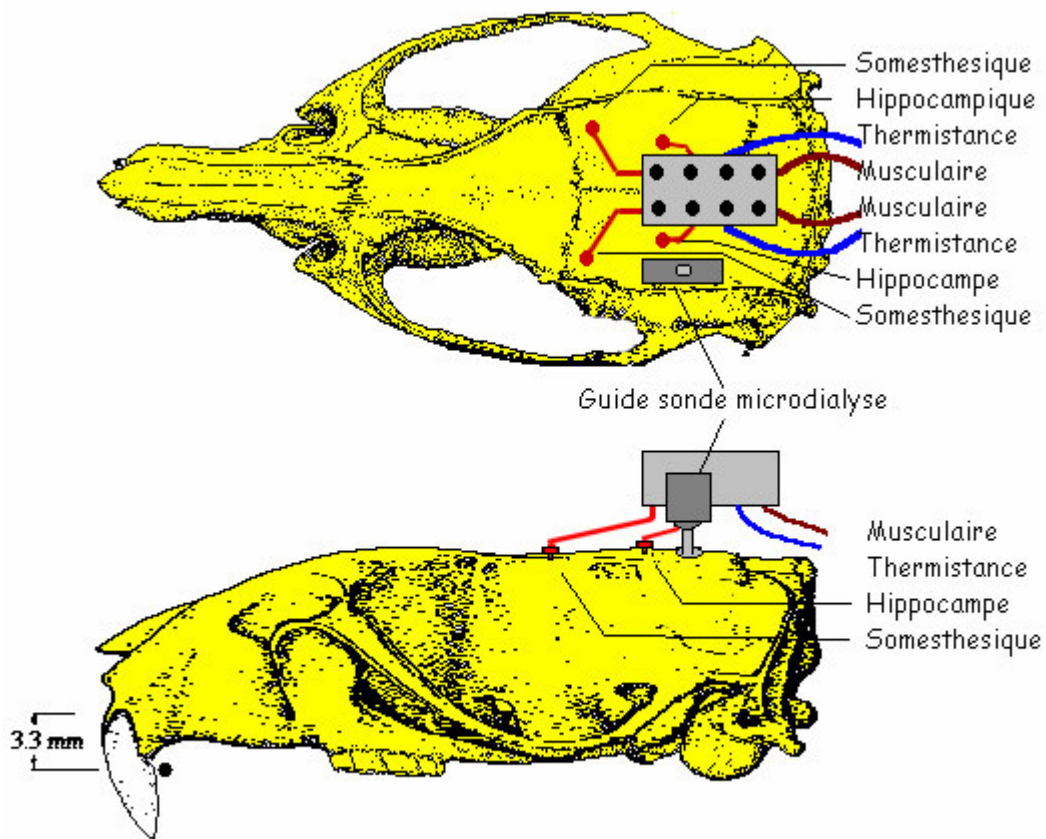


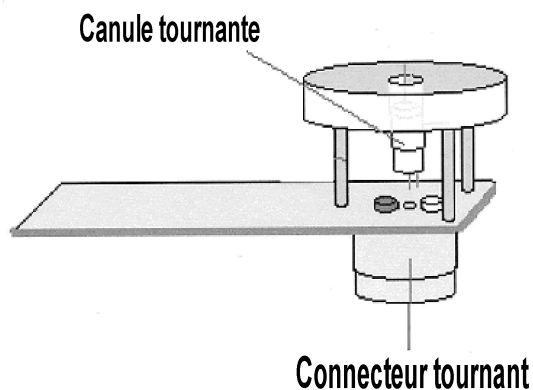
Schéma d'implantation, comportant les électrodes pour l'enregistrement de l'EEG ainsi que le guide sonde de microdialyse

1.3. MONITORAGE DES ANIMAUX

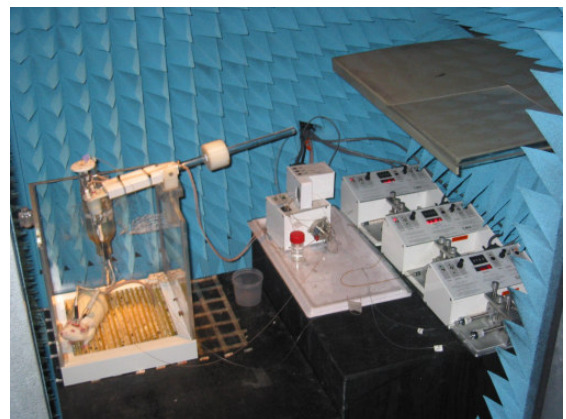
1.3.1. MISE EN PLACE DES ANIMAUX

Le jour de l'expérience les animaux, non anesthésiés, sont placés dans une cage de plexiglas, elle-même située au sein d'une chambre anéchoïque limitant la réflexion des ondes électromagnétique et permettant une homogénéité de l'irradiation. Les animaux sont raccordés aux systèmes d'acquisition électroencéphalographique, électromyographique et de température au moyen d'un câble relié à un connecteur tournant. La sonde de microdialyse est introduite dans le guide de sonde, puis est reliée par un système de micro tubulures, aux pompes de micro perfusion. Les micro-tubulures passent au travers du connecteur tournant et gagnent une canule tournante permettant de limiter les risques d'enroulement avec le câble.

Les enregistrements sont synchronisés à midi pour une durée de 72 heures. Le comportement des animaux est contrôlé durant toute l'expérimentation grâce à une camera vidéo infra rouge placée au dessus de la cage.



*Schéma du connecteur tournant
associé à la canule tournante*



*Photo d'un rat mis en place pour
expérimentation*

1.3.2. ENREGISTREMENT ET ANALYSE DE L'EEG ET DE L'EMG

L'acquisition des signaux EEG et EMG est réalisée en continue sur deux canaux séparés d'un électroencéphalographe de type Alvar REEGA 8. L'EEG est enregistré à partir des électrodes implantées au-dessus du cortex somatosensoriel et au-dessus de l'hippocampe d'un même hémisphère. Généralement l'enregistrement est réalisé au niveau de l'hémisphère droit, coté contralatéral de la sonde, cependant si une électrode apparaît être défailante, l'enregistrement est réalisé du coté hypsilatéral gauche. L'EMG est enregistré lui à partir des deux électrodes musculaires. Afin de limiter les parasites, les signaux sont traités par des filtres analogiques de type coupe bande à 50 Hz et de type passe bas à 70 Hz.

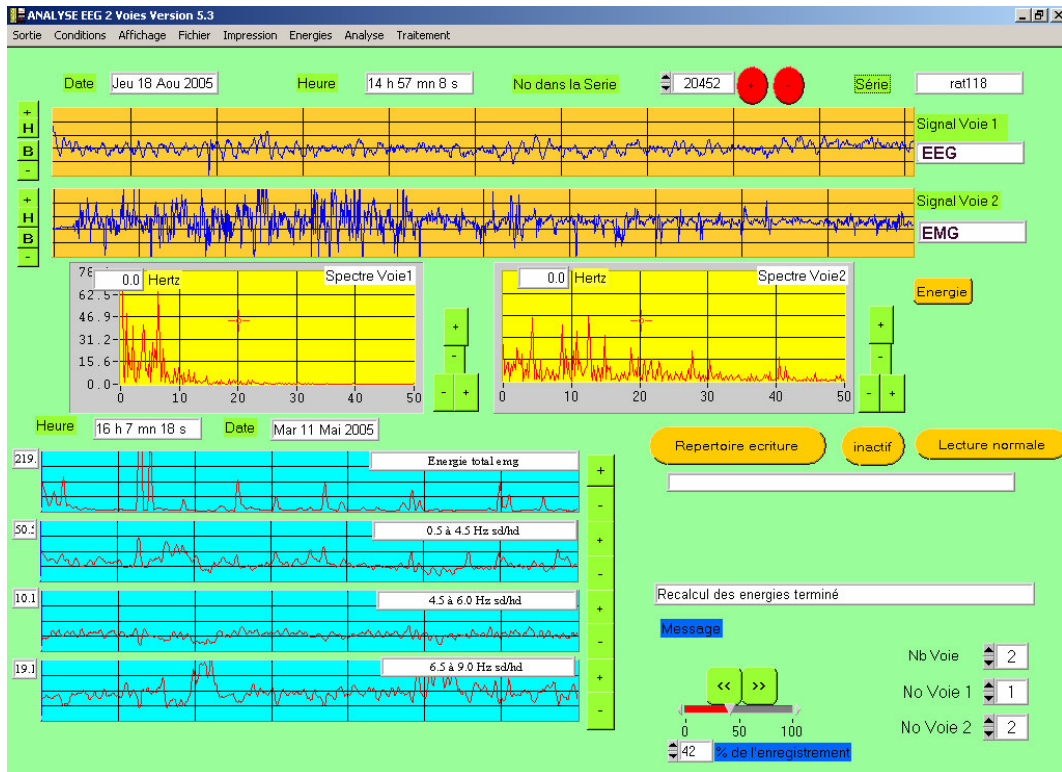
Par la suite, l'enregistrement et l'analyse des résultats sont réalisés au moyen d'un logiciel Labwindows développé au sein du laboratoire. Les signaux sont digitalisés à la fréquence d'échantillonnage de 200 Hz et stockés sur un ordinateur grâce à une carte d'acquisition de type PCI 6032 E (National instrument).

EEG et EMG sont segmentés en période de 5,12 s. Pour chaque période l'énergie totale spectrale est calculée, puis une transformée de Fourier est réalisée sur l'EEG permettant d'extraire l'énergie pour différentes bandes de fréquences (Bande δ : 0,5 - 4 Hz; bande θ : 4 – 9 Hz (divisée elle-même en θ lent : 4 - 6,5 Hz et θ rapide : 6,5 – 9 Hz), bande α : 9 – 14 Hz). Pour chaque bande de fréquence l'énergie est exprimée comme un pourcentage de l'énergie spectrale totale.

Une analyse statistique de la distribution des 1024 points acquis au cours de chaque segment du signal EEG est également réalisée comme décrit par Karasinski (Karasinski *et al.*, 1994) . La déviation standard (SD), le skeweness (Sk) et le Kurtosis (K) sont calculés.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad Sk = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum \left(\frac{x_i - \bar{x}}{SD} \right)^3$$

$$K = \left\{ \frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)} \sum \left(\frac{x_i - \bar{x}}{SD} \right)^2 \right\} - \frac{3(n-1)^2}{(n-2)(n-3)}$$



Ecran du programme permettant l'analyse spectrale

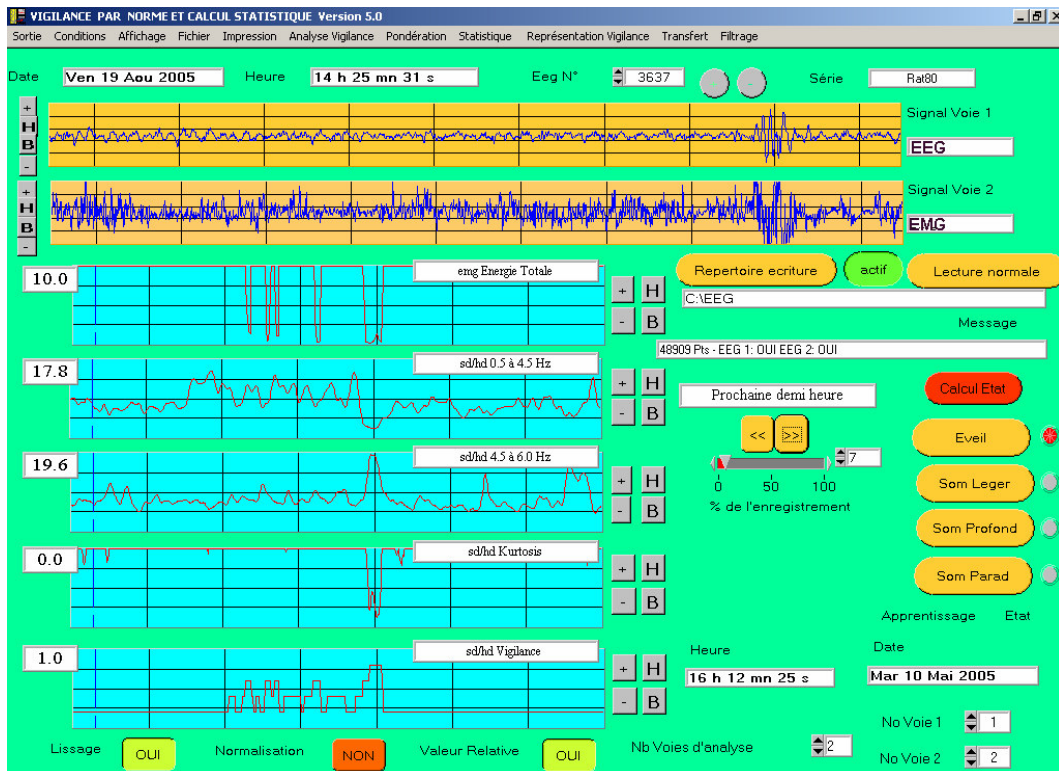
1.3.3. ANALYSE DE LA VIGILANCE

Le temps passé dans les différents états de vigilance est quantifié au moyen d'un système d'analyse automatique de la vigilance. Ce système développé au sein du laboratoire est basé sur plusieurs méthodes décrites dans la littérature ((Itowi *et al.*, 1990), (Karasinski *et al.*, 1994), (Neckelmann *et al.*, 1994), (Robert *et al.*, 1999)). Il est possible de distinguer, chez le rat, 3 états de vigilance, l'éveil (E), le sommeil paradoxal (SP), et le sommeil lent (SL), lui-même divisé en sommeil lent léger (SLI), et sommeil lent profond (SLp).

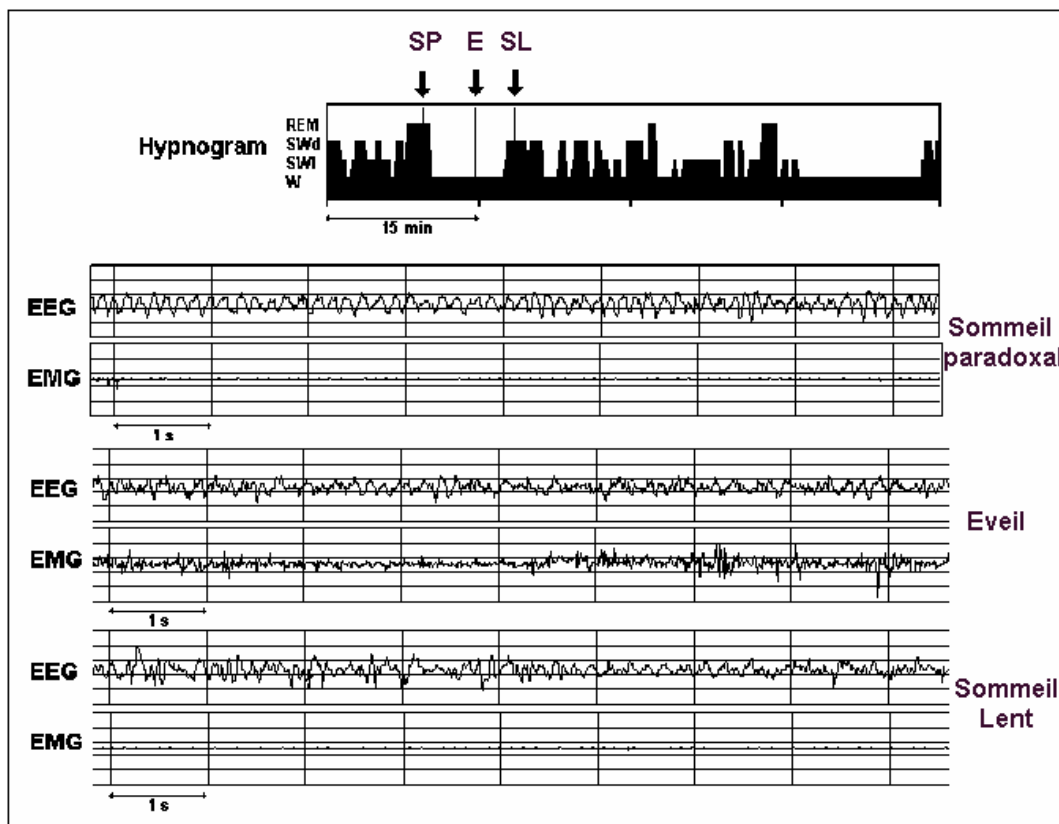
Un état est défini pour chacune des périodes de 5,12 s à partir des données de l'EEG et de l'EMG tel que l'énergie totale, l'énergie par bande de fréquence et les différents paramètres statistiques.

Pour chaque rat, avant de procéder à l'analyse automatique de vigilance, il est nécessaire de procéder à une session d'apprentissage pour paramétrer le programme. Celle-ci consiste à identifier visuellement environ 50 périodes spécifiques de chaque état. Les critères de sélection sont pour l'éveil, une énergie relative faible dans la bande δ , moyenne dans la bande θ , élevée dans l'EMG. Le sommeil lent est caractérisé par une énergie relative importante dans la bande δ et peu d'énergie dans l'EMG, le sommeil paradoxal présente une énergie relative importante dans la bande θ , avec un Kurtosis négatif et une absence d'énergie dans l'EMG.

Une fois les différents états caractérisés, le programme peut alors comparer chaque période de l'enregistrement avec les périodes de références. La concordance entre ce système d'analyse automatique et une analyse visuelle est supérieure à 95%.



Ecran du programme permettant l'analyse de la vigilance

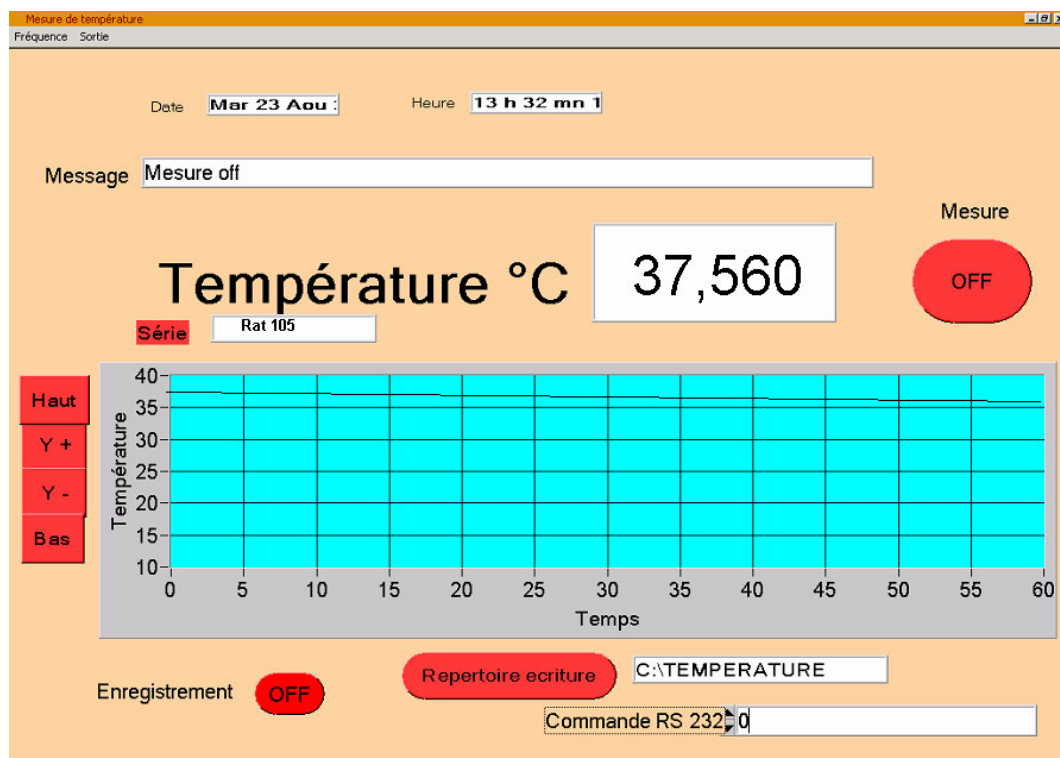


Exemple d'hypnogramme obtenu sur une période d'une heure, avec les spectres EEG et EMG spécifique de chaque état de vigilance

1.3.4. MESURE DE LA TEMPERATURE

La température corporelle des animaux est mesurée toutes les dix minutes. La thermistance est reliée à un système de mesure basé sur le principe de multivibrateur astable décrit par Valvano (Valvano, 2000). Dans ce type de système, la mesure n'est pas réalisée par la lecture directe de la valeur de la résistance de la thermistance, mais par la mesure des variations de fréquences d'un oscillateur. Ce système permet d'avoir une plus grande précision de mesure, de l'ordre de $\pm 0,05^\circ\text{C}$.

De manière à prévenir les perturbations des signaux EEG et EMG liées à l'utilisation de l'oscillateur, le système de mesure de température n'est allumé que durant les 10 s nécessaires à la mesure. La mise en route ainsi que le traitement et le stockage des valeurs sont réalisés par un logiciel de type Labwindows développé dans le laboratoire.



Ecran du programme permettant la mesure de la température

1.3.5. MESURE DE LA CONCENTRATION D'ACETYLCHOLINE

La mesure de la concentration d'ACh est réalisée toutes les heures par un système en temps réel (en ligne).

Cette mesure nécessite deux étapes distinctes, la première correspond à l'extraction du neurotransmetteur du milieu extracellulaire par la technique de microdialyse, la seconde elle, correspond au dosage à proprement parler de la molécule dans le dialysat. Le dosage est réalisé par chromatographie liquide haute performance.

Ces deux techniques ont été couplées, permettant de réaliser le dosage directement à la suite de l'extraction et ainsi de rendre compte immédiatement d'un problème survenant sur chaîne de mesure, mais également de limiter le temps de manipulation. La coordination des deux étapes est confiée à un logiciel de pilotage mis au point dans l'unité.

1.3.5.1. Microdialyse

La microdialyse est une technique de prélèvement des molécules présentes dans le milieu extra cellulaire. Cette technique utilisée in-vivo, peut être utilisée sur des animaux vigils. Elle est basée sur le principe de diffusion passive des molécules allant du milieu le plus concentré au milieu le moins concentré pour une molécule donnée, selon le principe de la loi de Fick. La sonde de microdialyse formée en partie d'une membrane semi-perméable est perfusée de manière continue par une solution biologiquement neutre.

Le choix de la sonde étant un élément primordial, nous avons utilisé des sondes MAB 6 (Microbiotech, Suède) dont la membrane est faite en polyethersulfane (PES) avec une perméabilité limite de 15 000 Da permettant le passage de l'ACh. La membrane mesure 4 mm de longueur et 0,6 mm de diamètre externe. Les sondes sont fabriquées sans métal de manière à limiter les interactions avec les micro-ondes.

La sonde est parcourue à un débit de 2 µl/min par une solution de Ringer (NaCl 148 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,2 mM ; MgCl₂ 1,2 mM) correspondant à du liquide céphalorachidien artificiel. De la néostigmine, un inhibiteur réversible des

acétylcholinestérases, est rajoutée à cette solution afin de limiter l'hydrolyse de l'ACh au niveau de la membrane (Maysinger *et al.*, 1988) et donc d'augmenter le taux de base d'ACh prélevé et la précision de la mesure.

Le rendement de prélèvement obtenu dans ces conditions est de l'ordre de 20 %.

L'échantillon est collecté durant 45 minutes puis est injecté sur le système de chromatographie liquide haute performance. La boucle d'injection est ensuite rincée, puis une solution standard de concentration d'ACh connue est injectée de manière à déterminer la concentration d'ACh du prélèvement.

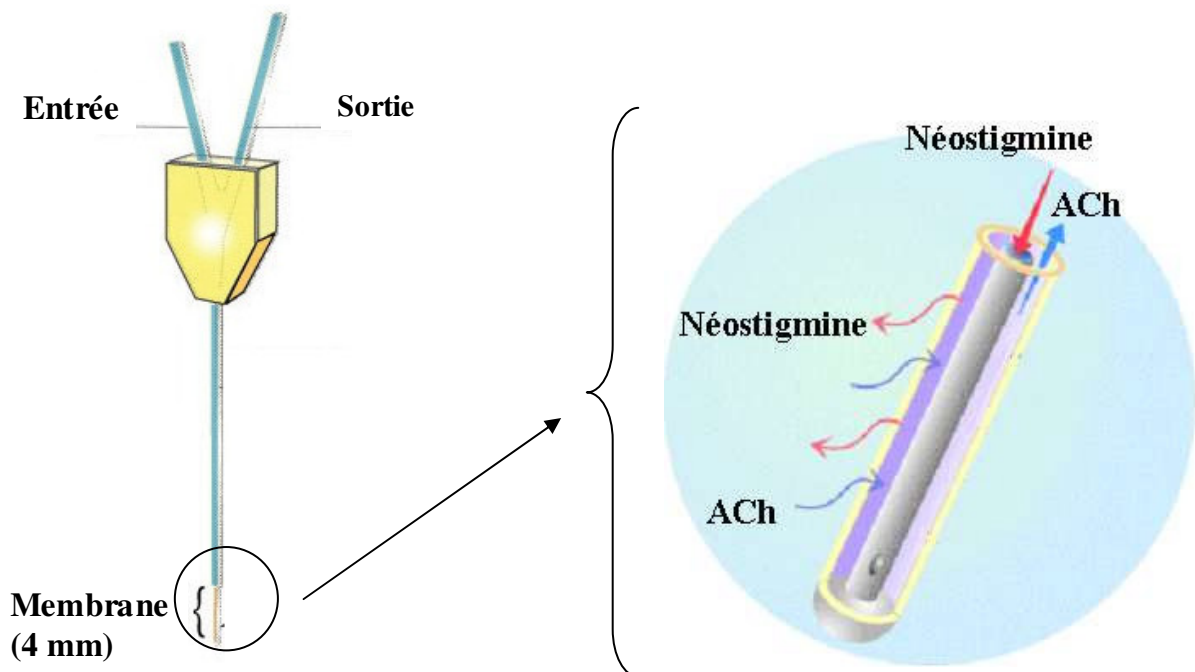


Schéma d'une sonde de microdialyse (d'après CMA), avec représentation agrandie de la membrane et du phénomène de diffusion

1.3.5.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Le dosage de l'ACh se fait par CLHP ionique. Le système est parcouru par une phase mobile aqueuse composée de : Hydrogénosphosphate dipotassique K_2HPO_4 , $3H_2O$ à 75 mM, EDTA (EthylèneDiamine TétrAcétique ; chélateur des cations, notamment du calcium mais aussi des ions métalliques) à 0,1mM, KCl à 5mM, Acide 1-octo-sulfonique (utilisé comme détergent) à 2,3 mM, TMA (TétraMéthylAmmonium hydroxyde) à 5,5 mM, ainsi que 1 ml d'antibactérien (Bioanalytical System, USA). Le pH est ajusté à pH 8 à l'aide d'une solution de Dihydrogénosphosphate de potassium KH_2PO_4 à 75 mM. La phase mobile est filtrée à 0,22 microns. De manière à protéger la colonne analytique, la phase mobile est saturée en silice par la colonne de saturation.

La colonne analytique est une colonne (*Interchim UP5 ODB # 10 QS France*) de silice sur laquelle sont greffées des chaînes carbonées C18. L'acide 1-octo-sulfonique va se lier sur ces chaînes carbonées apolaires, en laissant son extrémité chargée libre. C'est sur cette extrémité que va se fixer l'ACh, contenu dans les échantillons. Le tétraméthyl ammonium va déloger l'ACh par compétitivité polaire. L'ACh va sortir de la colonne et poursuivre son trajet dans le réacteur enzymatique (IMER Chrompack, Inrechim, France).

Ce post-réacteur contient 80 U d'AChE (qui va dégrader l'ACh en choline) et 40 U de choline oxydase (qui va transformer la choline en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et bétaïne). L' H_2O_2 va être oxydé, à un potentiel de 300 mV, par une électrode de platine d'un détecteur électrochimique Coulochem II. Le signal du détecteur ampérométrique est envoyé à un ordinateur et les données sont analysées avec un logiciel Labwindows ; l'intensité du courant induite après l'oxydation d' H_2O_2 étant proportionnelle à la quantité d'ACh initiale. Le débit est maintenu à 0,4 l/min par une pompe (*Esa, USA*) à haute pression (110 bars en moyenne), permettant un temps de rétention d'environ 7 min pour l'ACh.

La calibration du système est réalisée avec des injections de solutions standards d'ACh à 100 nM.

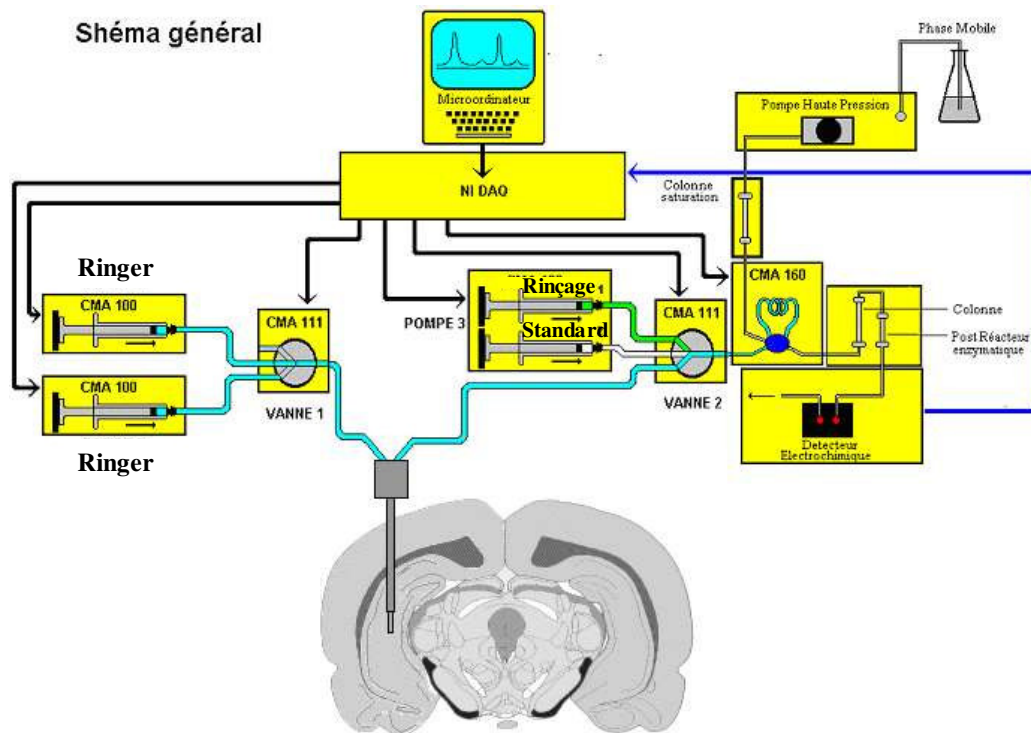
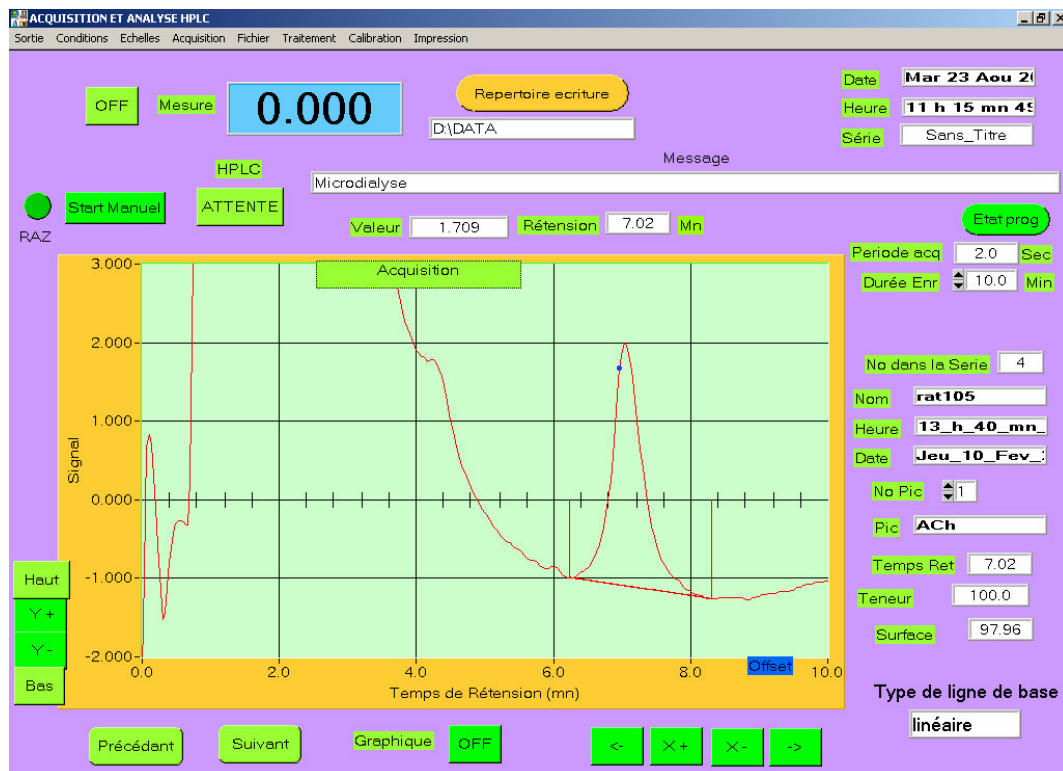


Schéma général du système de mesure de la concentration d'ACh intracérébral



Ecran du programme permettant l'analyse de la concentration d'ACh

1.4. FIN DE L'EXPERIMENTATION

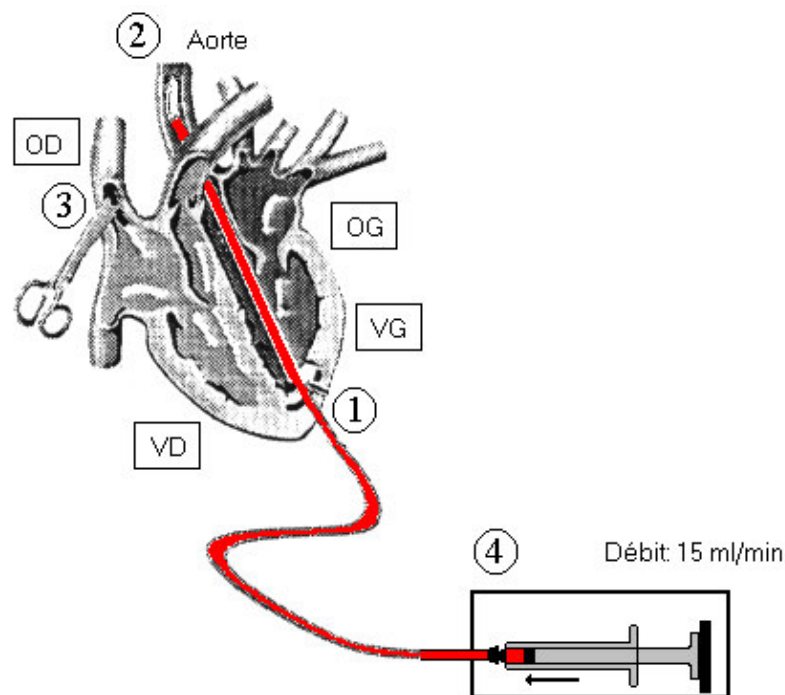
A la fin de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés au moyen d'une injection intra péritonéale létale de pentobarbital sodique (Doletal, Vetoquinol, France). Les cerveaux sont prélevés selon les différents protocoles nécessaires aux analyses post mortem décrites par la suite.

1.4.1. PRELEVEMENT POUR ANALYSE HISTOLOGIQUE

Les 20 premiers animaux de l'expérimentation ont subi un prélèvement des cerveaux en vue d'une analyse histologique. Cette analyse a pour but de vérifier le bon positionnement de la sonde de microdialyse, ainsi que l'étendue des différentes réactions du tissu au niveau de la sonde de microdialyse et des électrodes.

Une fois le rat profondément anesthésié, la cage thoracique est ouverte et le péricarde est dégagé. Une petite incision du ventricule gauche à la proximité de la pointe du cœur est effectuée (①). La pompe est amorcée. Une canule est alors introduite délicatement dans le ventricule gauche, de manière à parvenir jusqu'à l'aorte (②). L'oreillette droite est immédiatement incisée pour éviter une surpression néfaste au bon écoulement des fluides (③). Le rat est d'abord perfusé par 200 ml de sérum physiologique hépariné (500 µl d'héparine pour 500 ml de sérum physiologique). Ensuite, il est perfusé pendant 20 min, par 300 ml d'un mélange fixateur (formol à 35 % en solution acétique 4 %) (④). Le débit est maintenu constant à 15 ml/min tout au long de la perfusion. Après la dissection, le cerveau est post-fixé une nuit à 4 °C dans du formol salin à 35 %. Le lendemain, le cerveau est rincé et conservé à 4 °C dans du formol salin 35 %.

Pour l'histologie, le cerveau est rincé 2 heures à l'eau courante, tranché au microtome au niveau des zones d'implantation de la sonde de microdialyse et des électrodes. Les cerveaux sont inclus dans la paraffine puis coupés et dyshydratés. La lecture des lames se fait après coloration à l'Hemateine-Phloxine.



**Sérum physiologique hépariné
puis
Formol 35 % en solution acétique 4 %**

Méthode de perfusion

1.4.2. PRELEVEMENT DE STRUCTURES CEREBRALES ET DOSAGE DE L'ACTIVITE ACETYLCHOLINESTERASIQUE

Afin de déterminer l'influence de la néostigmine présente dans la solution de perfusion de microdialyse, une mesure de l'activité des acétylcholinestérases a été réalisée dans différentes structures sur quelques animaux.

La mort constatée après injection de pentobarbital sodique, les animaux sont décapités, les cerveaux extraits de la boîte crânienne puis les hippocampes gauche, droit, les striatums gauche, droit, et le tronc cérébral sont disséqués.

Chaque prélèvement est homogénéisé avec un potter dans un tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7,2) contenant NaCl 1 M, éthylène glycol-bis(béta-aminoethyl éther) N,N,N',N'-tétraacétate (EGTA) 1mM, et Triton X 100 (1%, v/v). L'homogénat est centrifugé (20 000 rpm pendant 20 min, Sorval SS34) et le surnageant est utilisé pour déterminer l'activité de l'AChE suivant la méthode d'Ellman (Ellman G.L *et al.*,

1961). La lecture est réalisée sur un spectrophotomètre (Shimatzu, Japon) a 412 nm. L'activité étant ramenée à la quantité totale de protéine, la concentration totale en protéines est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique de Lowry (1951) (Lowry *et al.*, 1951).

1.4.3. PRELEVEMENT DE STRUCTURES CEREBRALES EN VUE D'ANALYSES PAR RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

De même que précédemment, une fois la mort constatée, le cerveau est disséqué.

Les hippocampes sont prélevés puis immédiatement congelés dans l'azote liquide afin d'être par la suite analysés par RMN-HR MAS. Cette technique permet d'obtenir un spectre des métabolites présents dans le tissu sans réaliser de traitement particulier de l'échantillon.

Les hémisphères cérébraux dépourvus des hippocampes sont utilisés pour réaliser une étude de la composition lipidique du tissu par RMN liquide haute résolution. Ils sont homogénéisés avec un potter dans un mélange chloroforme, méthanol eau (2 : 1 : 0,8), suivant la méthode de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959). Les extraits sont évaporés, redissouts dans un mélange méthanol, chloroforme deutérés (4 : 1) puis placés dans un tube RMN (500 µl).

1.5. STATISTIQUES

L'ensemble des résultats est présenté sous la forme moyenne \pm SEM de n individus, n étant indiqué pour chaque groupe.

Les tests statistiques paramétriques reposent sur deux hypothèses, la normalité de la distribution (pratiquement impossible à vérifier sur de petits échantillons) et l'homogénéité des variances qu'il est possible d'évaluer au moyen de tests spécifiques (test de Bartlett par exemple). Ayant trouvé une hétérogénéité des variances dans les différents cas étudiés, nous avons utilisé des tests non paramétriques.

La significativité est donc déterminée en utilisant le test de Wilcoxon pour des comparaisons à l'intérieur d'un groupe, le test U de Mann et Whitney pour des comparaisons inter groupes. Lors de comparaison de groupes multiples où plusieurs paramètres peuvent varier nous avons utilisé le test de Newmans-Keuls. Lors de la détermination de corrélations significatives entre les différents paramètres, le test R de Spearman a été utilisé.

L'ensemble des calculs a été réalisé au moyen du logiciel Statistica Software Version 6.1 (Statsoft).

CHAPITRE 2: ANALYSE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

Les spectres RMN ont été réalisés au sein de l'unité de biophysique cellulaire et moléculaire du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées.

2.1. RMN LIQUIDE HAUTE RESOLUTION

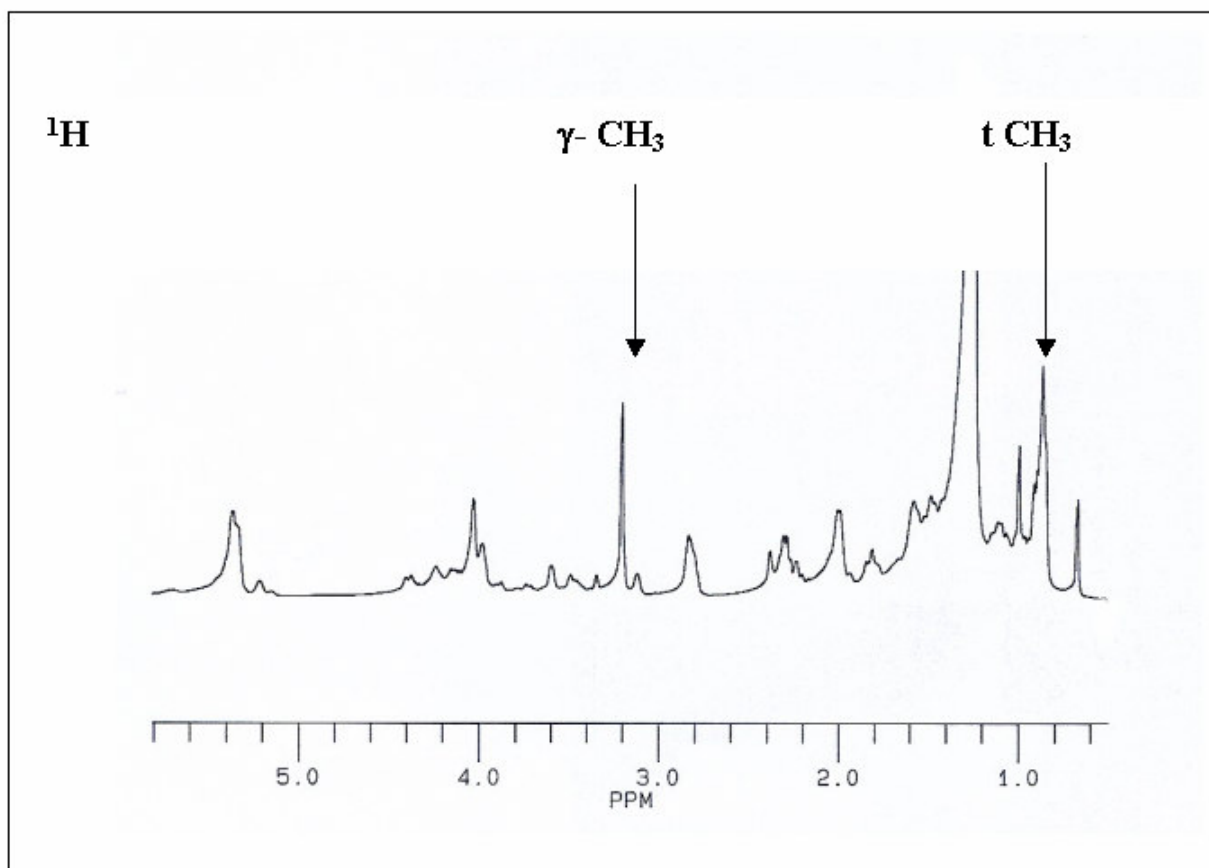
La RMN liquide haute résolution a été utilisée pour étudier la composition lipidique de tissus à partir d'extrait lipidiques.

Tous les spectres réalisés sur les extraits ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre RMN AM 400-WB Bruker (9,4 T) muni d'une sonde BB-HR 5 mm reverse.

2.1.1. RMN DU PROTON ^1H

Les spectres de RMN du proton ont été enregistrés à 400,13 MHz, en utilisant une fenêtre spectrale de 4000 Hz, sur un fichier SI=32 K. L'acquisition a été réalisée à la température de 303 K. Un filtrage exponentiel de 1 Hz a été appliqué au signal en temps (FID), avant la transformée de Fourier.

Face au nombre et à l'importance des résonances du cholestérol, la majeure partie des résonances ne peuvent pas être utilisées. Seules les résonances du méthyle en position γ des groupes des cholines ainsi que celle des protons du méthyle en C 18 des chaînes ont été prises en compte, leur intégrale a été utilisée sous forme de rapport à l'intégrale de la totalité de la région 0-3 ppm.



Spectre en RMN du proton ^1H

($\gamma\text{-CH}_3$: groupe N-triméthyles des cholines, $t\text{-CH}_3$: méthyles terminaux des chaînes d'acides gras)

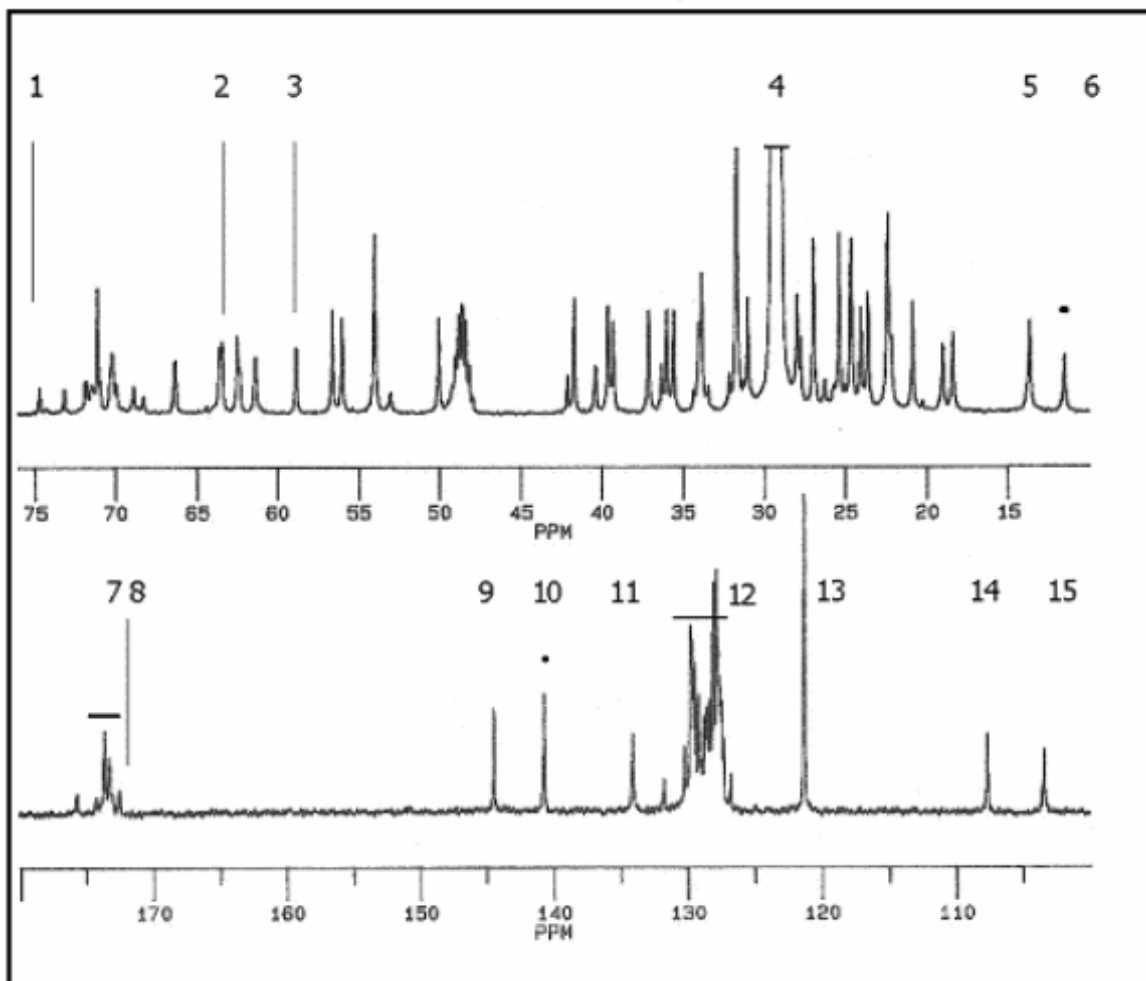
2.1.2. RMN DU CARBONE ¹³C

Les spectres ¹³C-RMN à 100,6 MHz ont été enregistrés sur une fenêtre de 20000 Hz, et sur un fichier de 64 K. Lors des expériences la température a été maintenue constante à 303 K. Une impulsion de 90° a été appliquée avec un temps de recyclage de 3 s. Un filtrage de 2 Hz de la réponse en temps et un découplage du proton ont également été utilisés.

L'attribution des résonances en C¹³ a été réalisée en suivant les données de la littérature et contrôlée au moyen d'expériences de corrélation hétéronucléaires à une dimension (DEPT) et à deux dimension (XHCORR). Les résultats ont été déterminés à partir de l'intensité des pics, excepté pour les régions des carbones carboxyliques CO (175-185 ppm) et CH méthyliniques (129-132) qui ont été intégrés en raison de leur chevauchement avec d'autres résonances. Toutes les mesures ont été normalisées par rapport à la résonance du C5 du cholestérol pour la région 180-100 ppm, et par rapport celle du C 18 du cholestérol pour la région 70-10 ppm.

Les différents index utilisés sont indiqués dans le tableau suivant :

Critère	Résonance utilisée
Longueur de Chaîne	CH ₃ (14.5ppm)/(CH ₃ (14.5ppm)+CH ₂ (29.8-31.2ppm)+CH(128-131ppm)+CO(174.2-176ppm))
Instauration	CH(128-131ppm)/((CH ₃ (14.5ppm)+CH ₂ (29.8-31.2ppm)+CH(128-131ppm)+CO(174.2-176ppm))
Longueur de chaîne /Glycerol	CH(128-131ppm)/(glycerol 64ppm)
Phosphatidil Serine / Phospholipide total	PS(56ppm)/((PS(56ppm)+PI(75ppm)+PC(54ppm)+ PE(42ppm))
Phosphatidil Inositol / Phospholipide total	PI(75ppm)/((PI(75ppm)+PS(56ppm)+PC(54ppm)+ PE(42ppm))
Choline+Sphingomyeline / Phospholipide total	PC-SPM _γ (54ppm)/((PS(56ppm)+PI(75ppm)+PC(54ppm)+ PE(42ppm))
Phosphatidil éthanolamine / Phospholipide total	PE(42ppm)/PI(75ppm)+(PS(56ppm)+ PE(42ppm)+PC(54ppm))
Partie glucidique / Phospholipide total	Sugar-C1(104.1)/((PS(56ppm)+PI(75ppm)+PC(54ppm)+ PE(42ppm))
Cholestérol / Chaîne	(CholC5(142.6ppm)+cholC6(121.7ppm))/((CH ₃ (14.5ppm)+CH ₂ (29.8-31.2ppm)+CH(128-131ppm)+CO(174.2-176ppm))



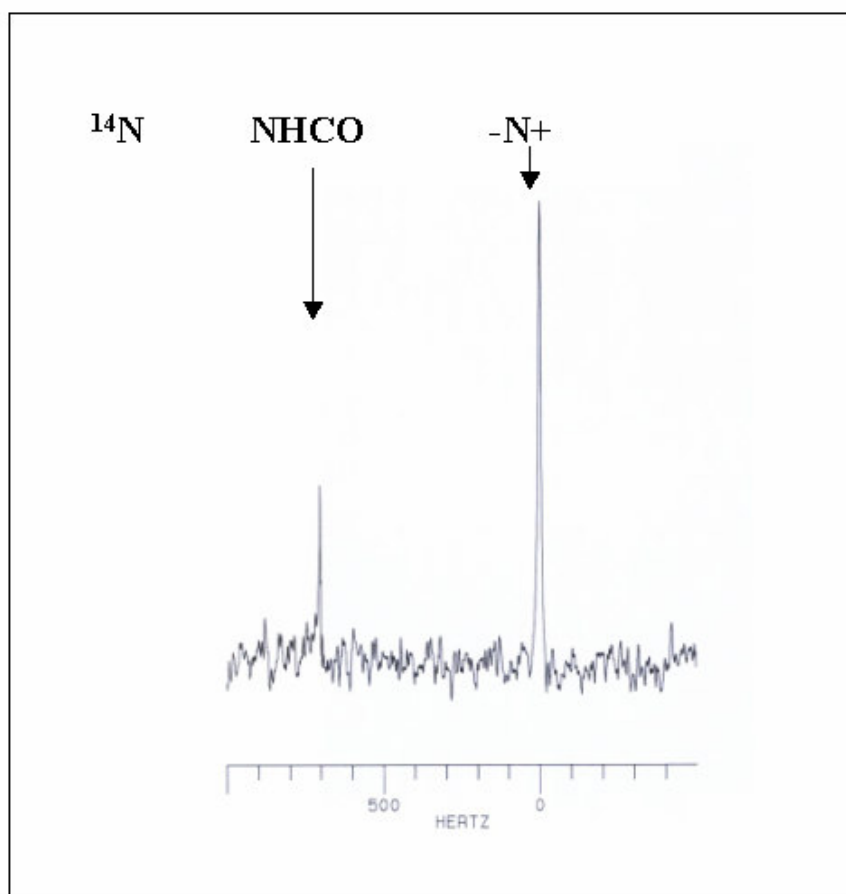
Spectre en RMN du carbone ¹³C

(1: phosphatidyl inositol, 2: C_β des cholines et sphingomyéline, 3: C₁ glycérol, 4: Méthylènes dans chaînes (CH₂), 5: t-CH₃, 6: C18 Cholestérol, 7: CO Carboxyle, 8: C_γ diphosphatidylserine, 9: phosphatidil éthanolamine + plasmalogène C1', 10: C5 cholestérol, 11: Sphingomyéline + galactocérebroside C4', 12: Méthynes dans chaîne (CH=CH), 13: C6 Cholestérol, 14: phosphatidyl éthanolamine + plasmalogène C1', 15: Sucre C1)

2.1.3. RMN DE L'AZOTE ^{14}N

Les spectres ^{14}N -RMN à 28,9 MHz ont été enregistrés sur une fenêtre de 5000 Hz, et sur un fichier de 16 K. L'acquisition a été réalisée à la température de 303 K. Une impulsion simple de 60° a été appliquée avec un temps de recyclage de 5s. Le découplage du proton a été effectué pendant l'acquisition pour éviter les effets Overhauser négatifs.

Les deux pics du spectre ont été attribués en suivant la littérature. Après correction de la ligne de base, les intensités respectives des résonances des Amines (800 Hz) et des Ammoniums (fixé à 0 Hz) ont été mesurées et le taux NH_2/N^+ utilisé pour analyse statistique.

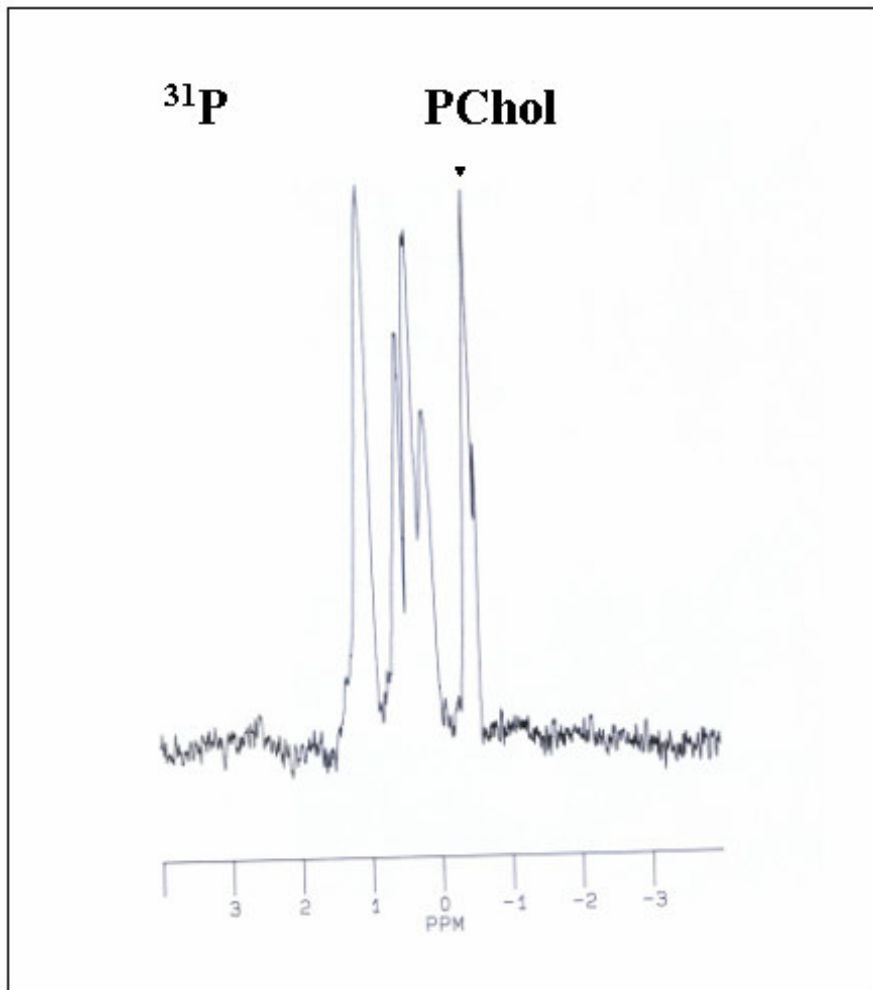


*Spectre en RMN de l'azote ^{14}N
(NHCO: Amine I et Amine II, N^+ : Ammonium)*

2.1.4. RMN DU PHOSPHORE ^{31}P

Les spectres RMN du phosphore 31 ont été enregistrés à 161.98 MHz, à la température de 303 K. Chaque spectre a été enregistré sur une fenêtre de 6000 Hz, et un fichier de 8K. Un filtrage de 2 Hz de la réponse en temps et un découplage composite du proton ont été utilisés.

Les spectres ^{31}P étant pour la plupart inexploitable, les résultats de l'étude du phosphore n'ont pas été exploités.



*Spectre en RMN du phosphore ^{31}P
(PChol: phosphore choline et sphingomyeline)*

2.2. RMN HR-MAS (¹H)

La RMN HR-MAS permet la réalisation de spectres haute résolution des métabolites présents dans un tissu sans préparation de l'échantillon. Cette technique est basée sur le principe d'une solubilisation virtuelle de l'échantillon grâce à une rotation à très grande vitesse (4000 Hz) au sein de la sonde RMN.

Les biopsies de 15 à 20 mg sont placées dans un rotor en oxyde de zirconium contenant un insert sphérique (Cortecnet, Paris). 50 µL d'une solution de TSP diluée à 3 mM dans de l'eau deutérée (D₂O) sont ajoutés comme référence. Le rotor est immédiatement transféré dans la sonde HR-MAS, l'acquisition débute 5 minutes plus tard, temps nécessaire permettant d'obtenir l'équilibration de la température (4 °C) et de la vitesse de rotation (4000 Hz).

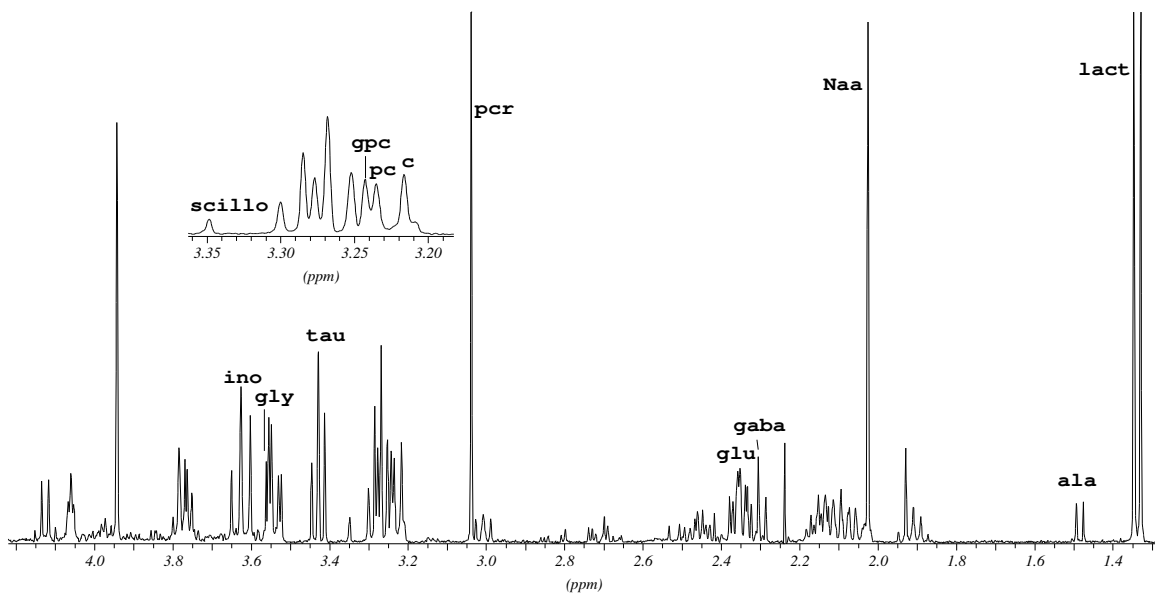
Tous les spectres RMN HR-MAS ont été réalisés au moyen d'un spectromètre RMN Bruker DRX avance 400 muni d'une sonde triple noyaux ¹H/¹³C/³¹P.

Les spectres réalisés sur les biopsies sont des spectres ¹H à une dimension (1D) enregistrés à 400,13 MHz.

Au cours de l'acquisition, les larges signaux des macromolécules sont atténués par l'utilisation d'un filtre T₂ basé sur séquence de pulse de type Carr-Purcell-Meibom-Gill [90-(τ-180-τ)_n-acquisition]. Les valeurs τ (500µs) et n (500) sont ajustées de manière à obtenir le meilleur compromis entre atténuation et distorsion de phase. Le signal de l'eau est présaturé durant les 3 s du délai de relaxation. Dans ces conditions, l'acquisition est réalisée en 21 minutes et 256 passages.

Le signal en temps est multiplié par une fonction gaussienne avant de réaliser une transformée de Fourier. Les résonances sont attribuées, en référence au TSP à 0 ppm, au moyen des données de la littérature (Govindaraju *et al.*, 2000; Martinez-Bisbal *et al.*, 2004), ainsi qu'au moyen d'expériences à 2 dimensions, 2D ¹H-¹H TOCSY avec une séquence de mixage DIPSI-2, et 2D ¹H-¹³C HSQC.

Le traitement des données est réalisé au moyen du logiciel XWIN-NMR (Bruker). Après avoir vérifié la constance du ratio : aire du pic de créatine/aire de la totalité du spectre, l'intensité de chaque métabolite est exprimée comme un ratio ramené à l'aire du pic de créatine à 3,04 ppm.



Spectre RMN HR-MAS du proton ¹H

*(lac: lactate 1,335 ppm ; ala: alanine 1,48ppm; Naa: N-acetylaspartate 2,02 ppm;
gaba: γ -aminobutyric acid 2,30 ppm; glu: glutamate 2,35 ppm; Pcr: phosphocreatine
+ creatine 3,03 ppm; c: choline libre 3,21 ppm; pc: phosphocholine 3,23 ppm; gpc:
glycerophosphocholine 3,24 ppm; scillo: scillo-inositol 3,34 ppm; tau: taurine
3,26ppm; gly: glycine 3,56 ppm; ino: myo-inositol 3,62 ppm)*

CHAPITRE 3: EXPOSITIONS MICRO-ONDES ET DOSIMETRIE

3.1. EXPOSITIONS

3.1.1. CONDITIONS D'EXPOSITIONS

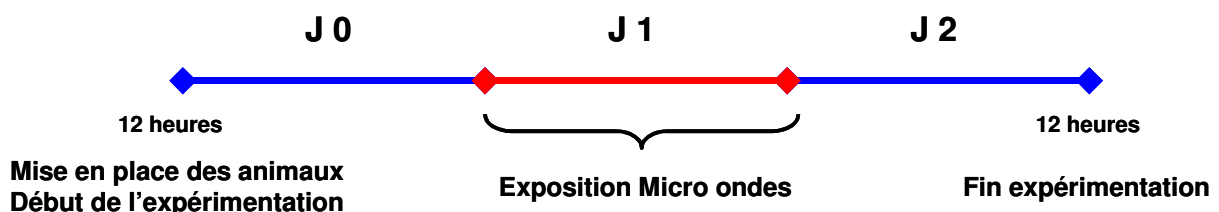
Les animaux sont monitorés durant une période de 72 heures. Les expositions aux ondes électromagnétiques sont toutes synchronisées à midi le deuxième jour pour un période de 24 heures. Les 24 premières heures permettent à l'animal de s'adapter à son nouvel environnement ainsi que déterminer un niveau de base pour chaque paramètre. Les dernières 24 heures permettent d'observer l'existence ou non, d'effets rémanant après l'exposition.

Les expositions sont réalisées en mode impulsionnel à deux fréquences différentes et à deux niveaux de puissance différents pour chaque fréquence.

Une série d'expositions est réalisée à la fréquence de 1800 MHz, pulsée à 217 Hz avec un rapport cyclique de 1/8. Ce type d'exposition simule une exposition au téléphone portable. Les densités de puissance choisies correspondent pour la première au niveau limite d'exposition pour le public de selon l'ICNIRP, soit 9 W/m² et pour le deuxième au 1/5 soit 1,8 W/m².

La deuxième série d'expositions est réalisée à la fréquence de 2450 MHz, pulsé à 1000 Hz pour un rapport cyclique de 1/10. Ce signal, qui simule une émission Radar dans la bande L, se trouve à la fréquence de résonance de l'eau. Les niveaux d'exposition choisis correspondent aux densités de puissance limites pour le public (10 W/m²) et pour les travailleurs en milieu contrôlé (50 W/m²).

Les animaux témoins subissent une exposition fictive dans les mêmes conditions que les animaux exposés.

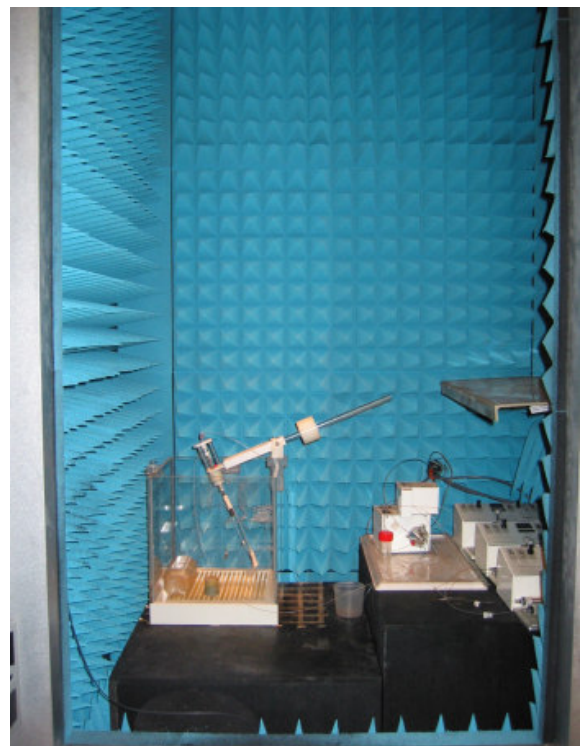
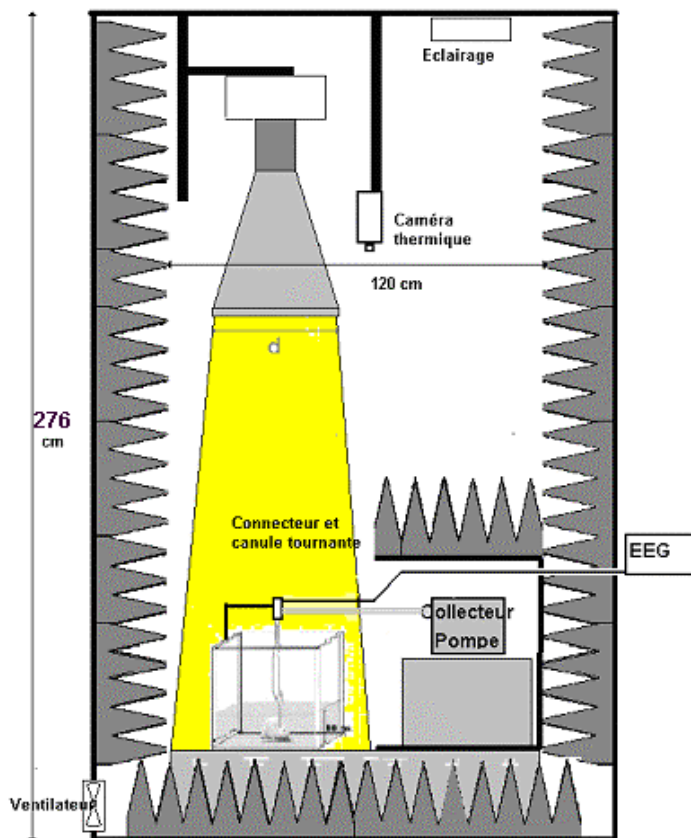


3.1.2. SYSTEME D'EXPOSITION

3.1.2.1. Chambre anéchoïque

L'ensemble des expérimentations est réalisé au sein d'une chambre anéchoïque (Emmerson & Cumming microwaves products). Il s'agit d'une enceinte tapissée de pyramides absorbantes évitant la réverbération des ondes électromagnétiques et ainsi permettant d'avoir un champ uniforme au niveau de la cage du rat. Ces chambres sont de taille suffisante (dimensions extérieures : 1,62 m de profondeur, 1,32 m de largeur, 2,76 m de hauteur, distance antenne cage du rat 1,65 m) pour permettre une exposition en champs lointains pour les deux fréquences employées (Champ lointain à 1,8 GHz : 1,65 m, à 2,45 GHz : 1,22 m). Les chambres sont ventilées de manière à maintenir la température constante.

Ce système permet de protéger en outre les expérimentateurs des rayonnements électromagnétiques lors des expositions.



Chambre anéchoïque

3.1.2.2. Sources micro-ondes

Les sources micro-ondes utilisées diffèrent selon la fréquence d'exposition.

Pour les expositions à 1800 MHz, les ondes électromagnétiques sont produites par un générateur de radiofréquences, associé à un amplificateur de puissance (RFS 1800-240/1, RFPA S.A, France). Ce système possède un modulateur de signal intégré permettant de reproduire un signal GSM.

Pour les expositions à 2450 MHz, les ondes électromagnétiques sont produites par un magnétron (GMP 20 KE/D, Sairem, France). Le signal de modulation est fourni par un générateur de fonctions (33 120 A, Agilent, USA).

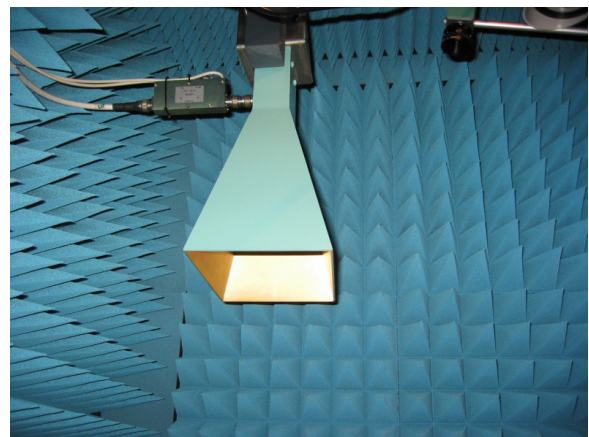
Les générateurs sont connectés via un système de guide d'onde à une antenne cornet rectangulaire (largeur : 18 cm, longueur : 23 cm) située dans la chambre anéchoïque.

Un ensemble de relais permet de choisir le générateur utilisé sans avoir à changer les connections.

La puissance d'émission est évaluée au niveau de la cage du rat par la mesure du champ électrique au moyen d'un mesureur de champ muni d'une sonde anisotrope (PMM OR.3, PMM Construzioni, Italie).



*Générateurs micro-ondes 1800 MHz et
2450 MHz*

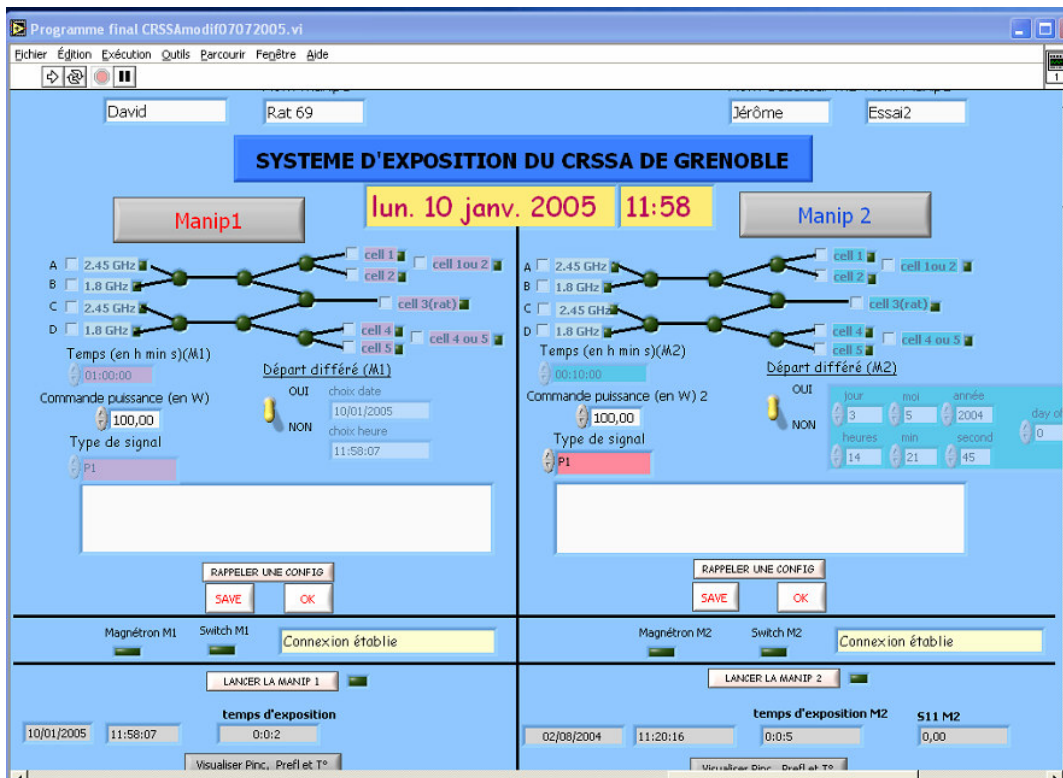


Antenne cornet d'émission

3.1.2.3. Système de pilotage

Le système d'irradiation est piloté automatiquement par un logiciel de type Labview développé au laboratoire en collaboration avec l'IRCOM (Institut de Recherche en Communications Optiques et Micro-ondes, Limoge). Ce logiciel permet de piloter l'ensemble des sources micro-ondes, les générateurs de fonctions, de commuter les relais, ainsi que de contrôler le temps d'irradiation, et réaliser des départs d'irradiations différés. Il permet d'adapter en continu la puissance des générateurs en fonction du champ électrique mesuré par la sonde située au sein de la chambre anéchoïque.

Ce logiciel est en outre un élément de sécurité permettant la coupure de l'émission micro-onde en cas d'ouverture accidentelle de la porte de la chambre.



Ecran du système de pilotage

3.2. DOSIMETRIE

3.2.1. CARTES DE CHAMPS

Une cartographie de la zone d'exposition a été réalisée afin de déterminer l'uniformité du champ et la puissance moyenne à utiliser en fonction des niveaux d'expositions recherchés.

Deux méthodes ont été utilisées :

La première consiste à mesurer la valeur du champ directement en différentes positions de la zone d'exposition au moyen du mesureur de champs.

La deuxième méthode consiste en une modélisation numérique déterminée à partir des caractéristiques du système d'exposition et des éléments présents dans la chambre. Cette simulation a été réalisée par l'IRCOM.

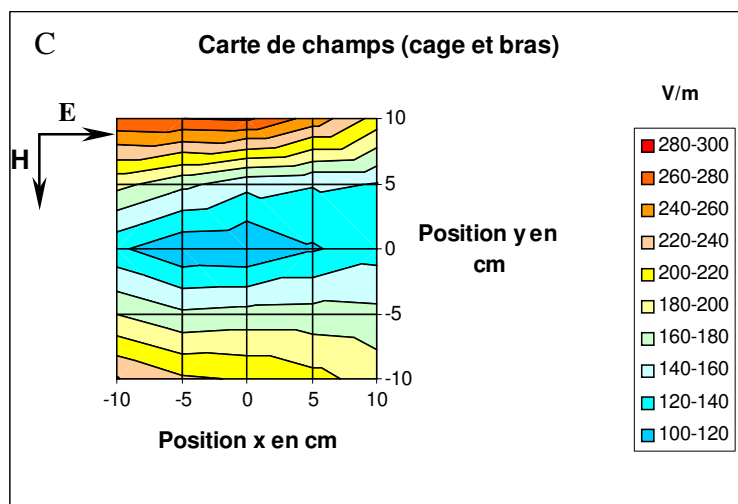
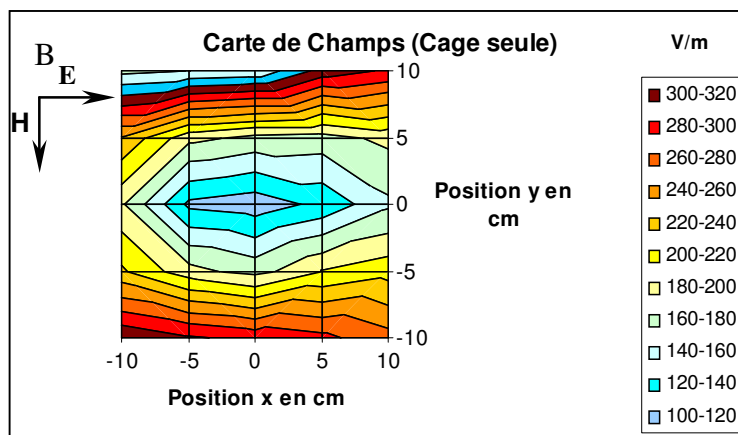
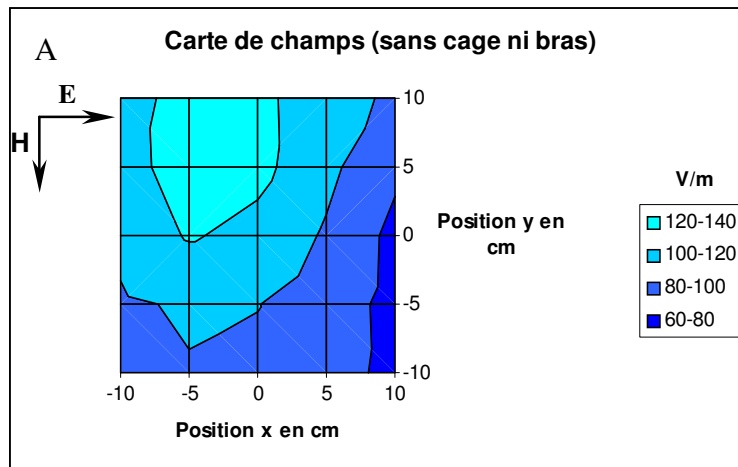
Ces deux méthodes sont complémentaires, la première permet d'avoir une évaluation directe du champ, la deuxième permet d'avoir une discrimination plus fine, de se soustraire des perturbations induites par la sonde de mesure, et de pouvoir simuler la distribution du champ avec un animal dans la cage, selon différentes positions et ainsi de pouvoir calculer le DAS.

3.2.1.1. Cartes de champs réalisées par mesures directes

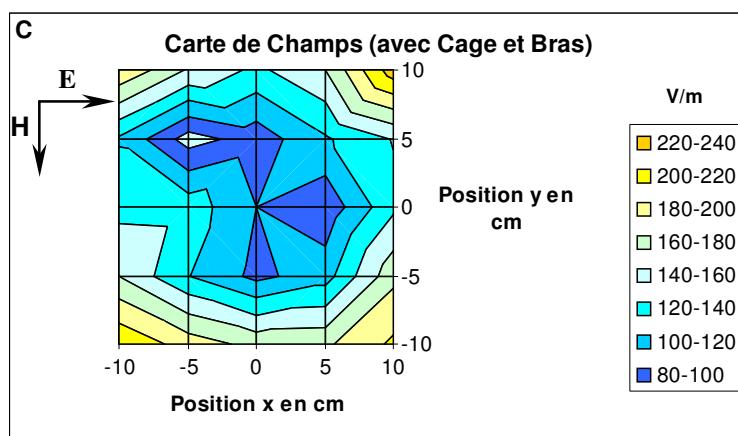
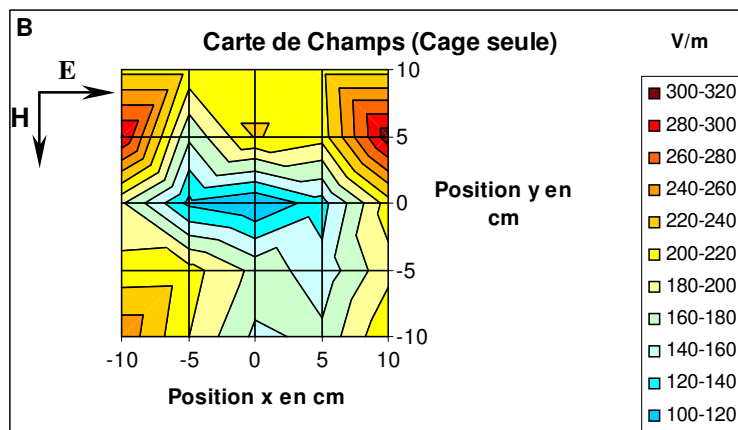
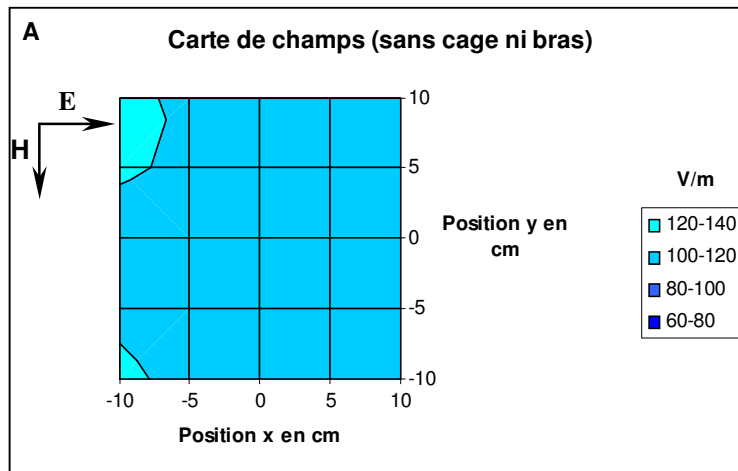
La mesure directe du champ se réalise en mesurant la valeur du champ électrique E au moyen d'un mesureur de champs PMM OR.3 (PMM costruzioni, Italie) doté d'une sonde anisotropique. La sonde est déplacée par incrément de 5 cm sur un quadrillage correspondant à la position et à la taille de la cage. Il est à noter que, de par l'encombrement de la sonde, il n'est pas possible d'avoir accès à la valeur du champ sur les 5 cm les plus extérieurs de la cage.

La cartographie a été effectuée dans un premier temps sans la présence de la cage contenant le rat dans la chambre anéchoïque, puis avec la cage du rat et enfin avec la cage du rat et le bras de mesure, réalisé en plexiglas et PVC, surplombant la cage et permettant le passage des câbles d'électrophysiologie et les tubulures de microdialyse.

Les mesures ont été réalisées avec un champ de référence réglé à 100 V/m (26,5 W/m²) au milieu de la cage (x=0, y=0). Une carte a été réalisée pour chaque condition et pour chaque fréquence (1,8 GHz et 2,45 GHz).



Cartes des champs réalisés à 1800 MHz, pour 100 V/m à la position $x=0, y=0$



Cartes des champs réalisés à 2450 MHz, pour 100 V/m à la position $x=0, y=0$

Les mesures de champs réalisées mettent en évidence une répartition homogène du champ en l'absence de la cage du rat et du bras de mesure, que ce soit pour la fréquence 1800 MHz ou 2450 MHz. La mise en place de la cage de plexiglas dans la zone d'exposition induit une perturbation du champ électrique avec un effet de bord marqué au niveau des parois placées parallèlement au champ électrique. Il est ainsi possible d'observer localement une augmentation importante du champ électrique. Cet effet est moins marqué pour la fréquence 2450 MHz probablement en raison d'une plus faible réflexion des ondes électromagnétiques par le plexiglas à cette fréquence. L'ajout du bras de mesure sur la cage dans la zone d'exposition, diminue cet effet, pour les deux fréquences. Le bras semble induire une diffraction du champ et ainsi diminuer l'effet bord. Le champ est donc plus homogène dans cette condition.

3.2.1.2. Cartes de champs réalisées par simulation numérique

Les cartes de champs ont été simulées numériquement par la méthode de calcul FDTD pour les fréquences 1800 MHz et 2450 MHz.

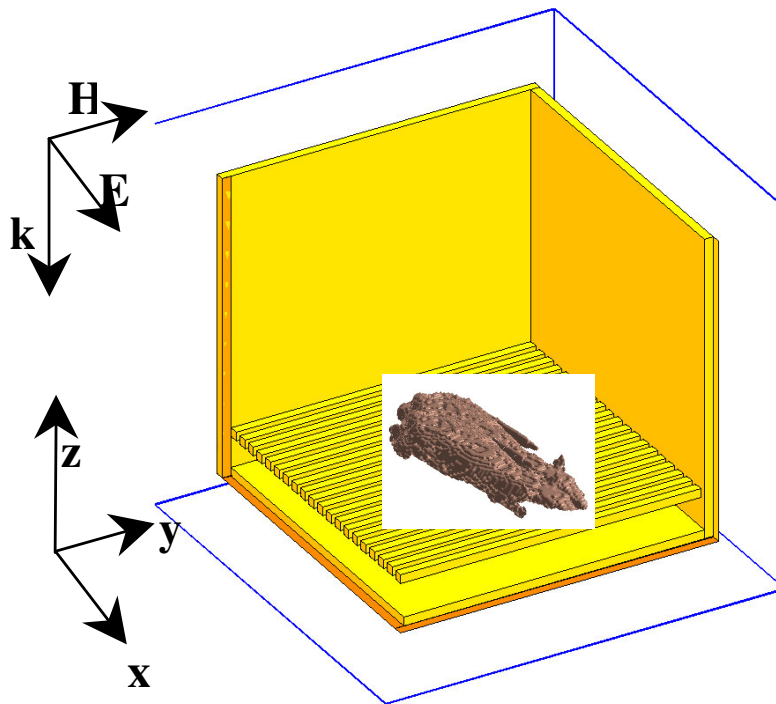
Afin de tenir compte des perturbations de champs induites par la cage et le rat, ceux-ci ont été modélisés en tenant compte de leurs propriétés diélectriques. Pour la cage, les parois sont réalisées en plexiglas (30 cm de côté, $\epsilon=2.6$), le fond de la cage est formée par une série de barres en fibres de verre (20 cm x 0.5 cm, $\epsilon=3$) sur lesquelles repose le rat, et située au-dessus d'un tiroir amovible en PVC (30 cm x 30 cm x 2cm, $\epsilon=4$), permettant le change des animaux en limitant leur manipulation. Pour la simulation des propriétés diélectriques du rat, le modèle numérique de l'équipe de Brooks a été utilisé (Gajsek *et al.*, 2001; Gajsek *et al.*, 2002). Ce modèle de rat possède une résolution de 1,5 mm.

Dans un premier temps la cartographie a été réalisée en tenant compte uniquement de la cage, puis par la suite en tenant compte des effets de la présence du rat dans celle-ci. Le rat étant libre de ces mouvements, les simulations ont été réalisées en plaçant la modélisation numérique du rat selon 4 positions différentes dans la cage :

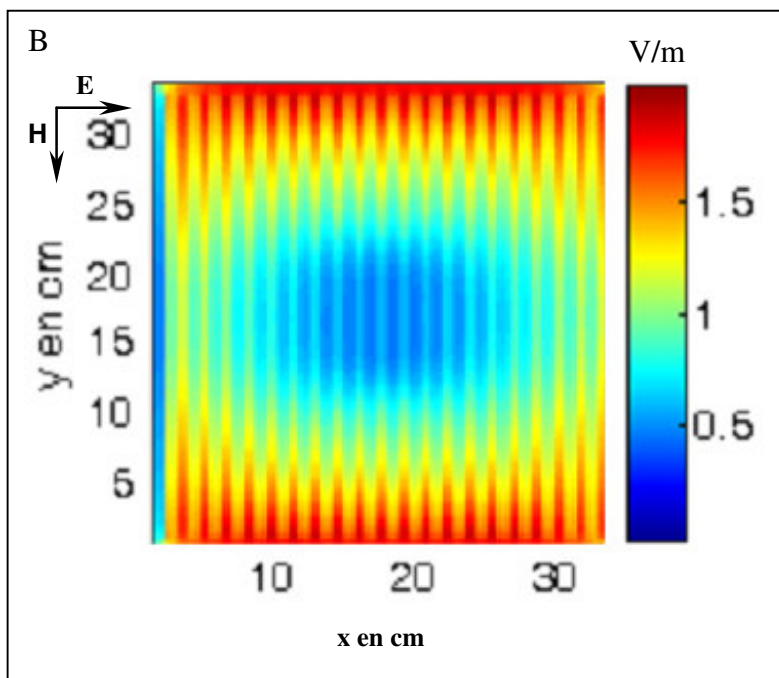
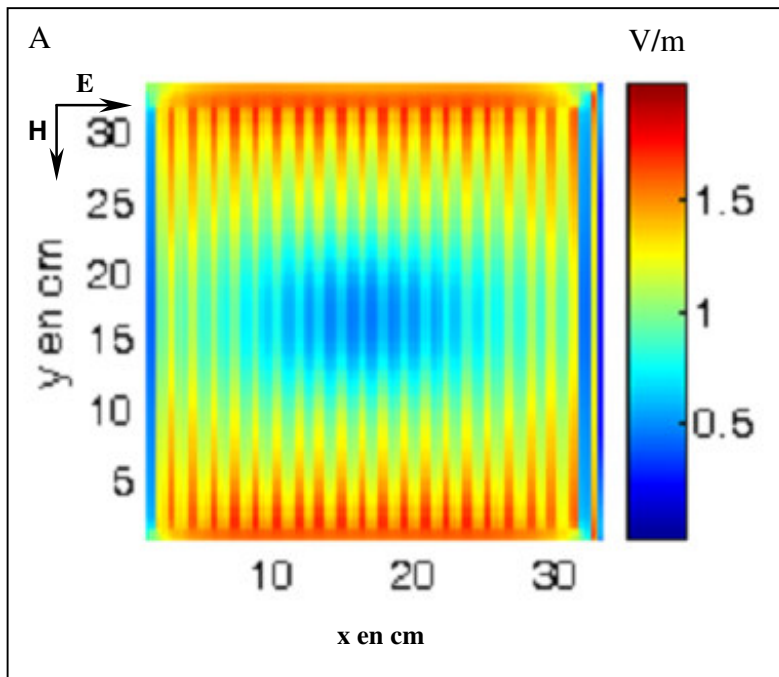
- Position 1 : Rat situé au centre de la cage, parallèlement au champ électrique E (polarisation E).

- Position 2 : Rat ayant la tête située contre une paroi (position de la tête $x=-10$, $y=0$), polarisation E
- Position 3 : Rat ayant la tête située à la jonction de deux parois (position de la tête $x=-10$, $y=-15$), parallèlement au champ magnétique (polarisation H).
- Position 4 : Rat ayant son arrière train contre à la jonction de deux parois (position de l'arrière train $x=+15$, $y=+10$), polarisation E.

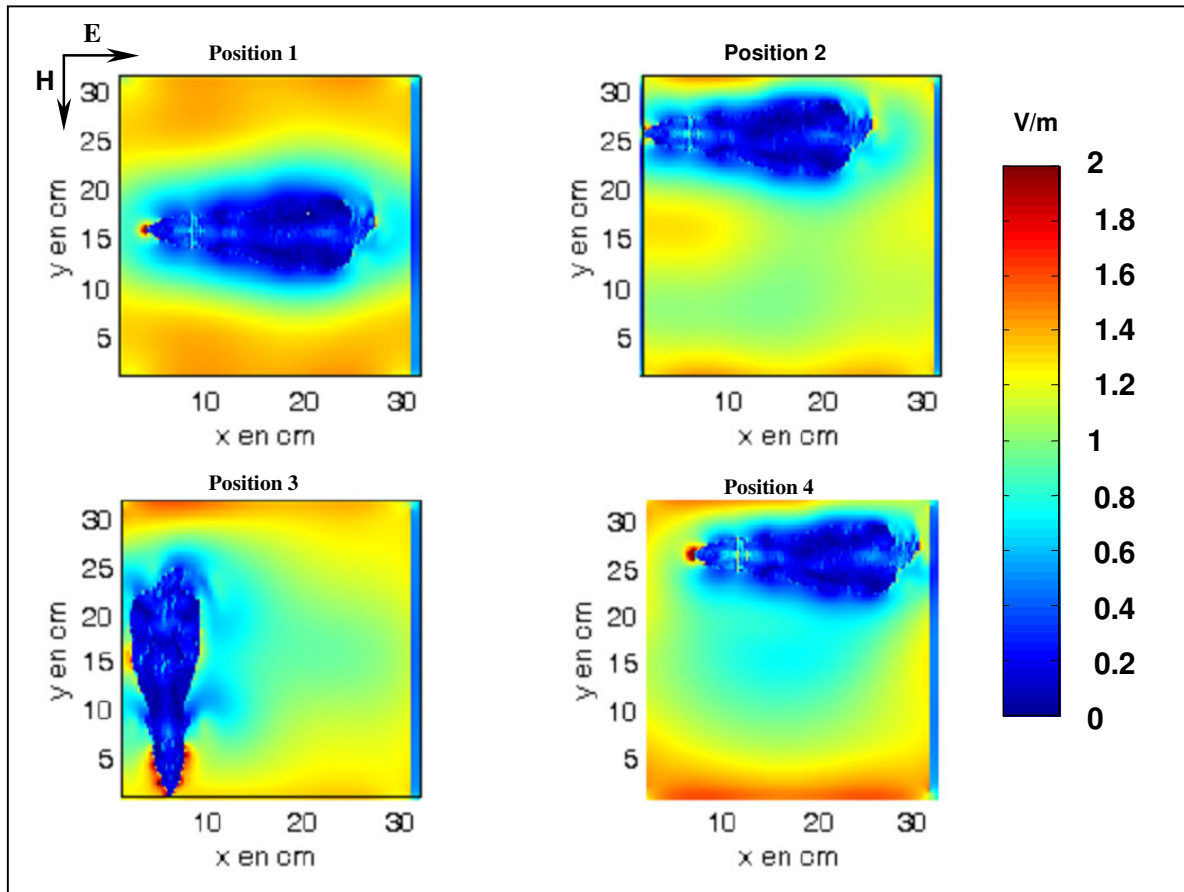
Pour l'ensemble des simulations, le champ E est normalisé pour une puissance incidente de 1W/m^2 .



Modélisation numérique du rat dans sa cage



Simulation par FDTD de la distribution du champ électrique E au sein de la cage, pour une puissance incidente de 1W/m^2 , et pour les fréquences 1800 MHz (A) et 2450 MHz (B)



Simulation par FDTD de la distribution du champ électrique E au sein de la cage en fonction de la position du rat, pour une puissance incidente de 1 W/m^2 , et à la fréquence de 1800 MHz

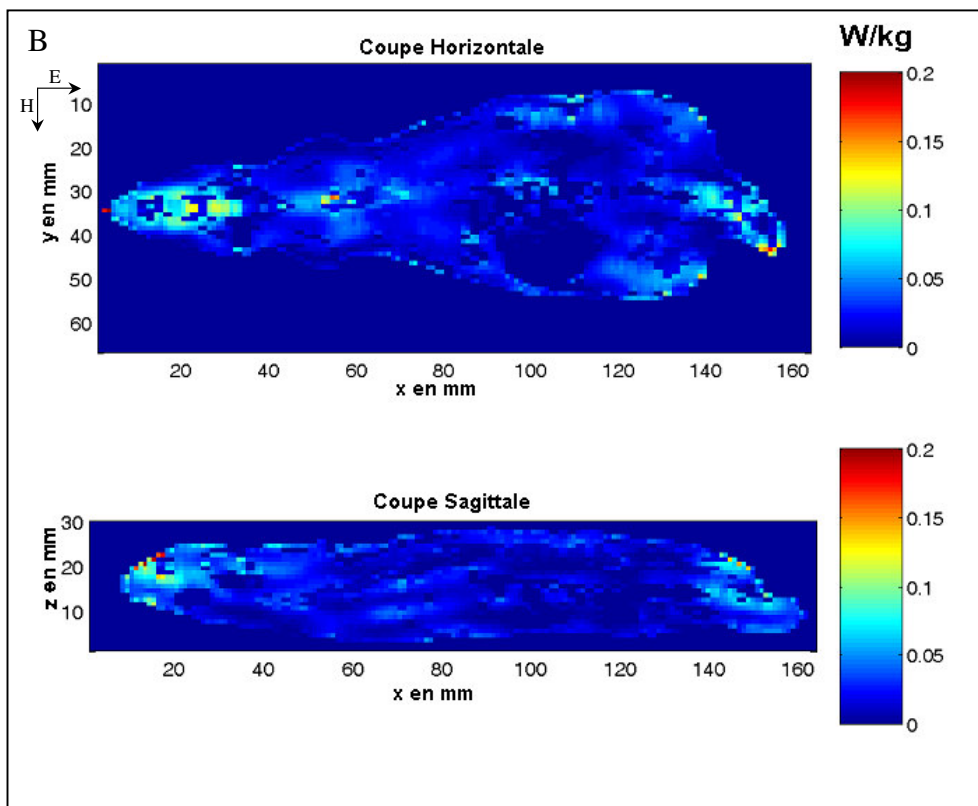
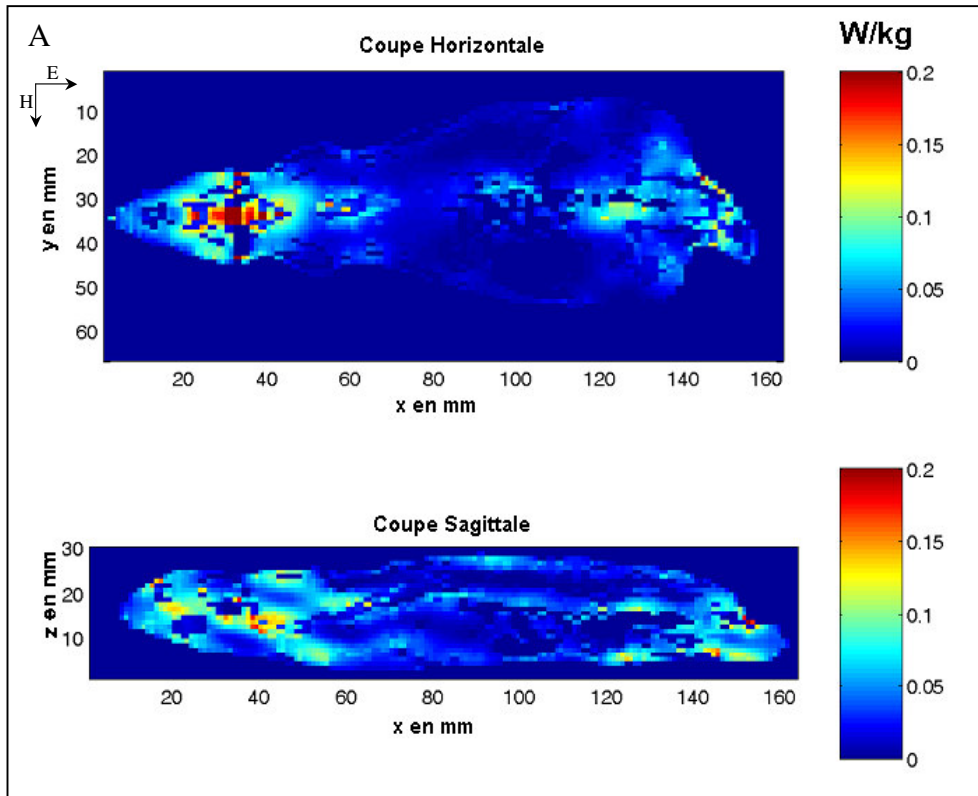
La simulation de la répartition du champ électrique par FDTD confirme les résultats mis en évidence par mesure directe tel qu'une augmentation importante de la valeur de E à proximité des parois de la cage situées parallèlement à celui-ci. Cette simulation permet en outre de mettre en évidence les variations de champs en fonction de la localisation du rat. Il est ainsi possible d'observer au niveau du museau de l'animal une augmentation du champ lié à un effet pointe, et une augmentation du champ localisé au niveau de la tête lorsque le rat est proche de la paroi, selon la polarisation H.

3.2.2. DEBIT D'ABSORPTION SPECIFIQUE

La distribution du débit d'absorption spécifique (DAS) au sein du rat est déterminée en utilisant la méthode de calcul numérique FDTD. Le DAS est calculé à partir des valeurs du champ électrique en utilisant la formule $DAS = \sigma E^2 / (2\rho)$, où DAS est exprimé en W/kg et où σ représente la conductivité en S/m, E est le champ électrique en V/m et ρ la densité du tissu en kg/m³.

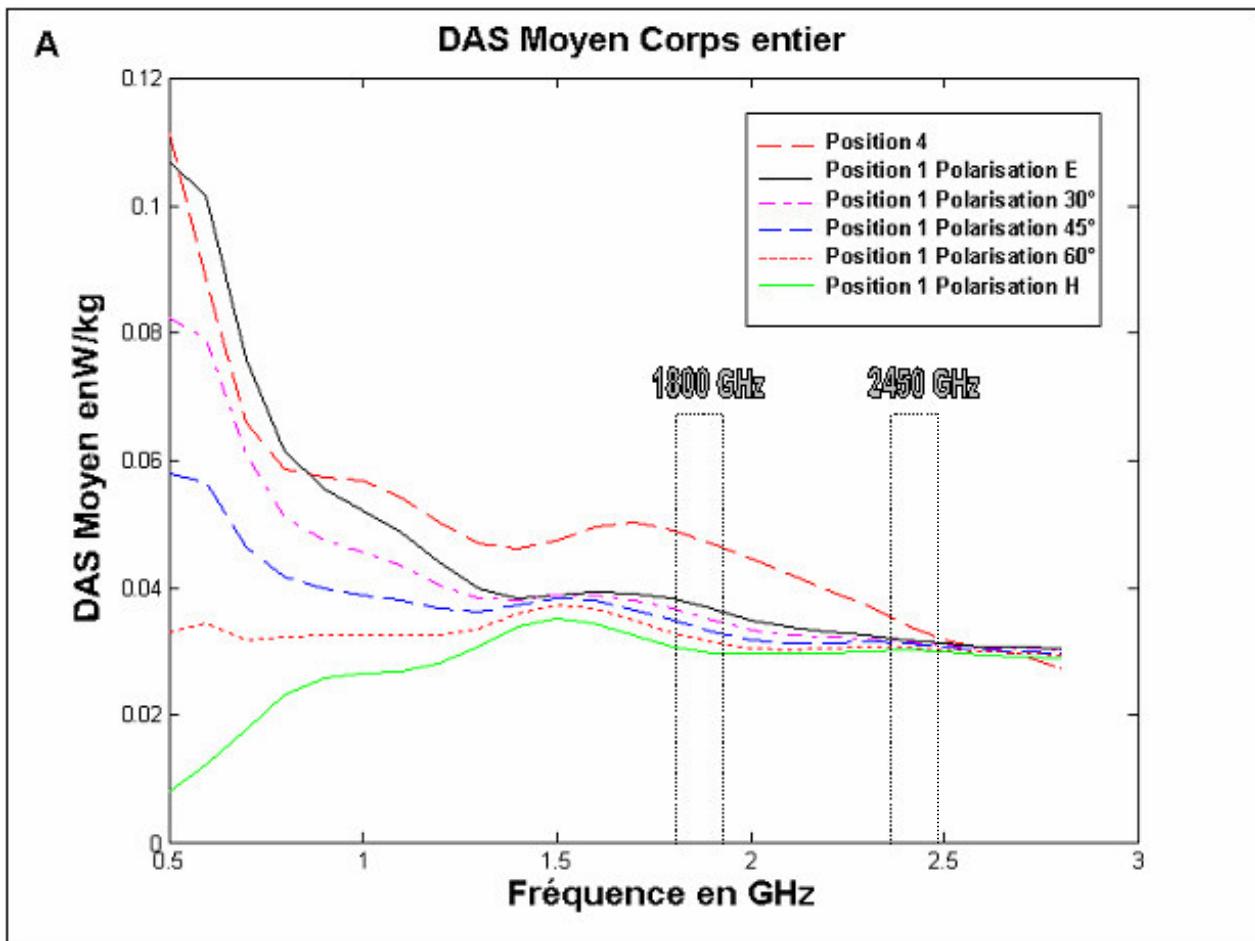
Le DAS est calculé pour les deux fréquences d'expositions utilisées à partir des valeurs du champ E obtenues par simulation numérique. En plus des différentes positions envisagées de l'animal, le DAS est également calculé pour différentes polarisations du rat lorsqu'il est en position 1 (0°=polarisation E, 30°, 45°, 60° et 90°=polarisation H). Les propriétés diélectriques ainsi que la densité des différents tissus de l'animal sont fournis par le modèle numérique de l'équipe de Brooks (Gajsek *et al.*, 2001; Gajsek *et al.*, 2002). Afin de tenir compte d'éventuelles perturbations liées à la présence des électrodes d'enregistrement EEG et EMG, de la sonde de microdialyse et de la thermistance, l'implant a été construit numériquement et ajouté au modèle.

Les cartes de distribution du SAR sont modélisées pour une puissance incidente de 1 W/m².

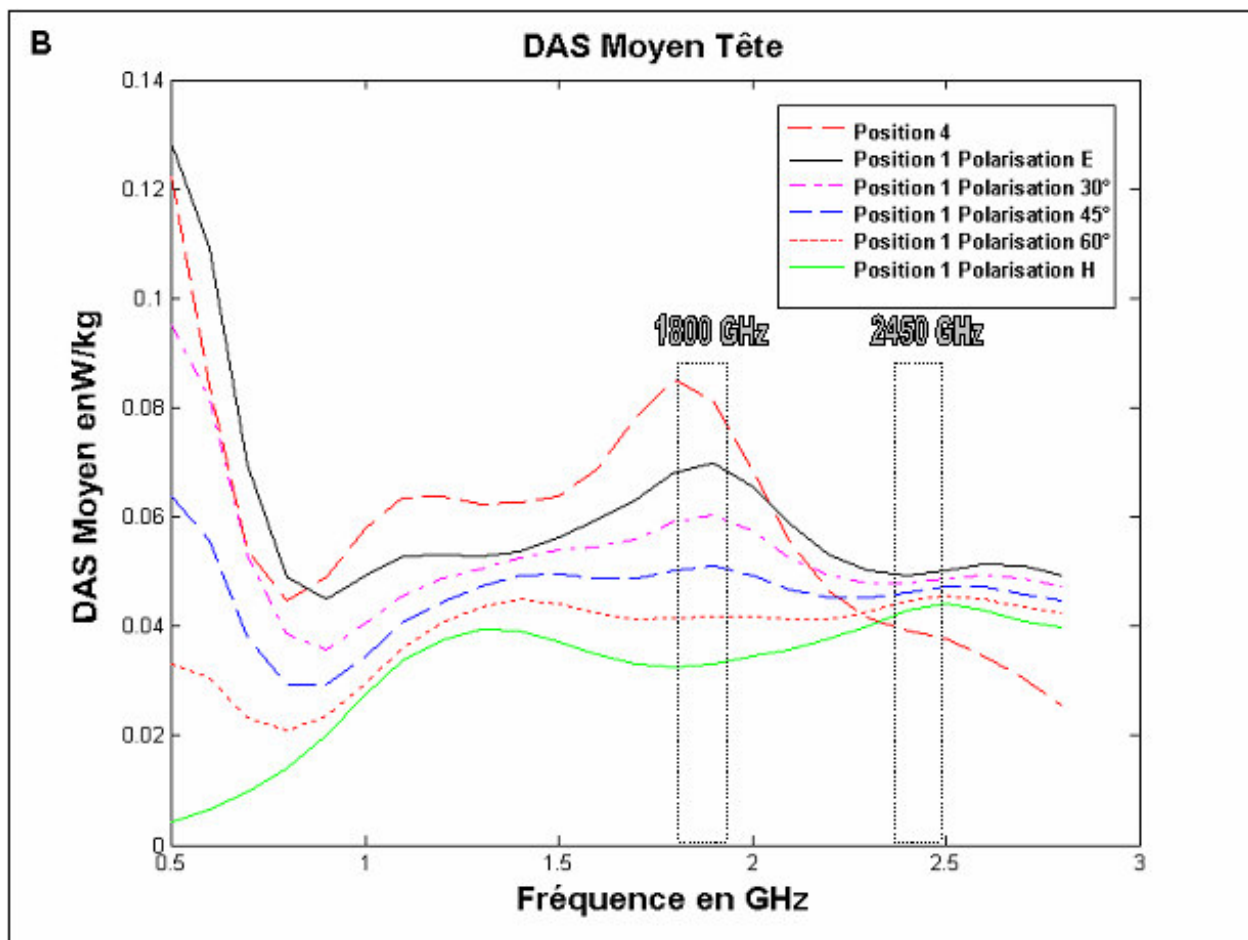


Modélisation de la distribution du DAS, pour le rat en position 1, à 1800 MHz (A) et à 2450 MHz (B)

Afin de rendre compte des variations du DAS moyen et du DAS au niveau de la tête, en fonction de la fréquence, et selon les différentes positions du rat dans la cage, deux graphiques ont été construits. Les valeurs extrêmes de DAS varient entre la position 4 pour le maximum et la position 1 Polarisation H pour le minimum, les position 2, 3 ne sont pas représentées.



Courbe représentative du DAS moyen corps entier en fonction de la fréquence, calculé pour une puissance incidente moyenne de 1W/m²



Courbe représentative du DAS moyen au niveau de la tête en fonction de la fréquence, calculé pour une puissance incidente moyenne de 1W/m^2

La détermination de la réparation du DAS permet de mettre en évidence plusieurs points essentiels pour l'expérimentation :

Tout d'abord, ces résultats mettent en évidence une plus faible variation du DAS pour les fréquences les plus élevées avec une répartition plus homogène à 2450 MHz qu'à 1800 MHz.

Par la suite, les valeurs de DAS semblent être très influencées par la position du rat. La mobilité du rat étant un point essentiel de l'étude, il n'est pas possible d'avoir une évaluation exacte du DAS lors des expositions, mais seulement les valeurs extrêmes autour desquelles le DAS varie et une valeurs moyenne correspondant a la moyenne du DAS dans les différentes positions envisagées. Les conditions d'exposition ne seront donc déterminées qu'en fonction des limites de densités de puissance.

Enfin l'implant ne semble pas induire de modifications du DAS, les modélisations avec et sans ne mettent pas en évidence de variations même localement du DAS corps entier, ou du DAS tête uniquement et ceux-ci quelque soit la position ou l'orientation du rat.

Les valeurs de DAS moyen pour les conditions d'expositions de l'expérimentation sont donc :

Exposition à 1800 MHz	DAS moyen en W/kg	
	Corps entier	Tête
Puissance incidente de 1,8 W/m²	0,072 ± 0,018	0,106 ± 0,048
Puissance incidente de 9 W/m²	0,36 ± 0,09	0,53 ± 0,24

Exposition à 2450 MHz	DAS moyen en W/kg	
	Corps entier	Tête
Puissance incidente de 10 W/m²	0,31 ± 0,07	0,46 ± 0.12
Puissance incidente de 50 W/m²	1,58 ± 0,62	2,34 ± 0,97

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 1 : Rythmes circadiens et corrélations inter-paramètres

Chapitre 2 : Effets neurophysiologiques spécifiques de champs de radiofréquences à 1,8 et 2,45 GHz

Remarques préliminaires

Avant d'aborder les effets de l'exposition aux ondes électromagnétiques nous avons testé notre système d'analyse et exploré les liens pouvant exister entre les différents paramètres mesurés.

La première partie est ainsi consacrée à l'étude des effets d'une perturbation connue du système cholinergique (intoxication par de faibles doses de neurotoxiques organophosphorés) sur la vigilance et l'électrophysiologie.

Dans cette partie nous nous sommes ensuite attachés, en utilisant le modèle d'analyse multiparamétrique développée, à mesurer les variations circadiennes de chaque paramètre ainsi que les corrélations pouvant exister entre eux.

Dans la deuxième partie, nous avons analysé les effets des ondes électromagnétiques sur ces mêmes paramètres afin d'en évaluer leur retentissements sur le système cholinergique.

CHAPITRE 1: RYTHMES CIRCADIENS ET CORRELATIONS ENTRE PARAMETRES

L'acétylcholine est un neurotransmetteur ayant une action sur un grand nombre de fonctions de l'organisme, dont la vigilance. Sa sécrétion est marquée par l'existence d'une rythmicité circadienne participant à l'alternance des cycles veille-sommeil.

Les ondes électromagnétiques sont potentiellement évoquées comme des agents pouvant interagir avec le système cholinergique. De telles actions pourraient se manifester au travers de plusieurs manifestations neurophysiologiques avec entre autre des modifications de rythmes circadiens et de la vigilance.

La problématique des perturbations des rythmes de la vigilance suite à des perturbations cholinergiques a déjà été envisagée au sein du centre de recherche afin d'expliquer les symptômes ressentis par les combattants à leur retour de la première guerre du Golfe.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si une perturbation du système cholinergique, par l'utilisation de drogues (anticholinéserasique) à doses asymptomatiques pouvait entraîner des modifications dans les états de vigilance.

Dans un second temps, nous avons étudié la rythmicité des cycles des différents paramètres ainsi que les relations pouvant exister entre eux.

1.1. INFLUENCE D'UN ANTICHOLINESTERASIQUE SUR LES PARAMETRES EEG ET LA VIGILANCE

1.1.1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Comme mentionné précédemment, avant de déterminer si les ondes électromagnétiques ont un effet sur le système cholinergique, il est nécessaire de déterminer en quoi une perturbation du système cholinergique peut se répercuter sur la vigilance et les paramètres électroencéphalographiques. Avant de nous intéresser aux ondes électromagnétiques nous nous sommes donc intéressés aux effets de faibles doses de composés organophosphorés sur ces paramètres.

Les composés organophosphorés, tel que le soman sont des inhibiteurs irréversibles des acétylcholinestérases. Utilisés comme pesticides, insecticides, médicaments, ou toxiques de combat, leur action entraîne une hypercholinergie a la fois central et périphérique.

Une intoxication massive se caractérise entre autre par la survenue de crises d'épilepsie ainsi qu'une détresse respiratoire pouvant conduire à la mort.

L'exposition à de plus faibles doses qui n'entraînent pas de symptômes cliniques majeurs, n'est cependant pas dénuée de tout effet. Principalement ont été relatés des effets sur l'humeur, l'état de fatigue et le sommeil.

Une telle exposition a été évoquée comme explication potentielle des symptômes ressentis, par les soldats à leur retour des opérations militaires ayant eu lieu durant la première guerre du Golfe (1990-1991). Sur 697 000 engagés ayant participés aux opérations, 17 248 militaires ont ressenti des symptômes tels que : de la fatigue (17,4%), des perturbations neurophysiologiques (trouble de l'humeur , de la libido, 10,5%), des trouble du sommeil (4,9%) (Board, 1995). Ces symptômes ont été regroupés et sont connus sous l'appellation « syndrome de la guerre du Golfe ».

Ces personnels auraient en effet pu être exposés à des nuages de toxiques de faible concentration lors des bombardements des sites de productions d'armes chimiques.

Une première étude réalisée au laboratoire (Baille *et al.*, 2001) sur un modèle de souris à mis en évidence des perturbations du comportement pour des intoxications au soman aux doses 30 et 50 µg/kg.

En reprenant ce modèle, nous avons cherché à déterminer si les mêmes doses entraînaient des modifications des paramètres EEG et EMG et des cycles de vigilance. Dans cette même étude nous avons également validé notre système d'analyse de la vigilance au moyen de drogues connues pour induire une augmentation ou une diminution du temps passé en éveil (respectivement le Modafinil et le succinate de doxylamine).

1.1.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL SPECIFIQUE

1.1.2.1. Animaux

Nous avons choisi de reprendre le modèle utilisé dans l'étude de Baille (Baille *et al.*, 2001). L'étude a donc été réalisée sur des souris Swiss mâles pesant entre 35 et 40 g.

Les animaux sont équipés de quatre électrodes épidurales permettant l'enregistrement de l'EEG et deux électrodes musculaires pour l'EMG. Les électrodes épidurales sont situées au niveau des aires visuelles et des aires hippocampiques. Les animaux ont 7 jours de récupération post opératoires.

1.1.2.2. Procédure

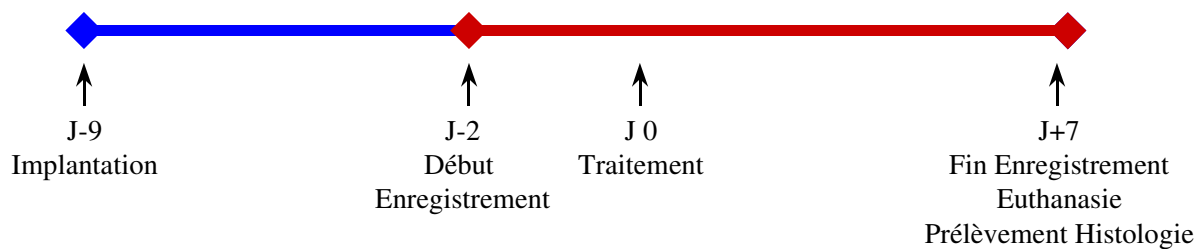
Les animaux sont répartis en 5 groupes. Un groupe contrôle (n=10) subissant une injection de sérum physiologique, un groupe subissant une injection d'hypnotique (n=10), un groupe subissant une injection d'agent éveillant (n=10), et deux groupes (n=10 chacun) subissant une injection de composés organophosphorés. Le composé organophosphoré utilisé est le soman à la dose de 30 µg/kg et 50 µg/kg.

Les groupes subissant une injection d'éveillant et d'hypnotique ont pour but de valider le bon fonctionnement de notre logiciel d'analyse automatique de la vigilance.

Le succinate de doxylamine a été choisi comme hypnotique car contrairement au benzodiazépine et barbiturique, cet antihistaminique H1, n'entraîne pas de modification de la structure de l'EEG. Pour les mêmes raisons, le Modafinil a été choisi comme agent éveillant préférentiellement aux amphétamines.

L'expérimentation est réalisée sur une durée de 9 jours, les 2 premiers jours sont destinés à permettre aux animaux de s'habituer à leur nouvel environnement ainsi que de déterminer un niveau de référence pour chaque paramètre. Les animaux subissent ensuite leur injection, puis sont monitorés pour les 7 jours restants.

A la fin de l'expérimentation les souris sont déconnectées, puis euthanasiées en vue de la réalisation d'un contrôle histologique de la localisation des électrodes.



Déroulement de l'expérimentation

1.1.3. RESULTATS DE L'ETUDE

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Toxicology* en 2004. L'ensemble des résultats ainsi que les discussions sont détaillées dans l'article suivant.

Résumé de l'article :

Le but de ce travail a été d'étudier durant 7 jours la réponse électrophysiologique et la structure du sommeil après une intoxication à de faibles doses de Soman, un composé organophosphoré. La quantification de chaque état de vigilance a été réalisée au moyen d'un système d'analyse automatique et a ainsi permis d'identifier certaines perturbations.

Alors que l'utilisation d'une dose de soman à 30 µg/kg ne provoque aucune perturbation, l'utilisation d'une dose à 50 µg/kg induit la survenue de plusieurs d'effets variant en fonction de la période considérée après l'intoxication.

Concernant les données électrophysiologiques, il est possible d'observer une première baisse suivie d'une augmentation durant les 3 jours suivant l'intoxication de l'énergie relative présente dans la bande thêta (6-9Hz). Concernant la vigilance, le sommeil lent est perturbé durant 5 jours avec une augmentation significative de temps passé dans cet état entre le troisième et le cinquième jour. Des répercussions sont également enregistrées sur le sommeil paradoxal avec une augmentation de celui-ci durant les deux jours suivant l'intoxication.

Les effets observés apparaissent en accord avec le principe d'une activation des voies muscariniques, excepté pour les 6 premières heures suivant l'intoxication où les effets traduiraient plutôt l'implication du système GABA-ergic.

Disruption of mice sleep stages induced by low doses of organophosphorus compound soman

David Crouzier, Valerie Baille Le Crom, Elise Four, Guy Lallement
and Guy Testylier*

Centre de Recherches du Service Santé des Armées, 24, avenue des maquis
du Grésivaudan, BP 87 38 702 La Tronche Cedex, France

Keywords: soman, cholinergic system, EEG analysis

* Corresponding author: (33) 4 76 63 69 73

Email: guytestylier@crssa.net

Abstract

We have explored during seven days EEG spectral response and sleep pattern of mice after a mild intoxication with soman. Using an automatic staging method we have quantified the sleep stage of the mice to identify disruptions of the sleep pattern.

The 50 µg/kg dose of soman produced several effects during several time windows after intoxication. A first decrease followed by an increase of theta energy, a disturbance of slow wave sleep during five days and an increase of the REM sleep during the first and second day after intoxication. During the first 6 hours, we have observed some effects which were not consistent with a muscarinic activation and might have involved GABA-ergic system. After this early period the observed effects were in accordance with a muscarinic activation. We observed an increase of energy in the EEG theta band during three days after soman injection and an increase of slow wave sleep during the second to the fifth day after soman injection.

1. Introduction

Organophosphate (OP) compounds are very potent neurotoxic agents. These agents, such as soman, irreversibly inhibit acetylcholinesterase (AChE) both centrally and peripherally. At convulsing doses, they induce an immediate hypercholinergic state producing muscle fasciculation, respiratory distress and generalized seizures. In the surviving mice we observed long term effects (Duffy 1980) like EEG disorders, neuropathy and psychiatric after-effects.

At lower doses, only few and sometimes contradictory data were obtained. The existence of long term effects of intoxication with asymptomatic or mild symptom doses stay questionable and the OP specificity of the troubles (memory impairment, confusion, EEG disturbances or sleep disorder) observed on populations exposed to low doses is not clearly established. The knowledge of the consequences of these intoxications should have a great importance to adapted therapy after an accidental exposure of populations, or a terrorist attack like in the Tokyo subway in 1995 or to understand the origins of the Gulf war syndrome, were exposures to low doses of OP are suspected (Kurt 1998). In an experimental model Kassa et al (2001) showed disturbances of spatial memory of rats exposed to low doses of sarin which could be observed 3 weeks after intoxication. These doses were non convulsive but produced mild symptoms of acute poisoning. They induced blood AChE inhibition of about 50 %.

In our laboratory, a behavioral and histopathological study was performed on mice exposed to acute low doses of soman. The main results were a reversible hypo-locomotion with an anxiogenic effect observed on mice exposed to a single 50 µg/kg dose of soman (Baille 2001). In this model the blood inhibition was 63 % 30 min after soman injection and produced very few symptoms (only very weak tremor).

Common symptoms of people exposed to OP are sleep disturbances, nightmares or insomnia (Fullerton 1990, Duffy 1979). These troubles are not surprising considering the key role of the cholinergic system in sleep control. An increase of acetylcholine release could be observed by microdialysis during waking (W) compared to slow wave sleep (SW) in the thalamus (Williams 1994), in the hippocampus and in the cortex (Marrosu 1995). Chronic cholinergic insufficiency induced persistent disturbances in the sleep-wake cycle in rats (Szymusiak 1993)

and cholinergic agonist like carbachol can mimic photic synchronization of circadian rhythms (Earnest 1985). On the other hand, it is well established that the cholinergic system is involved in the control of REM sleep. An increase of ACh release in rat cortex and hippocampus is observed by microdialysis during REM sleep (Marrosu 1995). Microinjection of neostigmine, an acetylcholinesterase inhibitor in the pontine brainstem of a cat induced a major increase of REM sleep (Baghdoyan 1984). Furthermore systemic injection of scopolamine, a muscarinic antagonist decreased REM sleep (Zoltoski 1993). Even though rats with genetic hyperactivity of cholinergic system present an increase of REM sleep (Shiromani 1988).

Accordingly we thus explored sleep disturbances induced by an acute low dosage of OP. Our experimental conditions were the same as in Baille's (2001) work. We recorded EEG and EMG of mice during 7 days after intoxication. In this work sleep staging was performed using an automatic system developed in the laboratory.

2. Material and methods

2.1 Animals:

In this study we used fifty five SWISS male mice (35-40g) purchased from Elevage Janvier France. They were maintained in a controlled environment with a circadian light cycle (dark period from 6 PM to 6 AM) and a constant temperature (24 °C). Food and water were provided ad libitum. They were randomly divided in 5 groups: 10 were saline control animals, 10 in the doxylamine control group, 10 in the modafinyl control group, 10 were in the soman 30 µg/kg group and 10 were in the soman 50 µg/kg group. Five mice were discarded, 3 of them presented tissue lesions after histological control and the 2 others had an unusable EEG due to bad electrical contacts on electrodes.

All procedures were in accordance with the standards for animal care established by our institute and were approved by our animal use ethic committee (decree 87-848 october 19, 1987).

2.2 Surgery

Mice were anaesthetised with ketamine (100 mg/kg) and acepromazine (0.5 mg/kg). Four epidural silver electrodes were implanted above the right and left

hippocampus and visual cortex for EEG recording. Two muscular electrodes were introduced between the neck muscle layers for EMG recording. All electrodes were weld to a connector fixed to the skull with dental acrylic. After surgery animals were kept in individual cages for a 7 day recovery period.

2.3 Experimental procedure

The mice were connected to EEG and EMG recorders and followed for 2 days before treatment to accustom the animals to the system and record baseline values.

The third day at 10 AM the mice received a sub-cutaneous injection of soman, doxylamine, modafinyl or saline. Two soman dosages were used, the first one, 30 µg/kg (0.27 LD50) was asymptomatic, the second one, 50 µg/kg (0.45 LD50) induced mild symptoms. Control animals received a SC saline injection. After injection their EEG and EMG were recorded for 7 days.

At the end of the experiment a histopathological control of mice brain tissue was performed.

2.4 Histopathology

The mice were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with heparinized saline (5 UI.ml⁻¹) followed by a fixative solution made of formaldehyde (4%) and acetic acid (3%). The entire brain was removed, post fixed 24 hours at 4°C and processed by routine paraffin embedding methods. Brain sections (5 µm) were mounted onto slides precoated with 3-aminopropyl-triethoxy-silane. Brain injury around the electrodes was evaluated by Hemalun-Phloxin staining (H&P).

2.5 Histological validation

We have discarded from the results mice which presented marked lesions in the brain due to the implantation of electrodes. We have defined a visual scoring of the lesion from 0 to 5 as follows.

0 : no mark of electrode on the brain

1: light mark (depth<0.3 mm), no inflammatory reaction

2: medium mark (0.3 mm< depth <05 mm) no inflammatory reaction

3: deep mark (0.5 mm > depth > 0.7 mm) without inflammatory reaction or light mark with inflammatory reaction.

- 4: deep mark with inflammatory reaction
- 5: Necrosis or strong inflammatory reaction

Only animals with histological scoring from 0 to 2 were kept for results.

In this experiment 5 mice had a score of 0, 28 a score of 1 and 22 a score of 2. Only 3 mice were discarded. These mice were replaced at the end the experiment by 3 other mice to obtain groups with 10 animals.

2.6 Data recording and signal processing

Data acquisition and signal processing were performed with Labwindows software developed in the laboratory.

EEG and EMG were recorded continuously on two channels of an Alvar electroencephalograph type REEGA 8. EEG were recorded from the electrodes above the hippocampus and the visual cortex of the same hemisphere. EMG was recorded from the 2 muscular electrodes. The record was performed using a 50 Hz analogical filter and a low pass filter at 70 Hz. The signals were digitalized at a sample frequency of 200 Hz and stored on a computer with a PCI 6032 E data acquisition card (National Instrument). The signals were segmented in 5.12 second period. For each period the power spectrum of the signal was extracted by numerical analysis using the Labwindows library (National Instrument). Energies in different frequency bands (delta band: 0.5 to 5 Hz, theta band: 6 to 9 Hz, beta band: 10 to 25 Hz and gamma band: 25 to 35 Hz) were calculated by integration of the power spectrum in these frequency windows. These energies were expressed as percentages of the total energy in the spectrum. Total energies of EEG and EMG spectrum were also recorded.

A statistical analysis of the signal was also performed. For each EEG period the distribution of the 1024 recorded points were analysed. The standard deviation, the third central moment (Skewness) and the fourth central moment (Kurtosis) of the distribution were calculated as described by Karasinski et al (1994).

2.7 Sleep staging

To define the hypnogram pattern of the mice we used an automated sleep staging system developed in the laboratory. We have combined several methods used on rats and described in the literature (Itowi N. 1990, Karasinski P. 1994, Neckelmann D. 1994 and Robert C. 1999). We distinguished 3 sleeps stages: 1.

awake (W), 2. paradoxal sleep (REM), and 3. slow wave sleep (SW). SW was further divided in 2 stages: light slow wave sleep (SWi) and deep slow wave sleep (SWd)

To identify these stages we used spectrum energies of EEG in the delta ($En_{eeg\delta}$), theta ($En_{eeg\theta}$) and gamma ($En_{eeg\gamma}$) bands, total energy of EEG (En_{eegTot}), we used total energy of EMG (En_{emgTot}) and also some statistical parameters of EEG: Standard deviation (St_{eegSD}) and Kurtosis (St_{eegSD}). These parameters defined the coordinates $V_i[t]$ of a seven dimensional vector $\{V[t]\}$ which characterised the period of time t:

$$\{V[t]\} = \{En_{eeg\delta}, En_{eeg\theta}, En_{eeg\gamma}, En_{eegTot}, St_{eegSD}, En_{emgTot}\}$$

For each mouse, before automated sleep analysis a learning session of the software was performed to define 4 reference vectors, one for each stage: $\{Ref_W\}$, $\{Ref_{REM}\}$, $\{Ref_{SWi}\}$ and $\{Ref_{SWd}\}$. For each stage (St), we identified 50 representative periods by a visual analysis of EEG and EMG. These periods were chosen in several parts of the recording. The mean vector of these 50 periods was used as a reference vector for this stage $\{Ref_{St}\}$.

During the analysis session, for each period (t), we calculated four weighted distances: $D_W[t]$, $D_{REM}[t]$, $D_{SWi}[t]$ and $D_{SWd}[t]$ of the characteristic vector $\{V_i(t)\}$ to the four reference vectors $\{Ref_{St}\}$. The shortest of the 4 distances defines the vigilance stage during this period. The weight (W_i), associated to the vector coordinate $V_i(t)$ is used to modulate the influence of the i coordinate on the stage calculation. This weight reflected that some parameters were more significant than others to determine the stage.

$$D_{St}[t] = \sum_{i=1 \text{ to } 7} W_i (V_i[t] - Ref_{St\ i})^2$$

where St is one of the 4 stages and i is the i^{th} coordinate of the $\{Ref_{St}\}$ vectors.

The accuracy of detection was then controlled on several periods in different points of the recording. If bad detections were observed the weights could be adjusted to suppress these errors or another set of reference vectors could be chosen.

We have introduced persistence in the detection system by smoothing the parameters on the 3 periods before the analysed period t using the following formula:

$$V_i[t] = (V_i[t-3] + 2 V_i[t-2] + 3 V_i[t-1] + 4 V_i[t]) / 10$$

This smoothing avoided bad detections due to punctual artefact and reflected that a stage transition could be validated only if the new stage lasted more than two periods.

At the end of the analysis light and deep slow wave sleep were associated to define slow wave sleep.

$$SW= SWI + SWd$$

This smoothing avoided bad detections due to punctual artefact and reflected that a stage transition could be validated only if the new stage lasted more than two periods.

At the end of the analysis light and deep slow wave sleep were associated to define slow wave sleep.

$$SW= SWI + SWd$$

2.8 Statistics.

Due to the variance of heterogeneity in several cases (Bartlett test), statistical comparisons were achieved using non parametric tests. For comparison of multiple groups, the Kruskal Wallis test was used. Mann-Whitney U-test was then used to compare two groups of unpaired data.

3. Results

3.1 Hypnogram

Our automatic system gave for each 5.12s period the sleep stage of the mouse. Figure 1 shows an example of hypnogram. This figure represents 1 hour of recording (703 periods). Three representative EEGs and EMGs are given for REM sleep, waking and deep slow wave sleep .

REM sleep is characterized by high energy peak in the theta band, negative Kurtosis (EEG) and very low total energy in EMG. Waking is characterized by low energy in the delta band, some energy in the gamma band and energy in the EMG. Light slow wave sleep is characterized by energy in the delta band and low energy in the EMG and deep slow wave sleep is characterized by high total energy and energy in delta band of EEG and very low energy in EMG. We noticed on the hypnogram that REM sleep always occurred after slow wave sleep, as expected.

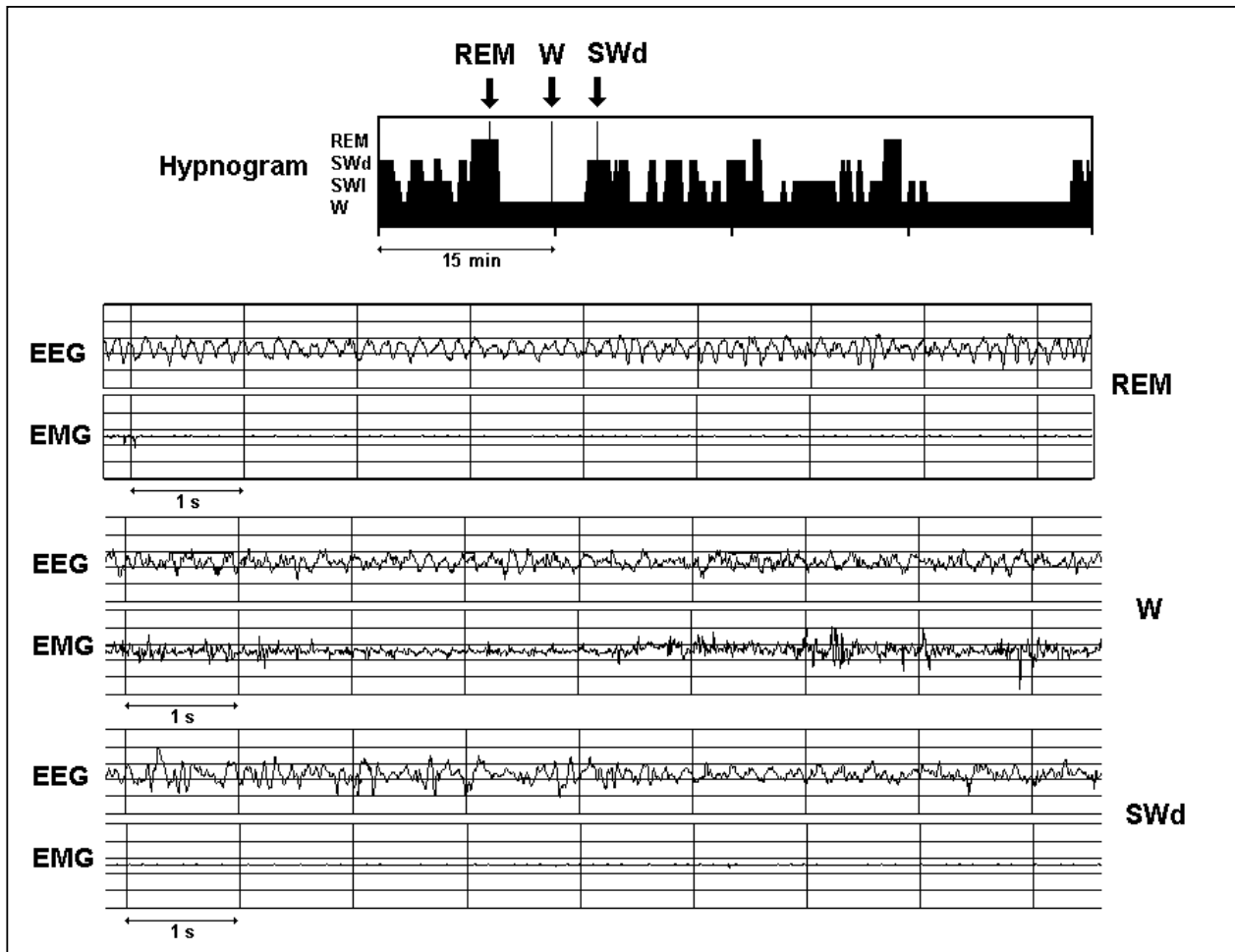


Figure 1: The upper figure is a one hour hypnogram. Level 0 is undefined stage, 1 (W) is waking, 2 (SWI) is light slow wave sleep, 3 (SWd) is deep slow wave sleep and 4 (REM) is paradoxical sleep. Lower figures show period of EEG and EMG recordings corresponding to the 3 arrows on the hypnogram.

3.2 Validation of the staging system.

The automatic staging system was controlled by 2 methods. First we performed a visual control of the staging on samples randomly chosen. The agreement between the computer determination and the visual analysis was better than 98 %. Most of the errors were at the transition point between two stages. A second method was the global control on each histogram of the lack of REM sleep occurrence during waking. In normal sleep physiology REM sleep always occurs after a slow wave sleep period.

We have also evaluated the sensitivity of the system using pharmacological controls. Mice were treated with drugs known to modify sleep. We used modafinyl a drug which increases for several hours the waking stage and doxilamine a hypnotic drug. Doxilamine was chosen because unlike barbiturates or benzodiazepines, it did not induce EEG abnormality during sleep (high frequency waves in the beta band). The treatments were performed at 10 AM during the quiet phase of circadian rhythms of the mice.

Modafinyl increased waking time portion from 37.5 ± 2.5 % (10 mice) to 48 ± 4.6 % (10 mice) during the 24 hours after injection. Doxilamine increased sleep time portion from 52.5 ± 3.9 % (10 mice) to 70.6 ± 3.7 % (10 mice) during the 2 hours after treatment. These results were in agreement with the expected effects of these drugs.

3.3 Intoxication with low doses of soman

We defined 3 groups of mice, the control saline group (10 mice), the soman 30 μ g group (10 mice) and the soman 50 μ g group (10 mice).

Two days after the beginning of the EEG/EMG recordings the mice were injected with soman SC or saline SC. All the injections were performed at 10 AM during the light phase.

3.3.1 Clinical observations

Mice treated with 30 μ g/kg of soman did not exhibit any sign of intoxication, their behaviors were similar to those of the control saline group. We did not observed qualitative difference in locomotor, feeding and grooming activities.

As previously observed by Baille (2001) animals treated with 50 μ g/kg of soman exhibit very few symptoms. During the first hour after treatment, only a hypoactive behavior and for some of them weak tremors were noticed.

3.3.2 Spectral modifications

For each mouse the mean energies in the delta , theta and gamma bands were calculated in 1 hour intervals (703 periods) during 24 hours and in 6 hours intervals (4218 periods) during the 9 days of the experiment which gave individual kinetic curves. The mean curves for each group was then calculated. Results obtained in the delta and theta bands are shown in Figure 2 and 3. Figure 2a and 3a represent the 24 first hours after intoxication and figure 2b and 3b represent the 6 hour values during the 9 days of the experiment.

Cycle amplitudes, acrophase and minimums of cycles were calculated using the one hour curves during the 7 days after treatment. We have superimposed the 7 daily curves and we have averaged them. Then the mean curves for each group were calculated. The difference between the minimum and the maximum defined the amplitude of the cycles, we have extracted the times of the minimum and of the maximum. This last time defines the acrophase time.

Control mice

Delta and theta energies presented circadian cycles. The acrophase of delta energy was observed during the light phase at 10 AM. Minimal energy occurred at 6 PM in the beginning of the dark phase.

The theta acrophase was observed at the beginning of the dark phase (7 PM) and the minimum occurred at about 12 AM.

The circadian cycle was disturbed during the treatment day (3rd day), in control animals we observed a transient increase of theta energy during the hour of the injection while it should have been near its minimum in the other circadian cycles.

Mice treated with soman at 50µg/kg

Delta band:

The main effect of 50 µg/kg of soman on the delta band was an immediate significant increase of energy in this slow wave band during the 3 hours after injection with a maximum 2 hours after injection($p < 0.02$). Then the energy was lower than for the control mice until the end of the recording with a slow return to control values. Cycle amplitude was also reduced for 2 days .

We didn't observe any phase shift of the circadian cycle of delta energy.

Theta band:

In the theta band, we observed a significant decrease of energy during the first 6 hour period after intoxication ($p < 0.05$), this effect was in symmetry with the delta band increase and looked like an energy transfer from the theta band to the delta band.

Then during the 2 following days, we observed an increase of theta energy over the control animals level. This increase was significant ($p < 0.05$) 18 hours after intoxication. Then the theta energy returned to control value but cycle amplitude remained higher than in control mice. Acrophase time of the theta cycles was not modified.

Gamma band:

In gamma band, no modification of the mean energy was observed after soman. Energy in the gamma band was low (about 4% of the energy of the EEG spectrum) and only major modification of this band could be detected with our system.

Mice treated with soman at 30 µg/kg

No significant results were observed with the 30 µg/kg dosage but some tendencies which corroborated results with the 50 µg/kg dose could be observed.

Theta band:

The 30 µg/kg dose of soman did not induce early effects on the theta band except during the hour after injection where we did not observe the increase in the theta band seen on the control mice. During the 2 days after treatment, as for the 50 µg/kg dosage, we could notice a slight increase of energy in the theta band mainly at the acrophase but this increase was not statistically significant.

Delta band:

We didn't observe any effects during the first hours but during the 2 following days, we observed similar effects as at the 50 µg/kg dosage: a decrease of the energy in the delta band with a slow return to the control value at the end of the experiment.

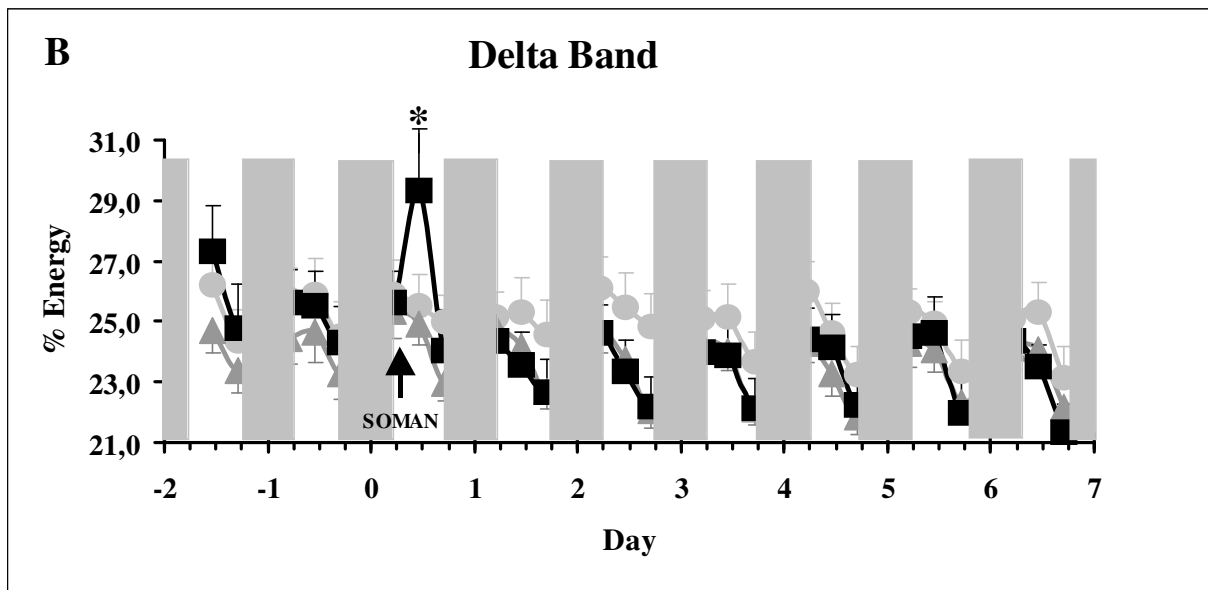
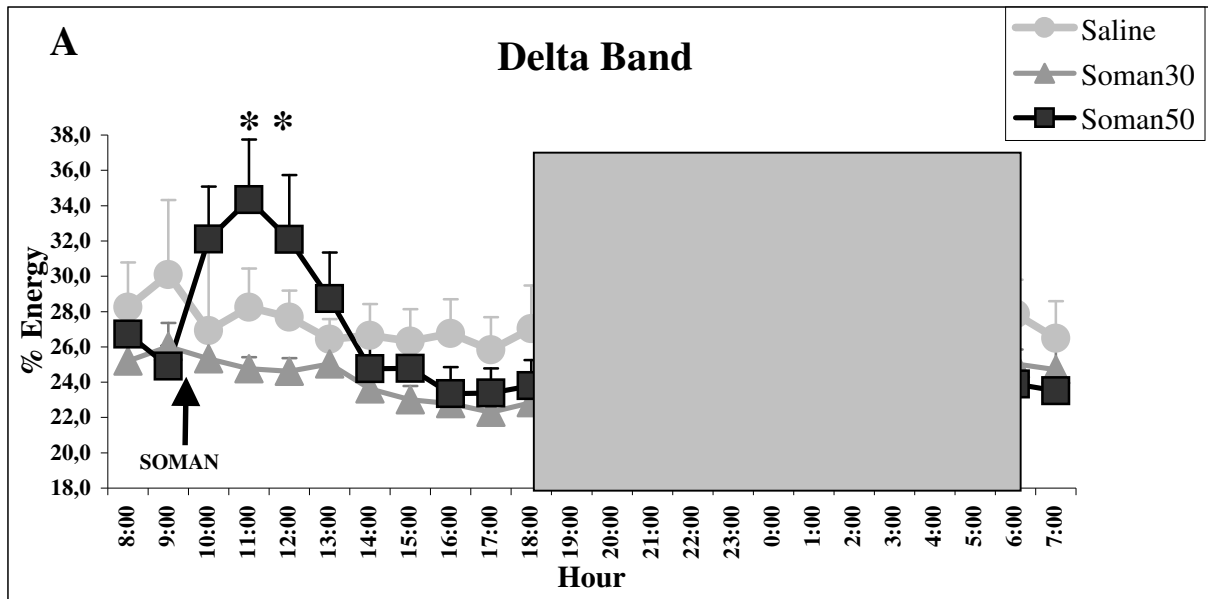


Figure 2: Mean energy in one hour period (A) and 6 hour period (B) in the delta band as a percentage of total energy in EEG. Gray zones correspond to the dark periods. The points were the mean values in each group (Light gray circle: Saline [10 mice], gray triangle: soman 30 [10 mice] and black square: soman 50 [10 mice]). *: $p < 0.05$ between control and soman 50 groups.

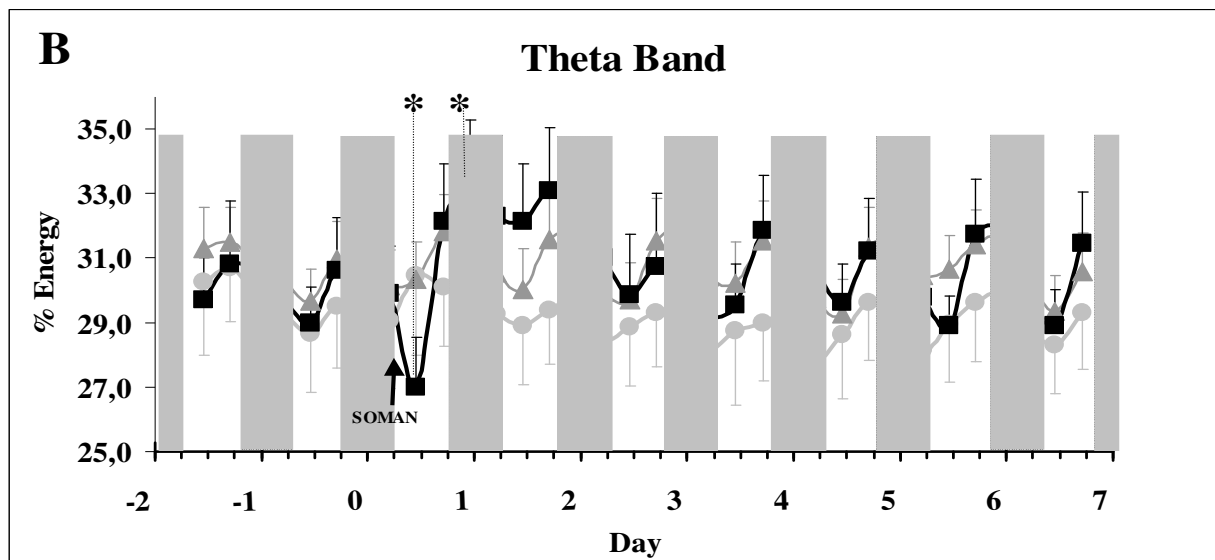
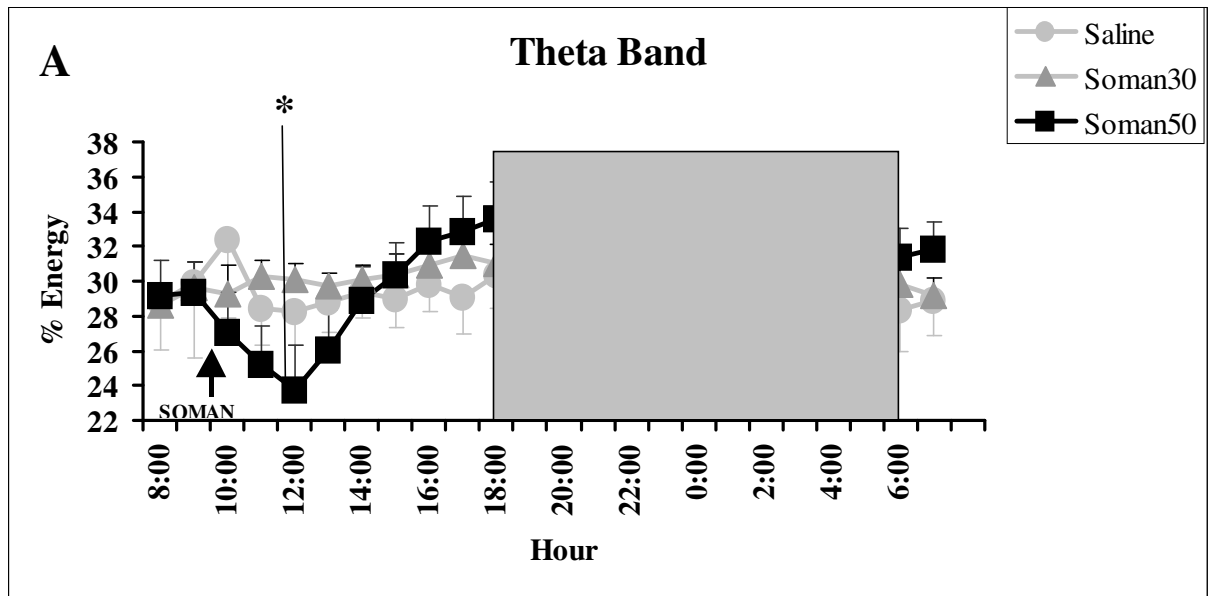


Figure 3: Mean energy in one hour period (A) and 6 hours periods (B) in the theta band as a percentage of total energy in EEG. Gray zones correspond to the dark periods. The points were the mean values and SEM in each group (Light gray circle: Saline [10 mice], gray triangle: soman 30 [10 mice] and black square: soman 50 [10 mice]). *: $p < 0.05$ between control and soman 50 groups.

3.3.3 Slow wave sleep disruption

To evaluate the effects of soman on sleep time we had to use the mice as their own control to minimize the effects of individual heterogeneity. We determined for each mouse the percentage of variation of sleep time versus its baseline sleep time. This was calculated as the mean sleep time during the 2 first days before the treatment with soman or saline. The mean and SEM of these baseline values was 58.0 ± 2.2 % of the time or 835 min/24hours.

Figure 4 presents for each group the variations of the time ratio spent in slow wave sleep during the 24 hours and 6 hour periods during the following nine days of the experiment. The 6 hour curve allows the observation of the circadian cycles while the 24 hour curve presents the global tendency of the sleep pattern.

Control mice

Sleep cycles present an acrophase at 11 AM where mice spent 65 % of time (39 min/hour) in SWS stage. After 4 PM mice began to be awake and SW stage reached its minimum (46 %) at the beginning of the dark period at 7 PM. Then sleep time increased and returned to 60 % at 2 AM, and remained high until the acrophase. In the control mice, we observed a light decrease of daily sleep time after the 2 first days then sleep time did not change during the 7 days after treatment.

Mice treated with soman at 50µg/kg

During the first 6 hour period after intoxication we observed a significant increase of SW sleep followed during the next dark phase by a marked decrease of sleep time. This decrease could be observed during two days. At the beginning of the third day, SW sleep time increased and stayed over control level for 3 days. A significant increase of sleep time during the 3rd and 4th days was observed in Soman 50 µg/kg group versus control group. Then sleep time returned to control values. At the 6th day SW sleep time decreased again but this result was not significant.

No phase disturbance of the cycle was observed after the second day.

Mice treated with soman at 30µg/kg

Mice treated with 30 µg/kg of soman did not present any significant effect compared to the control and the soman 50 group. After the second day we observed

the same tendencies as in the soman 50 group with an increase of SW sleep time and a return to control values after the 4th day.

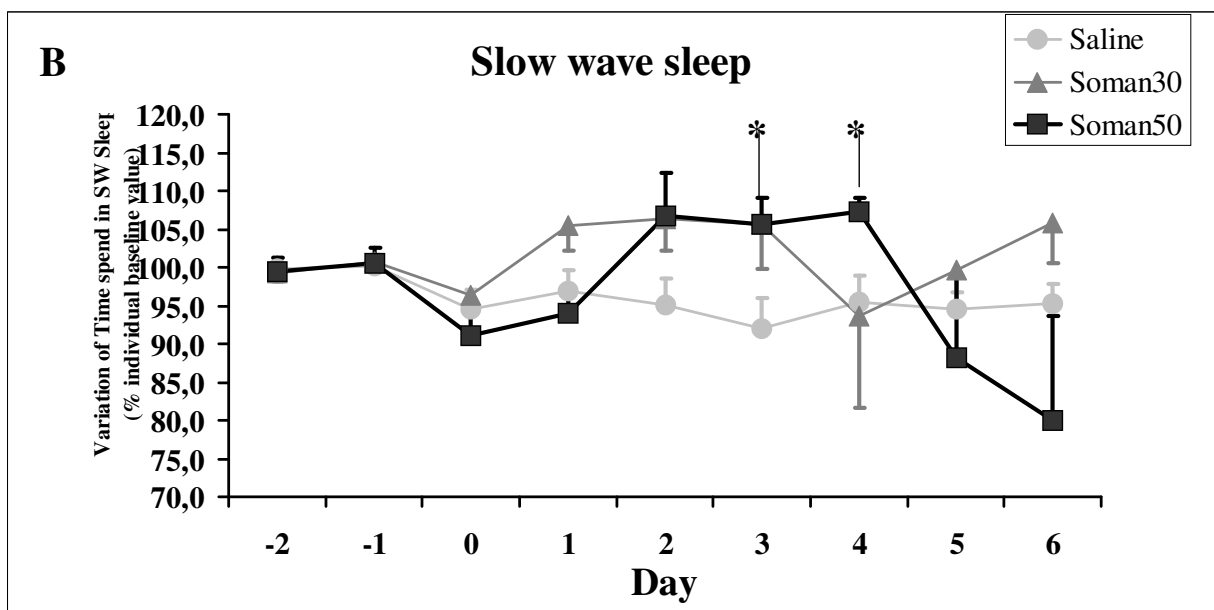
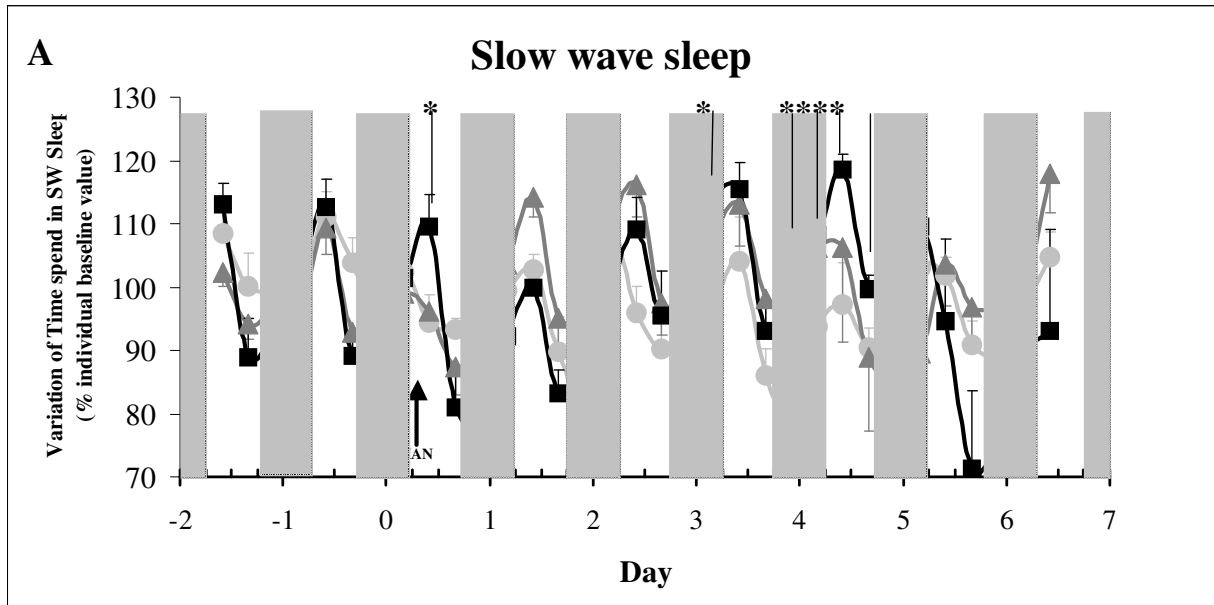


Figure 4: Variation of time spent in slow wave sleep: mean percentage of baseline SW sleep time in 6 hours period (A) and in 24 hours period (B). The points were the mean values and SEM in each group (Light gray circle: Saline [10 mice], gray triangle: soman 30 [10 mice] and black square: soman 50 [10 mice]). *: $p < 0.05$ between control and soman 50 groups.

3.3.4 REM sleep disruption induced by soman

The mean REM sleep time of the control mice was about 88 min per day. Figure 5 presents the time spent in REM sleep for each group during the first 24 h and in 6 hour periods during the 9 days of the experiment.

Control mice

The acrophase occurred at 2 PM, 2 hours after the SW sleep acrophase.

The day of the injection REM sleep cycle was disturbed : a 6 hour shift occurred and the maximum REM sleep was observed during the dark phase. This shift disappeared during the following days.

Mice treated with soman at 50µg/kg

In soman 50 group, there was at first a transient decrease of REM sleep followed by an increase during the night. But the main effect of soman was a marked increase of REM sleep time during the light phase of the following day . Compared to the initial REM sleep level of this group, REM sleep time remained higher for 2 days and then returned to initial values. Statistical analysis provided a significant effect 24 hours after injection compared to the control group.

We noticed that for some mice of this group the REM sleep cycle was not well established during the two days before treatment. Some animals of this group seem to need a little more time to be accustomed to the experimental system and to get their sleep cycles back.

Mice treated with soman at 30µg/kg

We observed a phase disruption of the cycle during the day of injection. Then no difference was observed relative to the control group.

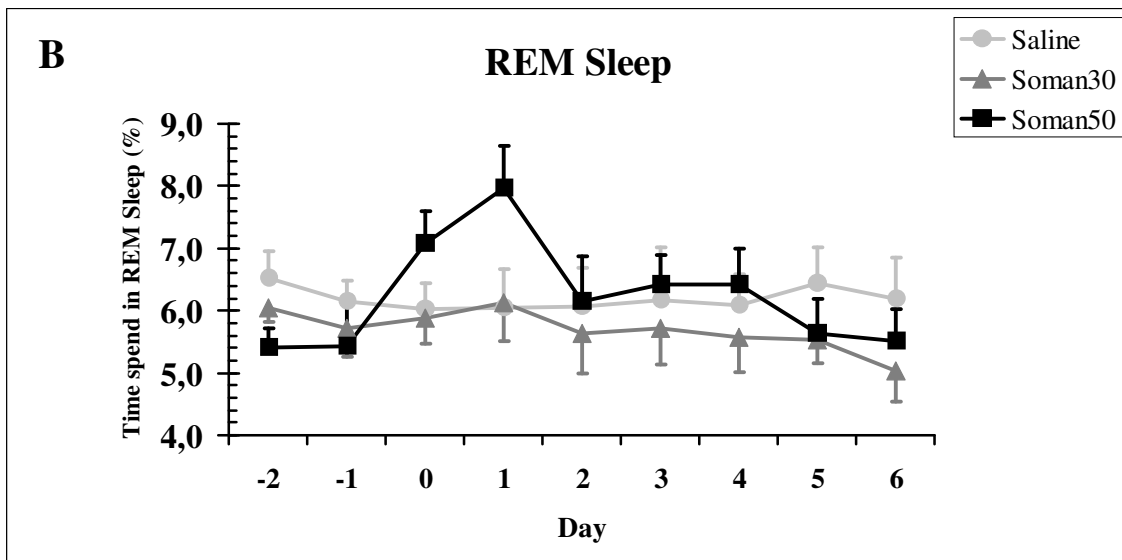
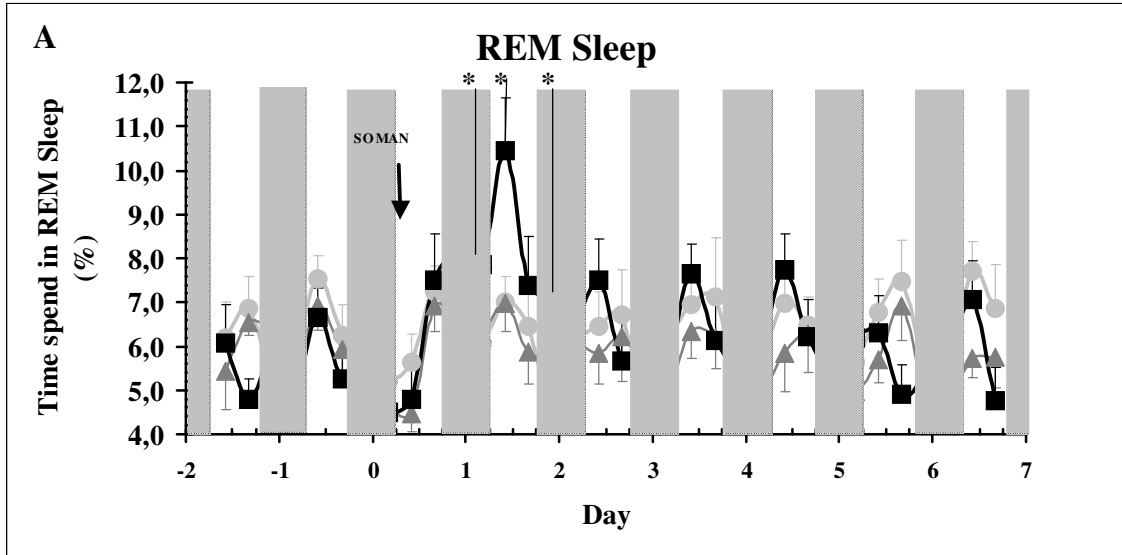


Figure 5: Time ratio spent in REM sleep: mean percentage in 6 hour period (A) and in 24 hour period (B) . The points were the mean values and SEM in each group (Light gray circle: Saline [10 mice], gray triangle: soman 30 [10 mice] and black square: soman 50 [10 mice]). *: $p < 0.05$ between control and soman 50 groups.

4. Discussion

For the control mice group, if we compare the time daily spent in slow wave sleep and in REM sleep to other works (Sei 2001), our mice present a little larger REM sleep time (85 min/day versus 72 min/day) and a larger SW sleep time (835 min/day versus 637 min/day). Our results are consistent with those published results, if we consider that this work was performed with an other mice model and with other experimental conditions.

After soman, some EEG and sleep disruptions could be observed. They could be attributed to three time periods: the early period, during the first 6 hours after intoxication; the intermediate period from 12 hours to 48 hours after intoxication and the late period from 2 to 5 days after soman.

4.1 Early effects (the first 6 hours after soman)

4.1.1 Control mice

During the first six hours after injection of saline we observed in the control animals a disruption of the circadian cycle. Theta energy was higher than during the other cycles with a peak value during the hour of the injection. In parallel slow wave sleep was reduced while it should be at its maximum as in the other circadian cycles. It was a reaction of the mice to the handling and to the subcutaneous injection at a time where they normally were sleeping. It induced a transient hyper waking period translated by the occurrence of theta rhythms on EEG. This effect is consistent with the reduction of slow wave sleep.

4.1.2 Intoxicated mice

On mice treated with 50 µg/kg, we observed an increase of delta energy, a decrease of theta energy and a weak increase of slow wave sleep. All these early effects could be correlated with the occurrence of hypolocomotion and anxiogenic effects observed in Baille (2001) work 30 min after soman. On mice treated with 30 µg/kg of soman we observed no effect during the first 6 hours period after soman while Baille observed a light anxiolytic effect 30 min after soman.

In literature we find a strong link between cholinergic system, GABA-ergic system, anxiety and theta rhythm. Anxiolytic drugs modify theta activity (Zhu 1995). Electrical induction of theta activity present an anxiolytic action (Williams, 1996). Scopolamine

a muscarinic M1 antagonist presents an anxiogenic effect, reduces theta activity and increase delta activity (Smythe 1996) while pilocarpine, a muscarinic agonist increase the power in theta band (Yamamoto 1998). We also notice that GABA-ergic agonists increase energy in delta band as observed by Lancel 1996.

A surprising fact in our results was that soman at 50 µg/kg induced effects which corresponded to an anti muscarinic action while AChE inhibition induced a strong hyper cholinergy. Furthermore, this effect was at the opposite of those observed with mild AChE inhibitors like tetrahydroaminoacridine (THA) used in Alzheimer therapy which increase theta energy (Yamamoto 1998). But our results agree with Timofeeva (2001) works which showed an increase of delta energy and a decrease of fast theta energy during 8 hours, on rats intoxicated with insecticide OP producing an AChE inhibition of about 70 % .

So two hypotheses could be put forward: The first one is that soman toxicity is mediated not only by cholinesterase inhibition but also by a direct inhibition of muscarinic receptors. Such an interaction has already been shown (Kumamoto 1988, Tattersall 1990) but this was only observed at high concentrations of toxicant (Tattersall 1990) which is not in agreement with the soman dose that we have used.

The second hypothesis is that during the first phase of the intoxication with soman at 50 µg/kg we observed a transient activation of GABA-ergic system which would be the main cause of the primary observed symptoms and which would masks the muscarinic effects. This hypothesis is supported by the observation of Jacobsson (1997) who observed an increase of GABA release during an intoxication with soman directly injected in brain structure. Conversely, it is also known that during an intoxication with a convulsive dose of soman GABA_A transmission is impaired while its sensitivity to diazepam is increase (Lallement 1993). These data suggest a complex interaction between GABA-ergic and cholinergic system but a direct study of GABA release into the CNS during an intoxication with a mild dose of soman (50 µg/kg) thus remains to be done.

4.2 Intermediate effects (from 12 hours to 48 hours after soman)

In mice treated with 50 µg/kg of soman, we observed 12 hours after injection an inversion of the early effects. We have an increase of theta energy versus control level for 2 days and a parallel decrease of delta energy in the same period. We

observed a decrease of slow wave sleep and a marked increase of REM sleep. All these effects corresponded to a muscarinic activation.

In Baille's results (2001) 24 hours after soman 50 µg/kg the anxiogenic effect disappeared and a light anxiolytic effect was observed. This result is in accordance with the reversion of the early effects that we observed within our parameters.

This reversion could be explained by the disappearance of the hypothetical early GABA control which allowed the appearance of muscarinic symptoms.

The maximum increase of REM sleep occurred at its acrophase the day after the intoxication. This effect is in accordance with literature where muscarinic control of REM sleep is well established (Gnadt JW 1986, Marrosu F. 1995, Gillin J.C 1993).

If we consider the close link between REM sleep and cholinergic activation this result indicates that in spite of retroregulation processes the cholinergy remains elevated during at least 2 days after intoxication with soman.

We also noticed that during this period slow sleep presented a light decrease but no shift and no amplitude decrease of the sleep circadian cycles were observed in spite of the cholinergic regulation of circadian rhythms (Szymusiak 1993).

4.3 Late effects (2 days to 5 days after soman)

After two days most of the muscarinic effects disappeared. The cholinesterase activity recovery was slow. In a previous study Baille (2001) has shown that soman (50µg/kg) induced a 56 % inhibition of brain cholinesterase 30 min after injection which was still 35% 7 days after intoxication. In our experiments, we considered that inhibition in brain and blood should be very close to Baille's results since we worked on the same mice model and with the same protocol of intoxication. In spite of this relatively high inhibition of cholinesterase we did not observe any symptoms which could be linked to hypercholinergy at this time. It probably results from regulatory processes like retrocontrol by M2 autoreceptors which reduce hypercholinergy (File 1998), receptor desensitization or negative feed back on receptor neosynthesis.

The only effect that we observed during this period was an increase of slow wave sleep during the 3rd and the 4th day after intoxication. This period corresponds in severe intoxication with soman to the apparition of the delayed toxicity of this compound. It was interpreted like a release of soman from deposits in fat tissue This delayed toxicity seems to appear without anticholinesterase activity (Wolthuis 1981) and could be observed through an hypothermic action (Coudray 1983). It could be

mediated by the central alpha adrenergic system (Buccafusco 1986). The increase of sleep time that we observed might be considered like the same phenomenon during a mild intoxication.

At the end of the seventh day after soman intoxication no differences to the control group were observed. The only trace of intoxication was the cholinesterase activity which did not fully recover.

5. Conclusion

Sleep disturbances and EEG disorders appear after soman intoxication even at low doses. No long lasting effects could be observed regarding these parameters after a single low exposure to soman. The effects of chronic exposure to low doses of OP should now be explored.

REFERENCES

Baghdoyan, H. A., Monaco, A. P., Rodrigo Angulo, M. L., Assens, F., McCarley, R. W., and Hobson, J. A. (1984). Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs. *J Pharmacol Exp Ther* 231, 173-80.

Baille, V., Dorandeu, F., Carpentier, P., Bizot, J. C., Filliat, P., Four, E., Denis, J., and Lallement, G. (2001). Acute exposure to a low or mild dose of soman: Biochemical, behavioral and histopathological effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 69, 3-4.

Buccafusco, J. J., and Aronstam, R. S. (1986). Clonidine protection from the toxicity of soman, an organophosphate acetylcholinesterase inhibitor, in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 239, 43-7.

Coudray Lucas, C., Prioux Guyonneau, M., Sentenac, H., Cohen, Y., and Wepierre, J. (1983). Brain catecholamine metabolism changes and hypothermia in intoxication by anticholinesterase agents. *Acta Pharmacol Toxicol Copenh* 52, 224-9.

Duffy, F. H., Burchfiel, J. L., Bartels, P. H., Gaon, M., and Sim, V. M. (1979). Long-term effects of an organophosphate upon the human electroencephalogram. *Toxicol Appl Pharmacol* 47, 161-76.

Duffy, F. H. (1980). Long-term effects of an organophosphate sarin on EEGs in monkey and humans. *Neurotoxicology* 1, 667-689.

Earnest, D. J., and Turek, F. W. (1985). Neurochemical basis for the photic control of circadian rhythms and seasonal reproductive cycles: role for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4277-81.

File, S. E., Gonzalez, L. E., and Andrews, N. (1998). Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic1 receptors. *Behav Neurosci* 112, 352-9.

Fullerton, C. S., and Ursano, R. J. (1990). Behavioral and psychological responses to chemical and biological warfare. *Mil Med* 155, 54-9.

Gillin, J. C., Salin Pascual, R., Velazquez Moctezuma, J., Shiromani, P., and Zoltoski, R. (1993). Cholinergic receptor subtypes and REM sleep in animals and normal controls. *Prog Brain Res* 98, 379-87.

Gnadt, J. W., and Pegram, G. V. (1986). Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. *Brain Res* 384, 29-41.

Itowi, N., Yamatodani, A., Kiyono, S., Hiraiwa, M., and Wada, H. (1990). Development of a computer program classifying rat sleep stages. *J Neurosci Methods* 31, 137-43.

Jacobsson, S. O., Cassel, G. E., Karlsson, B. M., Sellstrom, A., and Persson, S. A. (1997). Release of dopamine, GABA and EAA in rats during intrastriatal perfusion with kainic acid, NMDA and soman: a comparative microdialysis study. *Arch Toxicol* 71, 756-65.

Karasinski, P., Stinus, L., Robert, C., and Limoge, A. (1994). Real-time sleep-wake scoring in the rat using a single EEG channel. *Sleep* 17, 113-9.

Kassa, J., Koupilova, M., and Vachek, J. (2001). The influence of low-level sarin inhalation exposure on spatial memory in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 70, 175-179.

Kumamoto, E., and Shinnick Gallagher, P. (1988). Soman enhances nicotinic depolarizations, and depresses muscarinic hyperpolarizations in parasympathetic neurons. *Brain Res* 458, 151-6.

Kurt, T. L. (1998). Epidemiological association in US veterans between Gulf War illness and exposures to anticholinesterases. *Toxicology Letters* 103, 523-526.

Lallement, G., Carpentier, P., Pernot Marino, I., Baubichon, D., Collet, A., and Blanchet, G. (1993). Transient impairment of the gabaergic function during initiation of soman-induced seizures. *Brain Res* 629, 239-244.

Lancel, M., and Faulhaber, J. (1996). The GABAA agonist THIP (gaboxadol) increases non-REM sleep and enhances delta activity in the rat. *Neuroreport* 7, 2241-5.

Marrosu, F., Portas, C., Mascia, M. S., Casu, M. A., Fa, M., Giagheddu, M., Imperato, A., and Gessa, G. L. (1995). Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* 671, 329-32.

Neckelmann, D., Olsen, O. E., Fagerland, S., and Ursin, R. (1994). The reliability and functional validity of visual and semiautomatic sleep/wake scoring in the Moll-Wistar rat. *Sleep* 17, 120-31.

Robert, C., Guilpin, C., and Limoge, A. (1999). Automated sleep staging systems in rats. *J Neurosci Methods* 88, 111-22.

Sei, H., Oishi, K., Morita, Y., and Ishida, N. (2001). Mouse model for morningness /eveningness. *Neuroreport* 12, 1461-4.

Shiromani, P. J., Overstreet, D., Levy, D., Goodrich, C. A., Campbell, S. S., and Gillin, J. C. (1988). Increased REM sleep in rats selectively bred for cholinergic hyperactivity. *Neuropsychopharmacology* 1, 127-33.

Smythe, J. W., Murphy, D., Bhatnagar, S., Timothy, C., and Costall, B. (1996). Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54, 57-63.

Szymusiak, R., McGinty, D., Fairchild, M. D., and Jenden, D. J. (1993). Sleep-wake disturbances in an animal model of chronic cholinergic insufficiency. *Brain Res* 629, 141-5.

Tattersall, J. E. H. (1990). Effects of organophosphorus anticholinesterases on nicotinic receptor ion channels at adult mouse muscle endplates. *Br J Pharmacol* 101, 349-357.

Timofeeva, O. A., and Gordon, C. J. (2001). Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain Res* 893, 165-77.

Williams, J. A., Comisarow, J., Day, J., Fibiger, H. C., and Reiner, P. B. (1994). State-dependent release of acetylcholine in rat thalamus measured by in vivo microdialysis. *J Neurosci* 14, 5236-42.

Williams, J. H., and Gray, J. A. (1996). Dependence of the proactive behavioral effects of theta-driving septal stimulation on stimulation frequency and behavioral experience: 1. Leverpress experiments. *Psychobiology*. 24, 9-21.

Wolthuis, O. L., Benschop, H. P., and Berends, F. (1981). Persistence of the anti-cholinesterase soman in rats; antagonism with a non-toxic simulator of this organophosphate. *Eur J Pharmacol* 69, 379-83.

Yamamoto, J. (1998). Effects of nicotine, pilocarpine, and tetrahydroaminoacridine on hippocampal theta waves in freely moving rabbits. *European Journal of Pharmacology* 359, 2-3.

Zhu, X. O., and McNaughton, N. (1995). Minimal changes with long-term administration of anxiolytics on septal driving of hippocampal rhythmical slow activity. *Psychopharmacology*. 118, 93-100.

Zoltoski, R. K., Velazquez Moctezuma, J., Shiromani, P. J., and Gillin, J. C. (1993). The relative effects of selective M1 muscarinic antagonists on rapid eye movement sleep. *Brain Res* 608, 186-90. *sleep, Brain Res*, 608 (1993) 186-90.

1.2. CYCLES ET CORRELATIONS

1.2.1. CONTEXTE DE L'ETUDE

L'étude précédente nous a amené à mettre en évidence le bon fonctionnement et ainsi de valider notre système d'analyse automatique de la vigilance. Cette étude nous a également permis de confirmer l'existence de perturbations de la vigilance et des rythmes électroencéphalographiques suite à des perturbations du système cholinergique à un niveau faible, ne produisant pas les symptômes classiques d'une intoxication hypercholinergique.

Une deuxième étude préliminaire a été réalisée avant de pratiquer les expositions aux rayonnements électromagnétiques. Cette étude a pour but de confirmer la faisabilité de l'étude multiparamétrique avec l'ajout de la microdialyse et la mesure de la température corporelle, de valider le modèle multiparamétrique employé, et d'étudier l'évolution des différents paramètres et leurs corrélations.

De plus, le système d'analyse automatique validé chez la souris requiert d'être validé chez le rat. En effet le changement de modèle animal pour les études multiparamétriques, justifié ici par la nécessité d'avoir un animal doté d'un crâne solide pour l'installation de l'ensemble des systèmes de mesure, induit des modifications des caractéristiques spectrales. Les deux espèces rat et souris ne possédant pas exactement les mêmes caractéristiques spectrales de leur EEG de vigilance, il est donc nécessaire de confirmer le bon fonctionnement de la technique d'analyse sur le modèle rat.

La technique de microdialyse employée n'a jamais été mise en œuvre sur une aussi longue durée (3 jours), il est important d'étudier l'évolution de la sécrétion d'acétylcholine sur la durée totale de l'expérimentation mais également de contrôler l'absence de répercussion de cette technique sur la physiologie de l'animal.

De plus les paramètres mesurés grâce à notre système (température, rythme EEG, vigilance, sécrétions d'acétylcholine) subissent des variations circadiennes.

Il nous est donc apparu essentiel de procéder à la détermination de ces cycles sur notre modèle, d'étudier leur amplitude, leur phase ainsi que les corrélations existant entre les paramètres.

1.2.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL SPECIFIQUE

Cette étude a pour but de valider les différentes mesures effectuées dans le contexte de l'étude sur les effets des ondes électromagnétiques non ionisantes. Nous avons donc repris en tout point le protocole expérimental exposé dans le chapitre méthodologie.

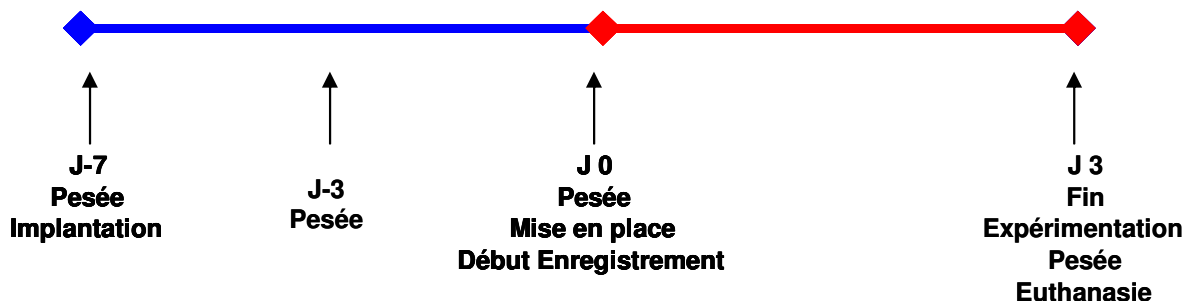
Pour cette étude 11 rats de souche Sprague Dawley ont été utilisés.

1.2.2.1. Procédure

La même procédure que celle décrite pour les expérimentations réalisées avec exposition a été reprise. Les animaux sont implantés 7 jours avant le début de l'expérimentation. Le jour de l'expérimentation ils sont connectés au système de mesure, l'enregistrement de chaque paramètre est réalisé pour une durée de trois jours. Tous les enregistrements sont synchronisés à 12 heures.

A la fin de l'expérimentation les animaux sont déconnectés puis euthanasiés. Pour 4 animaux le cerveau est prélevé en vue de la réalisation d'un contrôle histologique permettant de vérifier de la bonne localisation de la sonde de microdialyse. Pour les 6 autres, le cerveau est prélevé afin de réaliser un dosage de l'activité acétylcholinérasique.

Il est à noter que pour cette étude une attention particulière est donnée au suivi du poids des animaux. Ils sont pesés le jour de l'implantation, 4 jours après implantation, le jour de leur mise en place en expérimentation et le jour de la fin de l'expérimentation, avant leur sacrifice.



Déroulement de l'expérimentation

1.2.2.2. Paramètres EEG spécifiques

Durant cette études nous avons également focalisé notre attention sur la bande θ .

Selon certains auteurs (Marrosu *et al.*, 1997; Timofeeva et Gordon, 2001), la bande θ peut être subdivisée en deux sous bandes, les bandes θ lent (4-6,5 Hz) et θ rapide (6,5-9,0 Hz). La bande θ lent semble être spécifiquement sous contrôle cholinergique, au contraire de la bande θ rapide.

Pour ces auteurs, les origines de ces deux rythmes ne sont pas les mêmes. Le rythme θ lent serait généré au niveau des cellules cholinergiques du septum médian, de la bande diagonale de Broca et contrôlerait l'activité hippocampique via la voie septo-hippocampique (Yamamoto, 1998). Les mécanismes et contrôles du rythme θ rapide apparaissent eux moins bien connus mais ne sont pas cholinergiques (Timofeeva et Gordon, 2001).

L'activation des zones générant la survenue du rythme θ lent ou θ rapide est dépendante de l'état de vigilance. Ainsi une augmentation de l'énergie relative dans la bande θ lent apparaîtrait spécifiquement durant l'éveil calme sans mouvement (Yamamoto, 1998), une augmentation de l'énergie dans la bande θ rapide se retrouve durant l'éveil actif, et une augmentation de l'énergie dans les deux bandes de fréquences serait notable durant les phases de sommeil paradoxal (Vandervolf *et al.*, 1977).

Une telle observation apparaît être un élément supplémentaire nous permettant de mieux faire la discrimination et de diminuer les confusions pouvant exister entre deux états de vigilance proche d'un point de vue électrophysiologique, l'éveil passif sans mouvement et le sommeil paradoxal.

1.2.3. RESULTATS DE L'ETUDE

1.2.3.1. Rythmes et corrélations

Les résultats concernant l'étude multiparamétrique et les corrélations inter paramètres ont fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Journal of Neuroscience Method* en 2005.

Résumé de l'article :

Une étude multiparamétrique, portant à la fois sur un aspect neurochimique, électrophysiologique et physiologique a été réalisée sur des rats vigiles, libres de leurs mouvements. Sur une période de 3 jours, nous avons ainsi simultanément mesuré la sécrétion d'acétylcholine (ACh) dans l'hippocampe au moyen d'une technique de microdialyse, enregistré l'électroencéphalogramme, l'électromyogramme, et la température sous-cutanée. Par la suite, une étude spectrale de l'EEG a été réalisée permettant de déterminer l'énergie relative dans les bandes delta (0-4 Hz), thêta lent (4-6,5 Hz) et thêta rapide (6,5-9 Hz). Les différents états de vigilance ont été quantifiés au moyen d'une méthode d'analyse automatique de la vigilance.

Il a ainsi été possible d'observer les rythmes circadiens de ces paramètres, et de constater que l'éveil, la température corporelle et la sécrétion d'acétylcholine présentent des cycles synchronisés et en phase.

Les relations pouvant exister entre le système cholinergique central et les autres paramètres ont été discutées. Une attention toute particulière a été apportée quant au contrôle cholinergique des rythmes thêta. L'influence des manipulations sur la mesure des paramètres a été prise en compte en considérant spécifiquement les artefacts liés à l'utilisation de neostigmine pour la microdialyse.

**Acetylcholine release, EEG spectral analysis, sleep staging and body temperature studies:
A multiparametric approach on freely moving rats**

David Crouzier, Dominique Baubichon, Frédéric Bourbon and Guy Testylier
Centre de Recherches du Service Santé des Armées, 24, avenue des maquis
du Grésivaudan, BP 87-38 702 La Tronche Cedex, France

Corresponding author: David Crouzier or Guy Testylier, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, 24, Avenue des maquis du Grésivaudan, BP 87, 38702 La tronche Cedex France. Tel: (33) 4 76 63 69 73. Email: david.crouzier@wanadoo.fr, guytestylier@crssa.net

Abstract

We present a neurochemical, electrophysiological and physiological study on freely moving rats. During 3 days we have simultaneously monitored acetylcholine (ACh) release in the hippocampus using the microdialysis technique, electroencephalogram (EEG), electromyogram (EMG) and subcutaneous temperature. A spectral analysis of EEG was performed and sleep stages were determined. Energy ratio in the delta (0-4 Hz), slow theta (4-6.5 Hz) and fast theta (6.5-9 Hz) band was calculated. Sleep stages were quantified using an automatic staging method.

The circadian cycle of these parameters was observed. Waking, body temperature, and ACh release presented synchronized cycles with close acrophases.

The relationship between the central cholinergic system and the other parameters is discussed. The influence of handling on the measured parameters, as well as possible artifacts linked to the use of neostigmine in the microdialysis method are considered. Attention was focused on the cholinergic control of EEG theta rhythms.

Keywords: microdialysis, cholinergic system, EEG spectrum, sleep cycles, neostigmine

1. Introduction

Acetylcholine (ACh) is a well known neurotransmitter involved in some fundamental central functions like waking, control of cognition or memory. ACh release increases during learning processes as described by several authors (Yamamuro et al., 1995; Butt et al., 1997). Furthermore ACh is also involved in the circadian cycles synchronization and the sleep-waking control (Gillette and Tischkau, 1999). Sleep-wakefulness could be divided in three different stages: awake, slow wave sleep and rapid eyes movement (REM) sleep. Brain ACh level in the extra cellular space rises during awakening but also during REM sleep (Marrosu et al., 1995). The use of a cholinergic antagonist such as scopolamine induces a decrease in the percentage of time spent in REM sleep while muscarinic agonist induces an increase in awakening and REM sleep duration (Shiromani and Fishbein, 1986). It has been demonstrated that this physiological cholinergic modulation is exerted via basal forebrain projection (Mesulam et al., 1983; Watanabe et al., 1990).

The cholinergic system is also involved in some electroencephalographic (EEG) wave generation such as the Theta rhythm (frequency: 4-9 Hz), which can be recorded from the hippocampus. This rhythm is observable during wakefulness and REM sleep. Pharmacological studies showed that cholinomimetic drugs induce hippocampal synchronization in anaesthetized and freely moving rats (Kramis et al., 1975; Monmaur et al., 1997). Theta waves seem to be mainly generated by the hippocampus under medial septum control.

Some authors have divided the theta band in 2 frequency bands: the slow theta (4-6.5 Hz) and the fast theta (6.5-9 Hz) (Marrosu et al., 1997; Timofeeva and Gordon, 2001). These bands would be linked to 2 theta generators both depending on the arousal stage.

Thus, slow theta is associated with quiet waking activities. Cholinergic cells of the medial septum and of the vertical limb of the diagonal band act as its pacemaker. This cholinergic control is mediated through muscarinic receptors (Yamamoto, 1998), and control hippocampic activity through the septo-hippocampal pathway.

On the other hand, fast theta can be observed during the active waking phase associated to voluntary movements. Mechanisms and controls of this theta rhythm are less known, but it appears to be atropine resistant (Timofeeva and Gordon,

2001). These 2 types of theta could be observed during REM sleep (Vandervolf et al., 1977).

Finally, the cholinergic system is also involved in the control of body temperature and circadian rhythm. The medial preoptico-anterior hypothalamic area is known to regulate temperature. This area receives adrenergic and cholinergic inputs. Thus carbachol, an ACh agonist, induces wakefulness accompanied by a fall in body temperature, while scopolamine induces an opposite effect (Birendra and Melvi, 1997). Globally temperature and sleep-waking cycle induce a cross synchronization and modulate each other (Parmeggiani, 1987; Szymusiak and McGinty, 1990).

Altogether, there is a strong link between cholinergic system, electrophysiological rhythms, behavior like sleep, circadian cycle and temperature. We investigated this link through a global approach using neurochemical, electrophysiological and behavioral observations performed on freely moving rats for 3 days. ACh release was measured by the microdialysis method while temperature, EEG and EMG were simultaneously recorded.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

All procedures were in accordance with the standards for animal care established by our institute and were approved by our animal use ethic committee (decree 87-848, official journal of 19 October 1987, edited by the French government).

In this study 11 male Sprague-Dawley rats (Elevage Janvier, France) weighing 300-350 g were used. During the experiment, they were housed one per cage (square Plexiglas cage 30 cm x 30 cm) at controlled temperature (24 °C) with 12h/12h light-dark cycle (dark period from 6 p. m. to 6 a. m.). Food (standard laboratory animal food) and water were available ad libitum.

2.2. Surgery

Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of chloral hydrate (400 mg/kg), and placed in a stereotaxic frame. Before surgery, 100 µl antibiotic (20mg sulfadoxine and 4mg trimethoprim, Borgalâ, Hoeschst Roussel, France) was

injected IM to prevent infections. Superbond (Sun medical) was used to enhance biocompatibility and strengthen the electrodes mounting (this dental glue is designed to adhere to hard tissue and requires prior preparation of the bone surface). After incision, tissue was cleared away and the frontal, parietal and occipital bone surface were scraped to remove periostrium. The mordant supplied by the manufacturer cannot be used on bone, and so the cranial surface was treated with a solution of 10% citric acid and 3% ferric chloride prior to application of the Superbond. The bone was rinsed and dried in air. Four epidural silver electrodes were implanted above the right and left hippocampus (center of parietal bone) and above the somatosensory cortex (antero-lateral corner of parietal bone) for EEG recording. Two muscle silver electrodes were introduced between the neck muscle layers for EMG recording. A thermistor was placed between the muscle electrodes for temperature analysis. Electrodes and thermistor were welded to a connector. For microdialysis, guide cannula (MAB 6.14.IC Microbiotech, Sweden) were stereotaxically implanted inside the left CA3 hippocampal area. According to the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1986), the coordinates, relative to the bregma, were 4.6 mm Antero-Posterior, 5 mm Lateral and 4 mm depth under the dura. Connector and guide cannula were attached to the skull with dental acrylic. Skin was sutured in front of and behind the implant. An analgesic was administered sub-cutaneously (5mg flunixin, Finadine, Schering-Plough, France) immediately after surgery and the rats were allowed to recover for one week before the experiment.

2.3 Experimental Procedure

On the day of the experiment, the rats were connected without anesthesia to EEG, EMG, and temperature recorder through a rotating connector (12 ways, Plastics One). The microdialysis probe was inserted in the guide cannula, and connected to the perfusion pump. The microdialysis tubing passes through the central hole of the rotating connector and reaches a rotating cannula to prevent the twisting of tubing and wires (figure 1). All records were synchronized and began at midday (12 p. m.) The rats were followed 70 hours in an isolated chamber with controlled temperature (24°C) and light (from 6 a. m. to 6 p. m.). The first 24 hours were used to determine a baseline value.

At the end of the experiment, the rats were killed with a lethal dose of pentobarbital (1.5 ml Doletal, Vetoquinol, France). Brain was removed for

histological control of correct localization of microdialysis probe or for acetylcholinesterase (AChE) activity measurement.

2.4. Microdialysis of Acetylcholine

We used MAB 6 Microdialysis probes (Microbiotech, Sweden). The membrane was made of polyethersulfone PES with a 15,000 dalton cut off. The size was 4 mm length and 0.6 mm outer diameter. The probe was perfused with Ringer solution (NaCl 148 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂ 1.2 mM) at a rate of 2 μ l/min using a microperfusion pump (CMA 100, Sweden). Neostigmine (10 μ M) was added to the Ringer solution to reduce ACh hydrolysis by AChE at the probe tip (Maysinger et al., 1988). 45 min microdialysis samples were collected every hour and then on-line injected in a high-pressure liquid chromatographic system. The analytic column was coupled with an enzymatic reactor and an electrochemical detector according to Damsma (1988). Ionic chromatography of ACh was performed using a C18 graft column (UP50DB#10M, Intechim, France) with a potassium phosphate mobile phase (75 mM, pH 8.0) with 1-octanosulfonic acid (2.3 mM), KCl (5 mM), ethylenediaminetetraacetate (EDTA) (0.1 mM) and tetramethylammonium hydroxide (TMA) (5.5 mM). The flow rate was maintained at 0.4 ml/min with high-pressure pump (Merck Hitachi L7110) The enzymatic reactor (chromopack IMER) was loaded with 80 units of acetylcholinesterase and 40 units of choline oxydase to obtain hydrogen peroxide from ACh. Hydrogen peroxide was oxidized at 300 mV with platinum electrodes from an electrochemical detector (Coulchem II, USA). The signal was recorded by a computer, and the data analyzed with Labwindows software developed in the laboratory. After each sample injection, the measure was calibrated by an injection of an ACh standard solution (100 nM). All this procedure was computer controlled as shown on the diagram of the system (figure 2).

2.5. Acetylcholinesterase (AChE) Measurement

For 6 of the rats, the brain was removed after experiment and the right and the left hippocampus were dissected. Three groups of rats were produced: the D0 group was immediately dissected at the end of the dialysis, the D+3 group had three days delay between the end of the perfusion and the dissection, three rats were added to create a control group without implantation.

Brain samples were homogenized with a Teflon pestle in a Tris[hydroxymethyl]amoniomethane (Tris) buffer (10 mM, pH 7.2) containing NaCl (1 M), ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetate (EGTA) (1mM) and triton X100 (1% v/v). The homogenates were centrifuged (4500 g, 20 min Sorval SS34) and the supernatant was used to determine the AChE activity using the Ellman colorimetric assay (Ellman et al., 1961). Reading was made with Shimatzu spectrophotometer at 412 nm. Protein concentration was determined using the Lowry colorimetric method (Lowry et al., 1951).

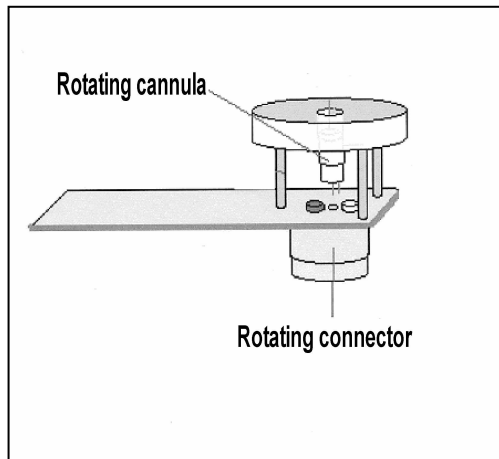


Figure 1: System used to prevent twisting of microdialysis tubing and EEG wires. Diagram of the rotating connector associated with the rotating cannula.

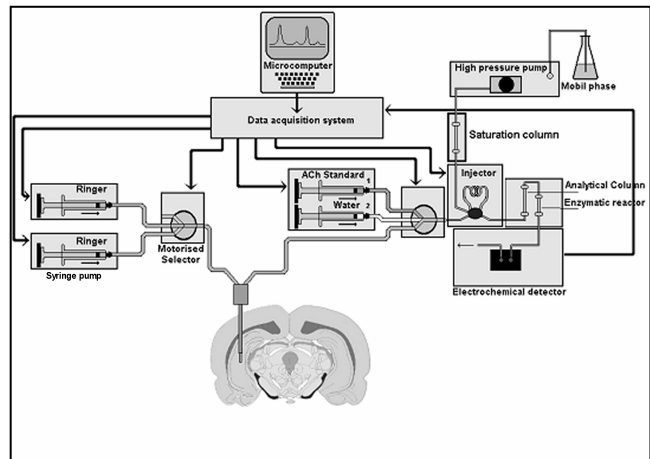


Figure 2: Diagram of the automatic ACh microdialysis system.

2.6. Spectral Analysis

EEG and EMG were recorded continuously on two channels of a REEGA 8 type Alvar electroencephalograph. EEG was recorded from the electrodes implanted above the somatosensory cortex and the hippocampus of the same hemisphere. EMG was recorded from the 2 muscle electrodes. The recording was performed using a 50 Hz analogical filter and a low pass filter at 70 Hz.

Data acquisition and signal processing were performed with Labwindows software developed in the laboratory. The signals were digitized using a PCI 6032 E data acquisition card (National Instrument). Sampling frequency was 200 Hz and data were stored on a PC computer. The signals were segmented in 5.12 second periods. For each period the power spectrum of the signal was calculated by numerical analysis using the Labwindows library software (National Instrument). Total energies of EEG and EMG spectrum were recorded. Energies in different frequency bands (delta band: 0.5 to 4 Hz, slow theta band: 4 to 6.5 Hz, fast theta band: 6.5 to 9 Hz, alpha band: 9 to 14 Hz) were calculated integrating the power spectrum in these frequency windows. These energies were expressed as percentages of the total energy in the spectrum.

A statistical analysis of the signal was also performed. For each EEG period the distribution of the 1024 recorded points were analysed. The standard deviation, the third central moment (skewness) and the fourth central moment (Kurtosis) of the distribution were calculated as described by Karasinski et al., 1994.

2.7. Sleep Staging

An automatic sleep staging system developed in the laboratory was used (Crouzier et al., 2004). As described, a stage was calculated every 5.12 seconds period from the EEG and EMG spectra. Four sleep stages were distinguished: 1. awake (W), 2. paradoxical sleep (REM), 3. light slow wave sleep (SWl) and 4. deep slow wave sleep (SWd). SWl and SWd constitute slow wave sleep (SW). A hypnogram was calculated during three days of recording. High energy in the slow and fast theta bands, negative Kurtosis (EEG) and very low total energy in EMG characterized REM sleep. Waking was characterized by low energy in the delta band, some energy in the slow theta band and EMG. The slow theta band was very important to differentiate REM sleep from quiet waking where there is low energy in

EMG. Slow wave sleep is characterized by high energy in delta band and low energy in EMG.

The concordance of this automatic method with a visual analysis is better than 95%.

2.8. Temperature Recording

Body temperature was measured every ten minutes using an astable multivibrator system (Valvano, 2000). To avoid EEG signal disturbance, the system was only switched on during 10s of measurement recording, every 10 minutes. Signal was treated with Labwindows program developed in the laboratory and stored in a computer. Precision of the system was better than $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$.

2.9. Rat Behavior

An infrared video camera was placed over the cage to observe rat behavior. This observation was mainly used to avoid the wires and tubing being disconnected or twisted. It also allowed a visual detection of abnormal behavior.

2.10. Statistics

All results are presented as mean \pm SEM of n values, n being indicated. Due to the heterogeneity of variance in several cases (Bartlett test), statistical comparisons were achieved using non-parametric tests. Significance was determined using the Wilcoxon test except for Acetylcholinesterase measurements where the Mann Whitney U test was used. Significant correlation between parameters was determined using the R-Spearman test. All calculations were performed using Statistica software version 6.1 (Statsoft).

3. Results

3.1. Behavioral and Clinical Observation

After being connected to the system the rats were put in the experimental cage, we observed an adaptation period so that they would get accustomed to their new environment. At the beginning they showed stress behaviors such as chewing. They displayed exploratory behavior during the following 2 hours. Then the rats became

quiet and they did not exhibit any behavioral abnormalities. They had normal locomotor, feeding and grooming activities.

Out of the 11 rats used, 1 was affected by epileptic seizures after connection to the system. This rat was disconnected and discarded from the study.

3.2. Temperature

Temperature average was $36.9 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ($n=10$) with circadian variations during three days of recording. Temperature is shown on the figure 3. Two curves from the same data are represented, the first one is the average temperature calculated over 6 hour periods and the second one is the average temperature calculated in 1 hour periods. The 6 hour curve gave a global profile of the temperature cycles, while acrophase (time for the maximum of the curve) and minimum cycles were determined using the 1 hour period curve.

Circadian rhythms were observed. Average temperature during the dark phase was $37.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and was $36.7 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ during the light phase, this difference was significant ($T=4$, $p<0.05$). The acrophase ($37.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) occurred between 9 p. m. and 3 a. m., and the minimum temperature ($36 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) was observed between 7 a. m. and 9 a. m. ($n=10$). At the beginning of the curve we could observe high temperatures during the first 3 hours while it should have been near its minimum in the other circadian cycle.

At the end of the experiment during the last 6 hours we observed a decrease of temperature compared with previous cycles but the difference was not significant ($T=19$, $p=0.38$).

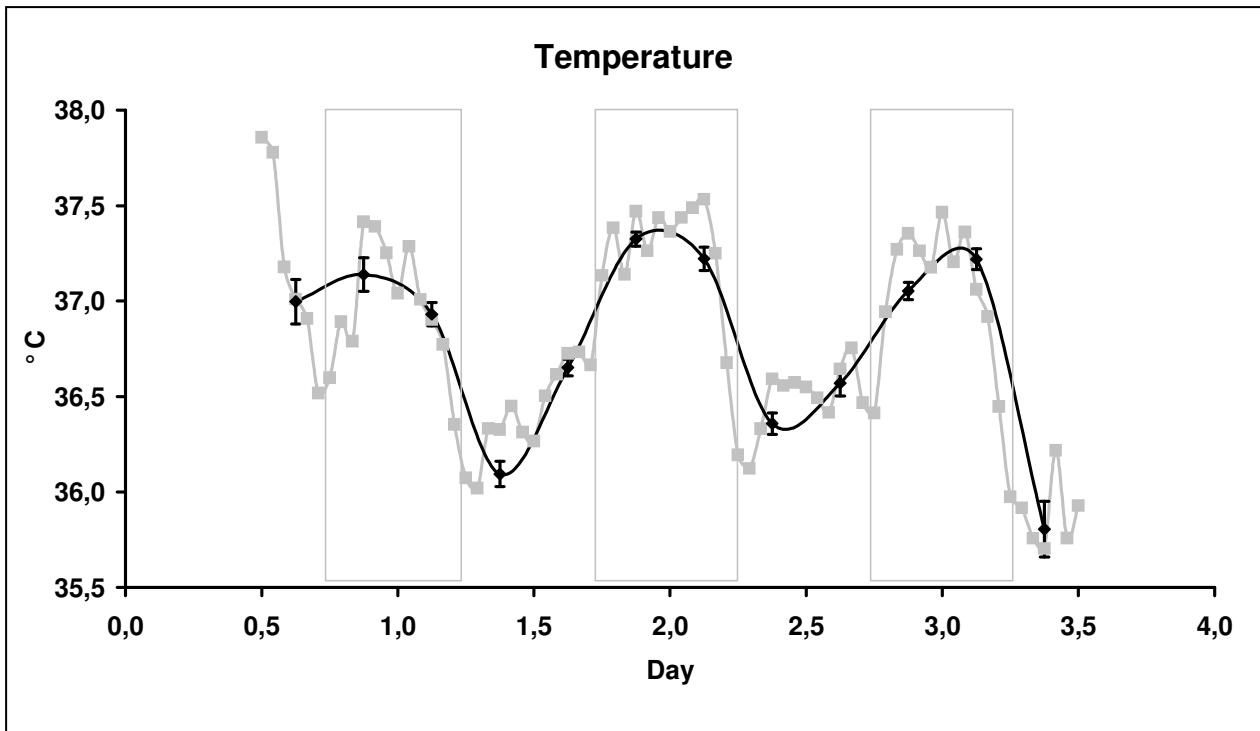


Figure 3: Mean temperatures calculated on 1-h (grey square) and on 6-h (black diamond and SEM) periods. The dark periods are represented by rectangles. Each point represents the mean values of 10 rats.

3.3. Acetylcholine Release in Hippocampus

Results are presented in figure 4. As previously described, two curves of the same data are presented showing the ACh release. On the first, data are obtained by pooling over 6 hours of results, and the second one presents the direct assay of ACh every hour.

Average acetylcholine release on the third day of recording was 40.26 ± 1.45 nM (n=10), but 2 effects were superimposed: a global increase of ACh release during 3 days and a cyclic release of ACh with a circadian rhythm.

Global release of ACh during the three days: The mean ACh release was 24.10 ± 0.88 nM (n=10), it was 35.93 ± 1.29 nM (n=10) and it was 76.68 ± 2.69 nM (n=10) during the first, second and third day respectively. The increase, of about 50 % between the first and the second day and about 113 % between second and third day, was significant (T=2, p<0.01). The increase between the first and the third day reached 218 % (T=1, p<0.01).

Cyclic release of ACh: The first day acrophase was difficult to detect, but it was well defined in the two other cycles. Maximum release was observed during the dark phase. Difference between light and dark phases was globally a significant increase of 43 % (T=1, p<0.01) corresponding to ACh concentrations of 33.51 ± 0.99 nM during the light phase and to 47.82 ± 1.42 nM during the dark phase (n=10). We could also notice an increase of the amplitude of the cycle. The minima of the cycles presented a small variations (from 17 nM to 23 nM, (T=13, p=0.13)) while the maxima presented a strong increase (from 30 nM to 119 nM (T=3, p<0.05)).

At the beginning of the 1 hour curve: The ACh release during the light period was near the same than during the following dark period.

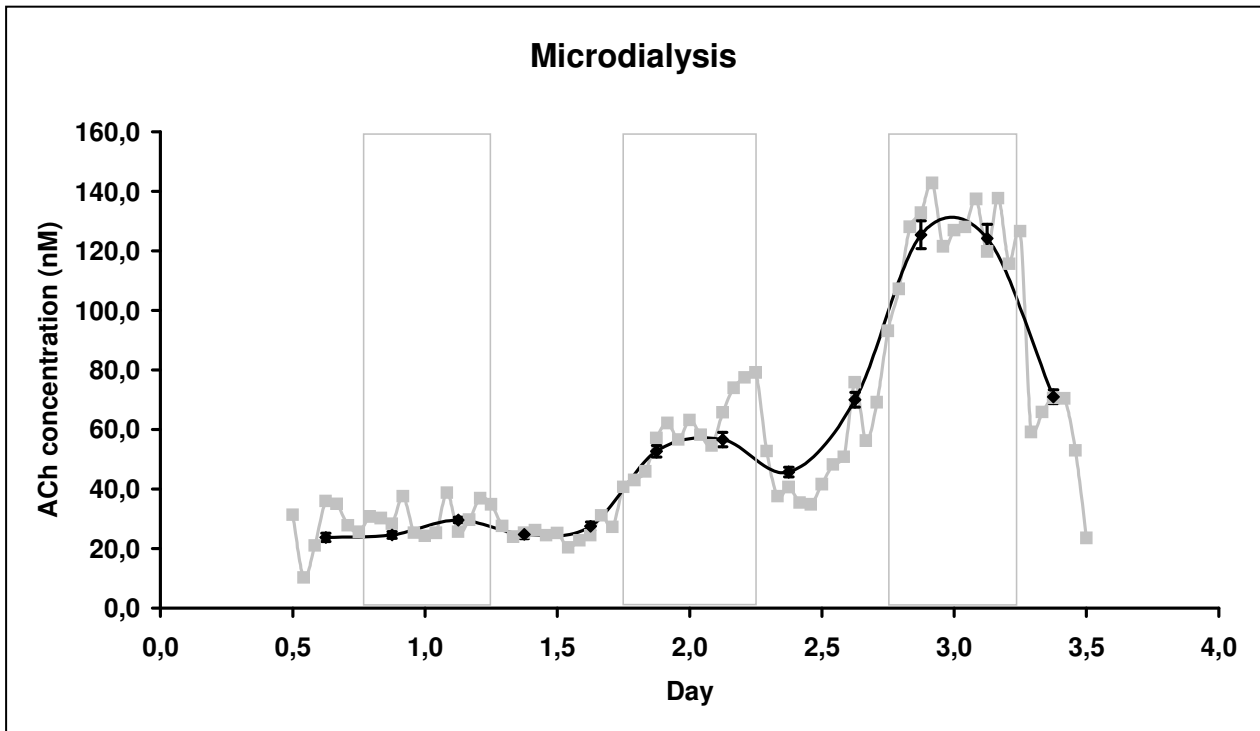


Figure 4: Mean ACh release calculated on 1-h (grey square) and on 6-h (black diamond and SEM) periods. The dark periods are represented by rectangles. Each point represents the mean values of 10 rats.

3.4. Acetylcholinesterase activity

A global increase of ACh release was observed during the experiment. We have tested the hypothesis that an inhibition of AChE by accumulation of neostigmine could explain this phenomenon. We compared AChE activity in the implanted hippocampus and in the contralateral hippocampus.

Results are presented figure 5. An important inhibition of AChE was observed between dialyzed and contralateral hippocampus in the D0 group. The inhibition in the two hippocampus of the D0 group differed from the control group ($U=2$, $p<0.05$). The inhibition of AChE in the dialyzed hippocampus reached 54 % after 3 days of dialysis but disappeared in less than 3 days after the end of perfusion ($U=2$, $p<0.05$). No differences were observed between right and left hippocampus of the control animals and of the D+3 group ($U=7$, $p=0.08$).

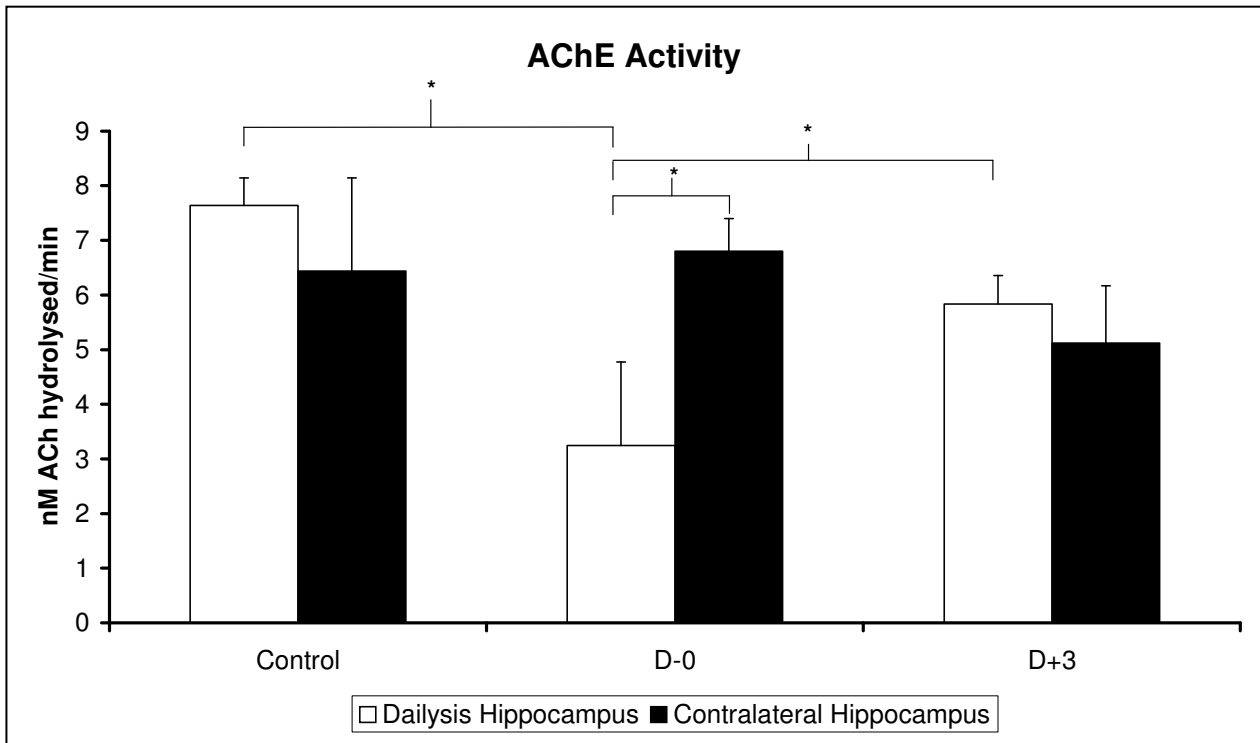


Figure 5: Acetylcholinesterase activity in the right or left hippocampus. Light: left and probe side, black: right and contra lateral side. Mean value and SEM were expressed for each group: control (n=3), D-0 group (n=4) and D+3 group (n=3). () represents $P < 0.05$.*

3.5. Spectral Analysis

Figure 6 represents the relative energy in the 4 bands (delta, slow theta, rapid theta and alpha band) during the 3 days of the experiment.

3.5.1. Delta Band (0.5-4 Hz)

Slow waves (delta band) had the most important relative energy with an average value of 28.18 ± 0.81 % (n=10, \pm SEM) over three days of recording. There was a significant difference (T=0, p<0.01) between mean delta energy during the 3 a. m. to 3 p. m. period (29.39 ± 0.78 %, n=10 \pm SEM) and the 3 p. m. to 3 a. m. period (27.38 ± 0.84 %, n=10 \pm SEM). Circadian cycles could be identified with an acrophase occurring at the morning light transition (5 a. m.-7 a. m.).

Furthermore during the three first hours after connection to the system, high energy in delta bands could be observed.

3.5.2. Slow (4-6.5 Hz) and fast (6.5-9 Hz) theta Bands

Energy in the slow theta band was more important (25.23 ± 0.38 %, n=10 \pm SEM) than in the rapid theta band (22.35 ± 0.53 %, n=10 \pm SEM), it was not a significant difference (T=13, p=0.14). Variations of energy in slow and fast theta bands were opposite, giving mirror curves as shown in figure 6. Slow and rapid theta energies presented circadian cycles. The acrophase of the slow theta band was synchronized with delta activity (5 a. m.-7 a. m.) while energy in the fast theta band was at its minimum. The acrophase of the fast theta band was at the beginning of the dark period (6p. m.-7 p. m.).

3.5.3. Alpha Band (9-14 Hz)

The alpha band had the lowest relative energy in the EEG. The mean value during the three day was 15.19 ± 0.24 % (n=10). No circadian variations could be observed, and energy was quite stable.

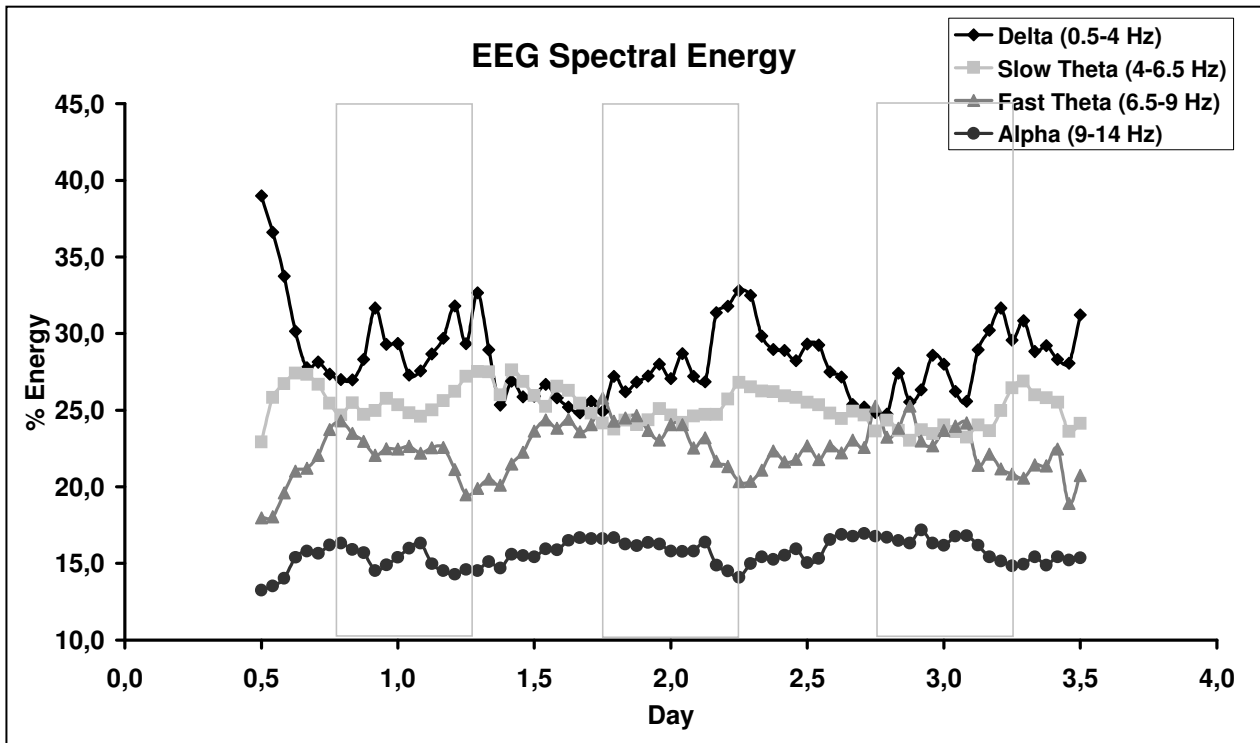


Figure 6: Mean energy in spectral bands determined on 1-h periods. The energy in the delta band (Black diamond), slow theta band (light grey square), fast theta (medium grey triangle) and alpha band (dark grey circle) were calculated as percentage of total EEG energy. The dark periods are represented by rectangles. Each point represents the mean values of 10 rats.

3.6. Sleep Staging

Figure 7 shows the relative time spent in each stage of the three described during each hour. During the three days of the experiment the mean time spent in the different stages was: 51.79 ± 1.43 %, 41.57 ± 1.49 %, 6.49 ± 0.33 %, (n=10) for waking, slow wave sleep and REM sleep respectively.

3.6.1. Waking

We observed 2 levels of time spent in the awake stage depending on the light cycle. The higher level was during the dark phase in accordance to rat nocturnal behavior: 59.50 ± 1.66 % versus 44.15 ± 1.62 % (n=10) of the phase duration, dark and light phases respectively. The minimum was observed between 6 a. m. and 3 p. m. An increase of waking time could be observed 2-3 hours before the end of light phases, and a decrease began 2-3 hours before the end of dark phases.

During the 5 first hours of the experiment waking time was high while it was low during the corresponding time in the other cycles.

3.6.2. Slow Wave Sleep

The percentage of time spent in slow wave sleep varied inversely with those of waking. Mean value was 49.25 ± 1.43 % and 33.89 ± 1.50 % (n=10) during light and dark phases respectively.

3.6.3. REM Sleep

The mean REM sleep time during the light and dark phases was similar (light: 6.47 ± 0.38 %, dark: 6.50 ± 0.26 %, n=10, T=14, p=0.17). A circadian cycle of REM sleep could be observed with acrophase at the beginning of the dark phase (between 6 p. m. and 7 p. m.). A peak of REM sleep appeared at the end of periods of slow wave sleep. When comparing REM sleep during the first and the last day we could observe a significant increase in REM sleep time (5.45 ± 0.29 %, and 6.96 ± 0.28 %, n=10, T=0, p<0.01).

During the first four hours no REM sleep was observed.

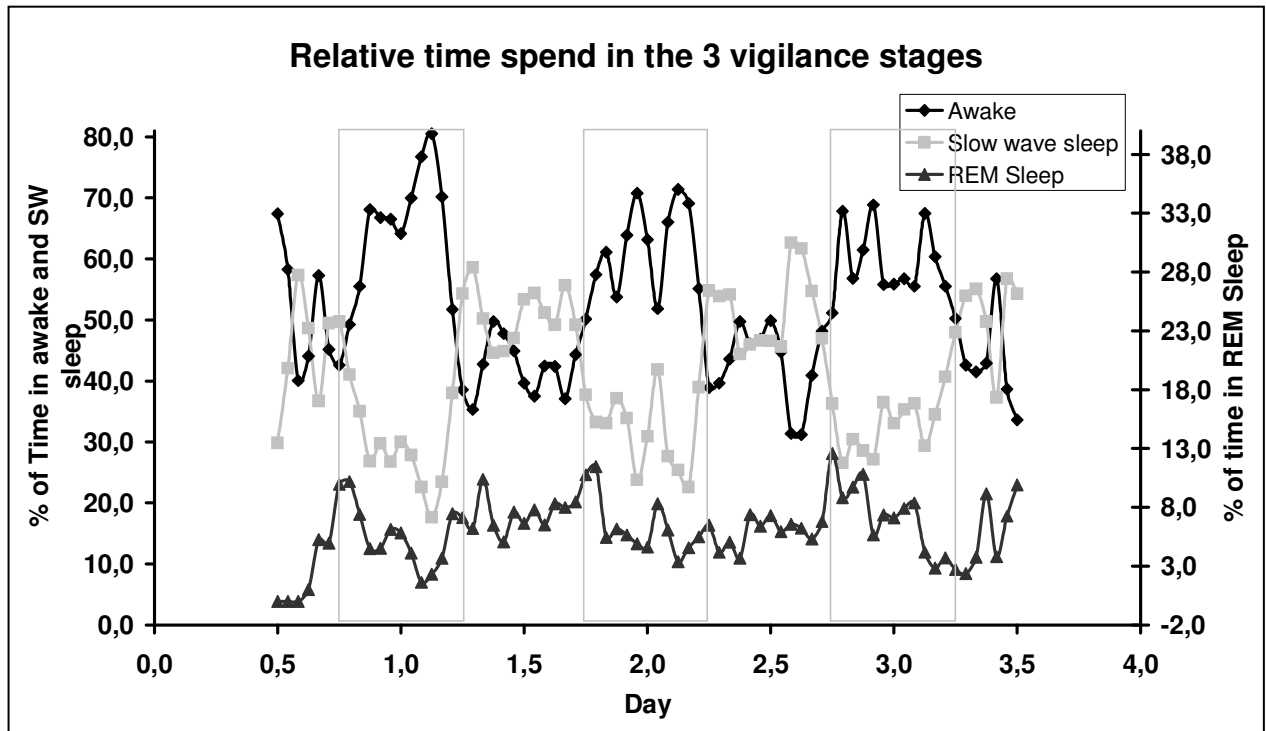


Figure 7: Time ratio spent in wakefulness (Black diamond), slow wave sleep (light grey square) and REM sleep (dark grey triangle): mean percentage in 1 hour periods. The point in the mean value of the group (10 rats).

3.7. Waking, theta, temperature and acetylcholine release correlations

A synchronization of ACh release cycle, temperature and waking could be observed. They all present circadian cycles with the acrophase during the dark period between 7 p.m. and 3 a.m..

The correlations between parameters (ACh, Temperature, slow theta, waking and REM sleep) have been performed using the R Sperm test. Couples of values were obtained from each animal and every hours (mean value on one hour) during 72 hours.

We only observed a significant correlation between temperature and waking ($r_s(516) = 0.22, p < 0.001$), between ACh and slow theta ($r_s(458) = -0.33, p < 0.001$) and between slow theta and REM sleep ($r_s(608) = -0.25, p < 0.001$). No correlation were observed for ACh and waking ($r_s(450) = 0.021, p = 0.64$), ACh and REM sleep ($r_s(449) = 0.084, p > 0.07$).

4. Discussion

4.1. Effect of Neostigmine Perfusion

Our results show a circadian release of ACh superimposed on a global increase of its concentration in samples all along the 3 days of the experiment. Does this increase reflect an increase of the release of ACh or is it a methodological artifact?

Microdialysis assay is a common method to study neurotransmitters' release. However ACh microdialysis presents some specific methodological difficulties: extra cellular concentration of ACh in the brain tissues is too low to be accurately measured. The use of an AChE inhibitor like neostigmine solves this problem and provides a detectable baseline level of acetylcholine (Damsma et al., 1987) but we have to consider the effects of neostigmine over the dialysis period. Most of the experiments using ACh microdialysis never exceed several hours (6 hours). In such lengths of time the baseline level of ACh release seems to be stable enough to consider that the local AChE inhibition is constant. But for a long-term experiment such a hypothesis might not be true.

We observed a 54% inhibition of AChE activity after three days, in the dialyzed hippocampus. Moreover only this hippocampus presented a decrease of activity of AChE, which indicated that only the AChE around the probe was inhibited. AChE activity returned to control level within 3 days after disconnection. An increase of ACh

concentration in dialyzed samples has already been described in a shorter period with a neostigmine concentration lower than 10 μM (Damsma et al., 1987; Keita et al., 2000). So we think that the equilibrium between administration and elimination of neostigmine in the brain was not reached and induced an accumulation of neostigmine near the probe. This cumulative phenomenon could explain the progressive increase of the ACh extracellular concentration. The comparison of the kinetics of the inhibition of cholinesterase with the kinetics of ACh release during the 3 days of the experiment could confirm this hypothesis.

The AChE inhibition caused by neostigmine might have other consequences than the increase of ACh release in the hippocampus. We observed a significant increase of REM sleep and a decrease of body temperature during the maximum of ACh release. We can hypothesize that it might also result from AChE inhibition but it supposed a diffusion of neostigmine from hippocampus to thalamus, tegmentum area and to hypothalamus. This has not been tested but it would be in agreement with Shiromani and Fishbein's (1986) work which demonstrated an increase of REM sleep with the use of a muscarinic agonist and with other studies which have shown a decrease of body temperature after injection of a cholinergic agonist or cholinesterase inhibitor (Birendra and Melvi, 1997; Takahashi et al., 2001).

However, no toxic symptoms could be observed, no tremor, fasciculation or salivation (Rowntree and Bland, 1986 or Puma 1996) appeared during experimentation that showed limited effects of neostigmine in our rats. Because EEG signals were recorded above the contralateral hippocampus where AChE activity in the hippocampus was normal, we could not observe any change of the theta band in spite of its cholinergic control (Keita et al., 2000).

4.2. Circadian cycle and parameters correlations

Circadian cycles could be observed upon awakening. Temperature, ACh release, delta and theta rhythms of EEG during the 3 days of the experiment.

4.2.1. Early effects (First five hours)

During the first 5 hours after connection, these rhythms were not well established and the different parameters were desynchronized. Temperature, ACh release, and awakening were at a high level while they should be near their minimum at that time of the day. This was a reaction of the rats to the stress linked to handling

and to a new environment. As confirmed by the behavioral observation it induced a transient hyper-waking period where rats explored the cage.

On EEG analysis we noticed a transient increase in the delta energy band. This band, which is the slow wave sleep marker, is also used in neuropathology assessment. During wakefulness this band is known to be an indicator of neurological suffering. For example, the delta band is correlated to brain damage induced by organophosphorus compounds (Carpentier et al., 2001), or could be induced by a tumor (Gastaut et al., 1979). Insertion of the probe in the hippocampus just before the experiment induces a lesion and compression of brain tissue in a healthy area. The transient increase of energy in delta band might be linked to this lesion. This was in accordance with Keita (2000) who reported an augmentation of EEG energy 60-120 min after probe insertion. The normalization of delta energy after 5 hours indicates that there is no persistent effect due to probe implantation.

4.2.2. The 5-72 hours period

We consider that during this period the rat was now used to its new environment and that the circadian regulation was again established as shown by the return of the temperature cycle.

Most of our results could be compared to literature values. We found an average temperature of 36.9 °C with cycle amplitude of 0.5 °C, which was in accordance with Endo's (2001) results (mean temperature: 37.04 °C and cycle amplitude: 0.63 °C). Furthermore this latter measured value, performed on a rat modèle using an intraperitoneal probe validated our subcutaneous measurements of temperature.

Our results about ACh release are consistent with Mizuno's (1994) works. Twenty four hours after the beginning of the microdialysis perfusion in the hippocampus, using very close to our experimental conditions, this author observed a daily mean ACh concentration of 28 nM in the microdialysis sample and an increase of 176 % between light and dark periods. During the same period we observed a mean ACh concentration of 36 nM and a variation of 119 %. The difference could be explained by the different lengths of the dialysis membrane used (Mizuno: 1 mm versus 3 mm in our conditions) and the rate of perfusion (Mizuno: 2.5 µl/min versus 2 µl/min in our conditions).

In our spectral analysis we found average relative energies in the delta, slow theta and fast theta bands of 28 %, 25 % and 22 % respectively. These results agree with the previous work of Timofeeva and Gordon (2001). They observed a 27 %, 18 % and 12 % value for the same bands. However, we found more theta energy than in their results. That could be due to two differences in our protocols. Timofeeva and Gordon used occipital and hippocampic electrodes, which provide more energy in high frequency bands. Moreover they also used a telemetric system that disturbs the animal less and decreases its waking time.

In sleep analysis, REM sleep time was observed during 6.47% and 6.50 % of the time during light and dark periods. This result corroborated values obtained by Szymusiak (1990) (6.95 % and 6.95 %). During the dark period, time spent in waking state was similar (59 % for us and 55 % for Szymusiak) but during the light period we obtained a slightly different result (44 % for us against 35 % for Szymusiak). This discrepancy may be due to the intervention in our conditions of the experimenter in the animal environment due to the ringer pump reloading during the day, that disturbed and awakened the rats.

4.2.3. Correlation between parameters

Waking, temperature and ACh release presented in phase cycles with similar acrophase time. Despite the poor correlation coefficient between ACh and the two other parameters, the global tendency of our results corroborates the known relationship between waking and temperature (Szymusiak and McGinty, 1990) and waking and the ACh release (Marrosu et al., 1995).

The low correlation coefficients could result from non-linearity between the parameters and from the dispersion of measurements.

In this study, temperature seems significantly correlated with the wakefulness stages, since it was maximum in the awake phase and also when ACh release was maximum. Nevertheless, studies (Takahashi et al., 2001; Birendra and Melvi, 1997) showing decrease of body temperature after cholinergic agonist injection could appear contradictory with this result. However this was observed with very high cholinergic levels in the hypothalamus far from spontaneous physiological modulation.

We did not observe a correlation between maximum ACh release and maximum REM sleep time in our model. In this study, ACh release was determined each hour

and the maximum REM sleep time was only 12 % of the time during the same period. So it is likely that the increase of cholinergic level linked to REM sleep is jammed by the low cholinergic levels during slow wave sleep. Furthermore the cholinergic brain structures involved in REM sleep generation are meso-pontine nuclei with cortical and thalamic hippocampal projections, but no hippocampic efferences.

Timofeeva and Gordon (2001) have observed disturbance of the theta rhythm induced by a cholinergic agonist, which increased energy in the slow theta band and decreased energy in the fast theta band. While Keita (2000) observed, on anesthetized rats, a shift of the theta frequency peak towards a higher frequency induced by ACh release. In the present study we observed an anti-correlation between ACh release and energy in the slow theta concomitant with an energy transfer between slow theta and fast theta bands. Our results appear to be in accordance with Keita's works.

As a conclusion this work represents a multi parametric study on a free moving rat corroborates some known results. This study allows a long term (3 days) analysis of these parameters and constitutes a preliminary work for other studies on the effects of pharmacological, toxic compounds or physical disruptions.

Acknowledgment: We wish to thank F. Dorandeu, A. Degroot and M. Mar for correction of the English manuscript.

This work was supported by grant Delegation Generale de l'Armement, PEA n°010806

REFERENCES

- Birendra NM, Melvi MJ. Role of cholinergic inputs to the medial preoptic area in regulation of sleep-wakefulness and body temperature in freely moving rats. *Brain Res* 1997;750:311-7.
- Butt AE, Testylier G, Dykes RW. Acetylcholine release in rat frontal and somatosensory cortex is enhanced during tactile discrimination learning. *Psychobiology*. 1997;25:18-33.
- Carpentier P, Foquin A, Dorandeu F, Lallement G. Delta activity as an early indicator for soman-induced brain damage: a review. *Neurotoxicology* 2001;22:299-315.
- Crouzier D, Baille Le Crom V, Four E, Lallement G, Testylier G. Disruption of mice sleep stages induced by low doses of organophosphorus compound soman. *Toxicology* 2004;199:59-71.
- Damsma G, Westerink BH, de Boer P, de Vries JB, Horn AS. Basal acetylcholine release in freely moving rats detected by on-line trans-striatal dialysis: pharmacological aspects. *Life Sci* 1988;43:1161-8.
- Damsma G, Westerink BH, de Vries JB, Van den Berg CJ, Horn AS. Measurement of acetylcholine release in freely moving rats by means of automated intracerebral dialysis. *J Neurochem* 1987;48:1523-8.
- Ellman G.L, Courtney K.D, V A, Featherstone R M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.
- Endo Y, Shinohara K, Fueta Y, Irie M. Influences of cholinergic neurotoxin ethylcholine aziridinium ion on circadian rhythms in rats. *Neurosci Res* 2001;41:385-90.
- Gastaut JL, Michel B, Hassan SS, Cerda M, Bianchi L, Gastaut H. Electroencephalography in brain edema (127 cases of brain tumor investigated by cranial computerized tomography). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1979;46:239-55.
- Gillette MU and Tischkau SA. Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock. *Recent Prog Horm Res* 1999;54:33-59
- Karasinski P, Stinus L, Robert C, Limoge A. Real-time sleep-wake scoring in the rat using a single EEG channel. *Sleep* 1994;17:113-9.

Keita MS, Frankel Kohn L, Bertrand N, Lecanu L, Monmaur P. Acetylcholine release in the hippocampus of the urethane anaesthetised rat positively correlates with both peak theta frequency and relative power in the theta band. *Brain Res* 2000;887:323-34.

Kramis R, Vanderwolf CH, Bland BH. Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol* 1975;49:58-85.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.

Marrosu F, Cozzolino A, Puligheddu M, Giagheddu M, Di Chiara G. Hippocampal theta activity after systemic administration of a non-peptide delta-opioid agonist in freely-moving rats: relationship to D1 dopamine receptors. *Brain Res* 1997;776:24-9.

Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fa M, Giagheddu M, et al. Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving rats. *Brain Res* 1995;671:329-32.

Maysinger D, Herrera Marschitz M, Carlsson A, Garofalo L, Cuello AC, Ungerstedt U. Striatal and cortical acetylcholine release in vivo in rats with unilateral decortication: effects of treatment with monosialoganglioside GM1. *Brain Res* 1988;461:355-60.

Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 1983;10:1185-201.

Mizuno T, Arita J, Kimura F. Spontaneous acetylcholine release in the hippocampus exhibits a diurnal variation in both young and old rats. *Neurosci Lett* 1994;178:271-4.

Monmaur P, Collet A, Puma C, Frankel Kohn L, Sharif A. Relations between acetylcholine release and electrophysiological characteristics of theta rhythm: a microdialysis study in the urethane-anesthetized rat hippocampus. *Brain Res Bull* 1997;42:141-6.

Parmeggiani PL. Interaction between sleep and thermoregulation: an aspect of the control of behavioral states. *Sleep* 1987;10:426-35.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, second ed. Academic Press: San Diego, 1986:Fig.40.

Puma C, Monmaur V, Sharif A, Monmaur P. Intraseptal infusion of selective and competitive glutamate receptor agonist NMDA and antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid spectral implications for the physostigmine-induced hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats. *Exp Brain Res* 1996;109:384-92.

Rowntree CI, Bland BH. An analysis of cholinceptive neurons in the hippocampal formation by direct microinfusion. *Brain Res* 1986;362:98-113.

Shiromani PJ, Fishbein W. Continuous pontine cholinergic microinfusion via mini-pump induces sustained alterations in rapid eye movement (REM) sleep. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;25:1253-61.

Szymusiak R, McGinty D. Control of slow wave sleep by thermoregulatory mechanisms. *Prog Clin Biol Res* 1990; 345:53-64;discussion 65-6.

Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Hypothalamic cholinergic regulation of body temperature and water intake in rats. *Auton Neurosci* 2001;94:74-83.

Timofeeva OA, Gordon CJ. Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain Res* 2001;893:165-77.

Valvano J. Measuring temperature using thermistors. *Circuit cellular on line* 2000;August:1-6.

Vandervolf C, Kramis R, Robinson T. Hippocampal electrical activity during waking behavior and sleep: analyses using centrally acting drugs. *Ciba Found Symp* 1977;58:199-26.

Watanabe H, Shimizu H, Matsumoto K. Acetylcholine release detected by trans-striatal dialysis in freely moving rats correlates with spontaneous motor activity. *Life Sci* 1990;47:829-32.

Yamamoto J. Effects of nicotine, pilocarpine, and tetrahydroaminoacridine on hippocampal theta waves in freely moving rabbits. *Eur J Pharmacol* 1998;359:133-7.

Yamamuro Y, Hori K, Tanaka J, Iwano H, Nomura M. Septo-hippocampal cholinergic system under the discrimination learning task in the rat: a microdialysis study with the dual-probe approach. *Brain Res* 1995;684:1-7.

1.2.3.2. Résultats et discussion complémentaires

A/ Récupération des animaux

Le suivi du poids est généralement un bon indicateur de l'état de santé des animaux. Par son suivi, nous avons cherché à déterminer si l'implantation avait des répercussions importantes sur celui-ci, mais également si le temps accordé entre implantation et début de l'expérimentation était suffisant pour obtenir une bonne récupération des animaux.

Les animaux ont été pesés avant leur implantation (J -7), durant la période post opératoire (J -3), le jour de leur mise en place (J 0) et à la fin de l'expérimentation (J +3). Les résultats sont présentés sur la figure 1a et 1b.

La figure 1a est un histogramme représentant le poids moyen des animaux pour chacune des pesées, la figure 1 b représente la variation relative du poids des animaux exprimée en pourcentage de variation par rapport au poids de la période précédente.

Ces figures mettent en évidence une augmentation générale du poids des animaux sur la totalité de l'expérimentation. Cette observation est en accord avec l'âge des animaux qui se situent en pleine période de croissance.

Cette prise de poids n'est cependant pas régulière. Dans la période J-7/J-3, on observe une faible perte de l'ordre 1,5 %. Cette perte qui s'observe pour 8 rats sur 10 et va jusqu'à -4 %, est assez contenue, et est sûrement liée à l'opération. Durant la journée suivant l'opération, les animaux ne s'alimentent pas ou peu, sont prostrés en raison de l'anesthésie, et des antalgiques. Cependant 7 jours après l'opération, les animaux retrouvent pour tous au minimum leur poids initial et pour 8 un poids supérieur avec une augmentation globale de 4,5% par rapport à leur poids à J-3. aussi bien après l'implantation, que durant la phase de mesure.

La prise de poids se poursuit durant la période de mesure, mais est cependant plus faible (1,8 %) pour une même durée. Deux rats voient leur poids stagner. Cette prise de poids plus faible peut s'expliquer par deux raisons :

-Soit le rat se trouve dans un nouvel environnement, et est légèrement contraint par la présence du système de mesure, ce qui nécessite un temps d'adaptation de sa part et une baisse dans sa prise alimentaire pour la période de mise en mesure.

-Soit la prise de poids pour cette période est normale, mais la prise de poids de la périodes J-3/J-0 est plus importante car elle couvre la perte de la période précédente liée à l'implantation.

Face à ces résultats, malgré l'importance de l'opération subie par les animaux, la prise de poids importante au bout de 7 jours, met en évidence une bonne récupération des rats et des répercussions mineures de l'implantation sur leur état général. La chirurgie est bien supportée, ne provoque pas d'infection. Le temps de récupération post opératoire semble être suffisant pour que l'animal ne se trouve pas affaibli pour la période d'expérimentation.

De plus le fait de se trouver dans un nouvel environnement pour l'expérimentation, et être légèrement restreint dans leurs mouvements par la présence du système de mesure ne semble pas induire de perturbations majeures pour les animaux.

Ces résultats permettent en outre de confirmer la non répercussion de la perfusion de néostigmine via la sonde de microdialyse sur l'état général de l'animal et donc l'absence d'une toxicité générale induite par cette molécule au cours de l'expérimentation.

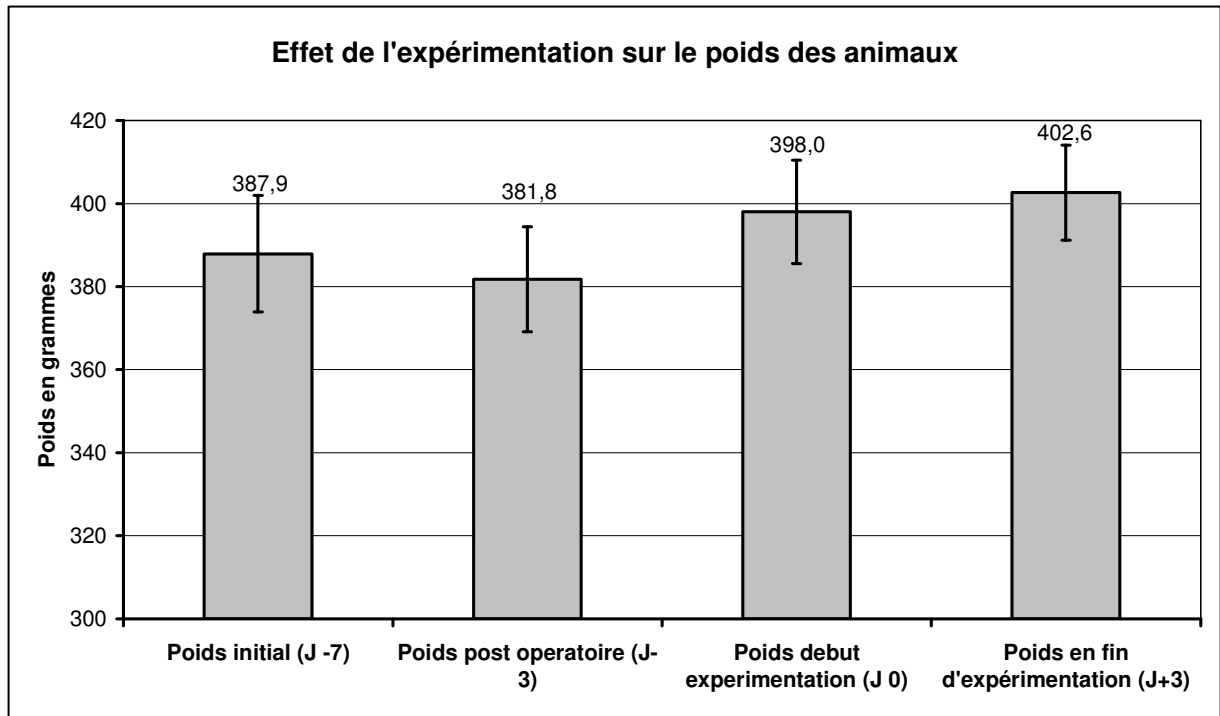


Figure 1a : Evolution du poids des animaux au cours de l'expérimentation. Les valeurs correspondent au poids moyen des animaux pour chaque périodes ($n=10$) \pm SEM.

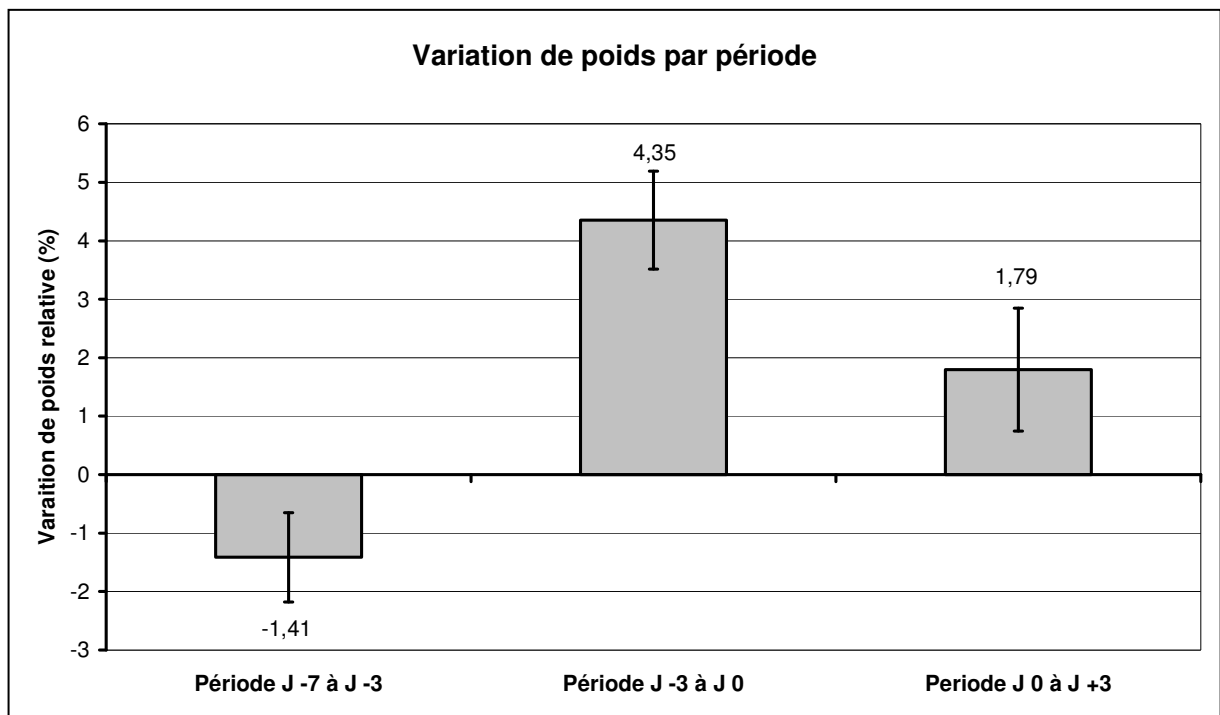


Figure 1b : Variation relative du poids des animaux pour les périodes J -7/J -3, J -3/J0 et J 0/J +3. Les valeurs correspondes à la moyenne de la variation relative pour chaque animal ($n=10$) \pm SEM.

B/ Rythme Thêta

Les bandes de fréquences sont décrites avec des limites très variables selon la source bibliographique. Bien que toujours comprise dans une bande de fréquences allant de 3 à 12 Hz, la bande thêta, selon les études, voit son énergie relative calculée entre autre, entre les fréquences 3-12Hz (Keita *et al.*, 2000), 4-8Hz (Richards *et al.*, 2000), 4-9Hz (Timofeeva et Gordon, 2001), 6-9Hz (Crouzier *et al.*, 2004), 5-10 Hz (Bouwman *et al.*, 2005).

Dans la première étude nous avons choisi de situer la bande dans la gamme de fréquences 6-9 Hz. Grâce à ce choix de fréquences nous avons pu mettre en évidence la relation existant entre θ et cholinergie.

Pour la deuxième étude nous avons voulu affiner la discrimination de deux états de vigilance (éveil et sommeil paradoxal) et avons suivi l'hypothèse de Timofeeva (Timofeeva et Gordon, 2001), mettant en évidence l'existence de 2 bandes θ , la bande thêta lent (4-6,5 Hz) et la bande thêta rapide (6,5-9 Hz), dont seule la bande thêta lent serait sous contrôle cholinergique.

Face aux résultats de l'étude (Crouzier *et al.*, 2005) l'utilisation de ces bandes ne semble pas être concluante et la corrélation entre thêta et cholinergie s'orienterait au contraire en faveur du thêta rapide.

Tout d'abord, d'après la figure 6 de l'article (Crouzier *et al.*, 2005), le thêta lent est proche de son niveau maximum dans les 3 premières heures de l'enregistrement. Or durant cette période, le rat est très agité et présente une très grande activité locomotrice. Le thêta lent, rythme spécifique de l'éveil calme devrait donc être au contraire de ce qui est observé à un niveau bas et le thêta rapide à un niveau maximum.

Par la suite, après avoir repris l'ensemble des corrélations et en les calculant non plus sur les valeurs horaires de chaque paramètre et pour chaque rat, mais en fonction de la moyenne horaire des paramètres, nous avons pu constater :

Une anti-corrélation significative ($R=-0,54$ $p<0,001$) entre thêta lent et sécrétions d'ACh. Cette anticorrélation représentée par la figure 2 va dans le sens contraire d'un contrôle positif du neuromédiateur sur ce rythme EEG.

A l'inverse, la corrélation ACh et thêta rapide bien que non significative ($R=0,13$) est positive. Cette constatation est renforcée par une tendance globale à l'augmentation du rythme thêta rapide de manière concomitante à l'augmentation de

la sécrétions d'ACh (cf. article). Ces résultats vont donc dans le sens d'une dépendance cholinergique du rythme thêta rapide et non du thêta lent, ce qui est en accord avec les travaux de Monmaur (Monmaur *et al.*, 1997) montrant une corrélation positive entre rythme thêta et système cholinergique.

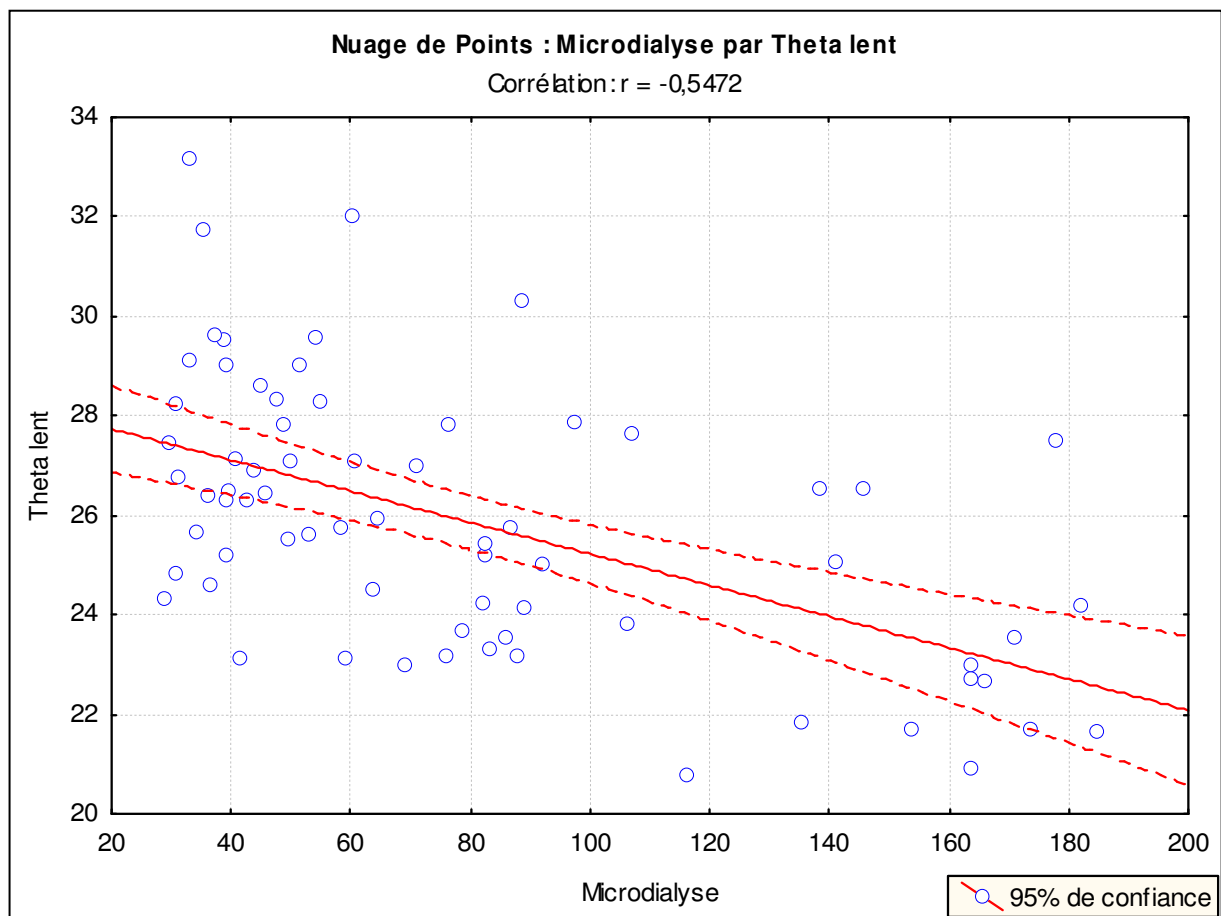


Figure 2 : Corrélation entre Secrétions d'ACh et Thêta lent

De plus, pour Timofeeva, l'énergie relative dans les bandes de fréquences thêta augmente durant les phases de sommeil paradoxal que se soit pour le rythme thêta lent et thêta rapide. Or la figure 3a représente la droites de corrélation entre sommeil paradoxal et thêta lent et la figure 3b représente la droite de corrélation entre sommeil paradoxal et thêta rapide. Ces courbes montrent une corrélation significative ($R=0,73$ $p<0,001$) entre thêta rapide et sommeil paradoxal, alors qu'il existe une anticorrélation significative pour le thêta lent ($R=-0,65$ $p<0,001$). Ces résultats correspondent seulement à une augmentation de l'énergie dans la bande thêta rapide durant le sommeil paradoxal. La sécrétion d'ACh augmentant lors du sommeil paradoxal, ces résultats vont également dans le sens d'un contrôle cholinergique de la bande thêta rapide.

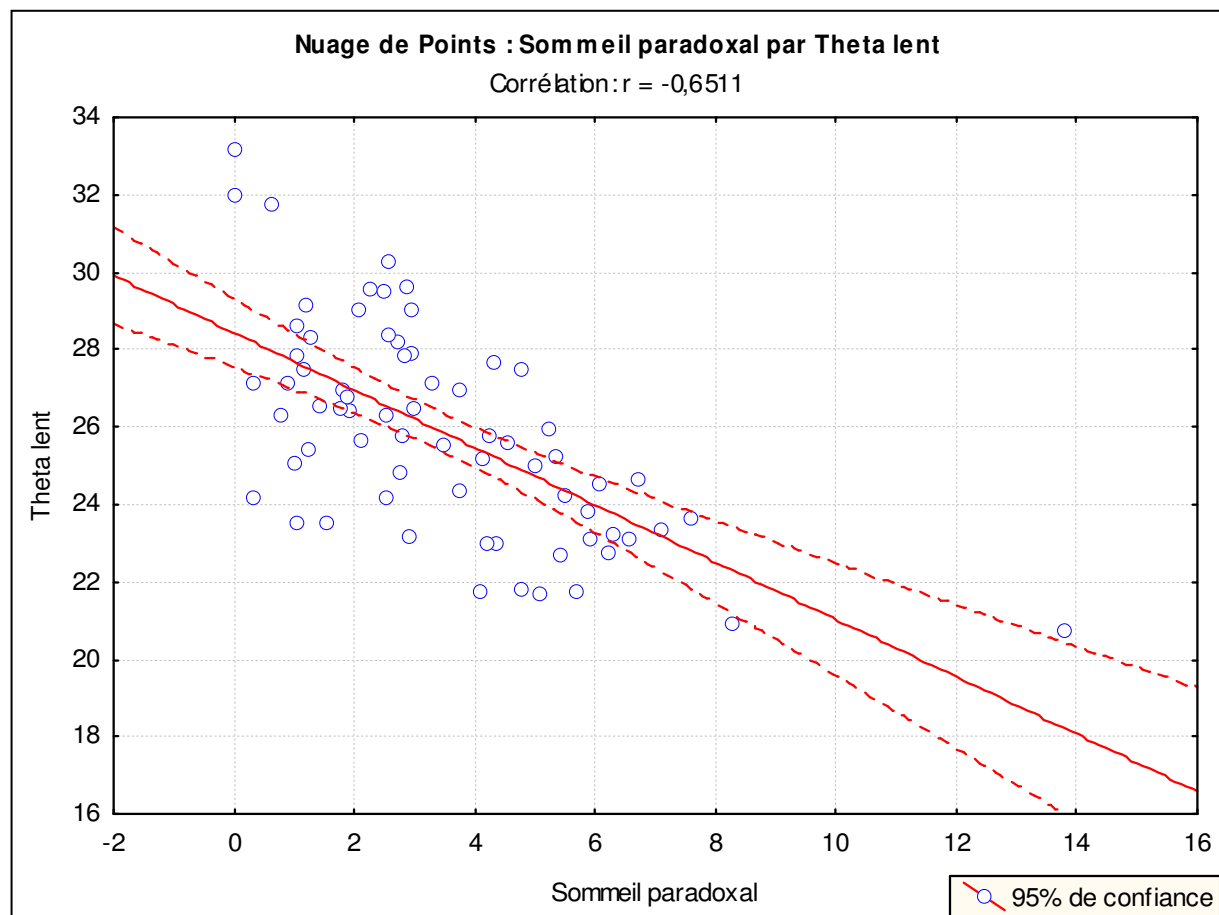


Figure 3a : Corrélation Thêta lent et sommeil paradoxal

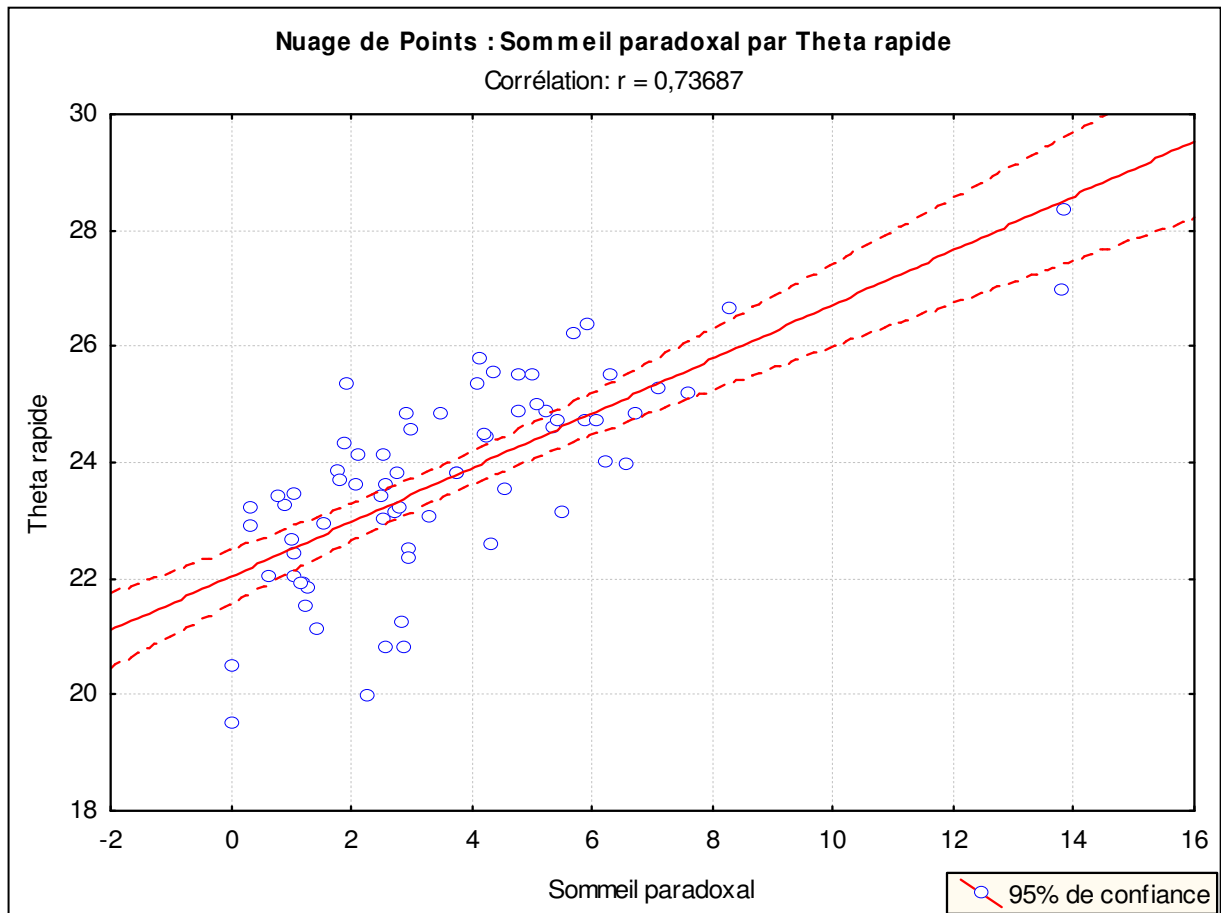


Figure 3b : Corrélation Thêta rapide et sommeil paradoxal

La figure 4 représente la droite de corrélation existant entre thêta lent et thêta rapide. Cette droite montre une forte anticorrélation significative ($R=-0,75$ $p<0,001$) entre les deux bandes de fréquences. Lors de l'augmentation de l'énergie dans une bande on observe de manière symétrique une diminution de l'énergie dans l'autre bande. Cette observation irait donc plus dans le sens de l'hypothèse d'une modulation de la fréquence du rythme thêta hippocampique en fonction de la cholinergie plutôt que dans le sens de l'existence de générateurs distincts des rythmes thêta lent et du thêta rapide. Cette hypothèse confirme l'étude de Keita observant des variations du pic de fréquence thêta en fonction de la cholinergie avec une augmentation de la fréquence lors de l'administration de drogues pro cholinergiques.

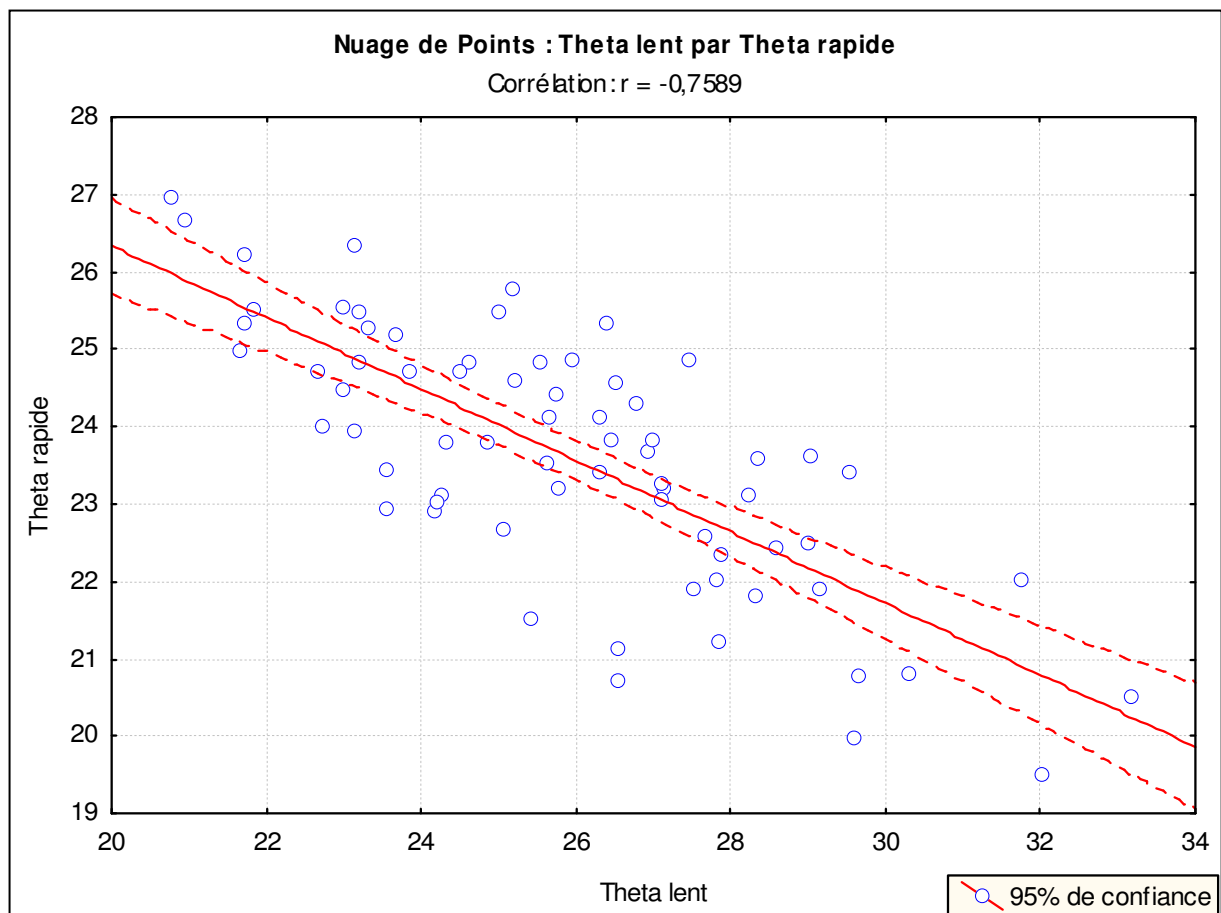


Figure 4 : Corrélation Thêta lent et Thêta rapide

Ces résultats nous ont amené à refaire les calculs des énergies dans les bandes de fréquences en prenant comme bande thêta, la bande 6-9 Hz, mais aussi en prenant la bande thêta 4-9 Hz (somme de l'énergie relative dans les bandes thêta lent et thêta rapide).

La bande thêta rapide (6,5-9 Hz) et la bande thêta 6-9 Hz nouvellement calculée étant très proche, les résultats sont identiques et montrent une bonne corrélation entre la cholinergie et cette bande.

Pour la bande 4-9 Hz, les résultats montrent une nette diminution de la valeur de l'ensemble de coefficient de corrélation ou d'anti corrélations, et ne semble pas montrer de corrélation avec le système cholinergique ($r=-0.12$ $p>0.05$ avec sécrétion d'ACh, $r=-0.24$, $p<0.05$ avec sommeil paradoxal). Thêta lent et thêta rapide étant fortement anti corrélés, cette observation peut provenir d'un effet de moyennage des cycles. La bande 4-9 Hz paraît donc particulièrement peu adaptée pour notre étude.

Ainsi dans notre étude, l'hypothèse de Timofeeva ne semble pas être confirmée. Il est possible que pour notre modèle, le choix des deux bandes de fréquences au sein de la bande thêta n'ait pas été optimal.

Il ressort cependant une bonne corrélation entre cholinergie et la bande 6-9 Hz. Cette bande semble être un bon compromis pour notre étude.

L'observation des EEG confirme ce choix de fréquences en montrant lors des rythmes thêta, et ceci quelque soit l'état de vigilance, un pic de fréquence de forte intensité situé autour de 7,5 Hz.

Pour les études suivantes, nous avons donc décidé d'utiliser la bande de fréquences 6-9 Hz. Pour ce qui est de la discrimination entre sommeil paradoxal et éveil inactif, nous nous attacherons à vérifier que chaque période de sommeil paradoxal soit toujours précédée d'une période de sommeil lent.

1.3. CONCLUSION

Dans cette première partie, nous avons donc pu situer le rôle du système cholinergique dans le contrôle de la vigilance mais aussi des rythmes électroencéphalographiques. Il a été possible de confirmer l'hypothèse selon laquelle une perturbation de la cholinergie se répercute sur les paramètres électrophysiologiques et sur la vigilance, et ceci pour des perturbations d'assez faible intensité.

Cette partie nous a également permis de mettre au point et de valider notre système d'analyse de la vigilance, tout en portant notre attention sur certains artefacts méthodologiques. Il nous apparaît ainsi important pour les études suivantes de considérer la bande thêta dans la fenêtre de fréquences 6-9 Hz, et ne plus porter attention à la notion de thêta lent et thêta rapide, source de confusion et n'ayant pas mis évidence une meilleure relation entre système cholinergique et électrophysiologie.

De plus il nous a été possible de constater la faisabilité de l'étude par microdialyse sur une période de 3 jours mais il faut prendre en compte la dérive de la quantité d'ACh récoltée. Il est cependant impossible méthodologiquement de ce soustraire de cette dérive liée vraisemblablement à l'utilisation de néostigmine (indispensable au bon fonctionnement de la technique). Cette augmentation ne semble qu'être locale et ne se répercute pas de manière conséquente sur les autres paramètres.

Le système d'étude multiparamétrique est donc validé.

Concernant les paramètres mesurés, ce système nous a permis de constater la présence de rythmes circadiens, et le rôle central que présente l'ACh.

Il permet ainsi d'avoir une vue globale des effets au niveaux du système cholinergique central d'un point de vue électrophysiologique, neurochimique, et comportemental.

CHAPITRE 2: EFFETS NEUROPHYSIOLOGIQUES SPECIFIQUES DES CHAMPS DE RADIOFREQUENCES A 1,8 GHz et 2,45 GHz

2.1. INTRODUCTION

Dans la première partie nous avons étudié les retentissements d'une perturbation du système cholinergique sur les paramètres EEG et la vigilance, cette étude nous a également permis d'éprouver notre modèle expérimental ainsi que d'en déterminer les limites.

La deuxième partie expérimentale est consacrée à l'étude des effets spécifiques potentiels des ondes électromagnétiques sur la neurophysiologie, et plus particulièrement sur le système cholinergique.

Pour ce faire, les effets des champs de radiofréquences ont été étudiés à des puissances infra thermiques au moyen de notre modèle multiparamétrique. Deux fréquences ont été choisies de par leur utilisation courante, la fréquence 1,8 GHz fréquence des téléphones portables et la fréquence 2,45 GHz, fréquence de certains radars fonctionnant en bande S, mais également de plus en plus répandue dans les systèmes de communication informatique sans fils de type WiFi et Bluetooth.

Ces deux bandes, bien que proches en fréquence, offrent l'intérêt de pénétrer différemment dans les systèmes biologiques. Ces systèmes très riches en eau présentent en outre une sensibilité spécifique à la fréquence 2,45 GHz (fréquence de résonance de l'eau).

Le but de ce travail étant en partie d'éprouver les normes actuelles de protection aux rayonnements électromagnétiques, nous avons choisi de travailler pour des puissances proches des limites légales d'exposition. Le DAS des animaux non évaluable avec précision nous a conduit à utiliser les limites de densité de puissance. Pour la fréquence 1,8 GHz, nous avons travaillé à la norme d'exposition grand public (9 W/m^2) et à une puissance 5 fois inférieure à cette norme ($1,8 \text{ W/m}^2$). Pour la fréquence 2,45 GHz, nous avons travaillé à la norme grand public (10 W/m^2)

et à la norme d'exposition en environnement contrôlé (50 W/m² dite norme d'exposition des professionnels).

En complément de l'étude neurophysiologique une étude de la composition lipidique et une étude métabolique par RMN ont été réalisées.

Cette étude a été motivée par plusieurs données mécanistiques :

Des perturbations enzymatiques ont été évoquées comme résultant d'orientation de charges dans les champs électromagnétiques, liées à des perturbations des couronnes d'hydratation ou des flux ioniques physiologiques (Collis *et al.*, 1988). Des modifications des délais de recombinaison de radicaux libres ont également été suggérées (Aweda *et al.*, 2003; Ilhan *et al.*, 2004; Regoli *et al.*, 2005), pouvant conduire à la destruction de certaines liaisons chimiques (principalement double liaisons et conduisent à la production de phosphatidylcholine dans insaturées).

Le métabolisme des phospholipides et plus particulièrement la nature de leur tête polaire est dépendante de systèmes enzymatiques à activité rapide (en 30 min ils permettent de méthyler 95 % des phosphatidyléthanolamine les cellules hépatiques) (Vance, 1991). De plus, les acides gras des phospholipides sont généralement insaturés. Ces données font donc des phospholipides des cibles potentielles aux rayonnements RF, pouvant être à l'origine de modifications neurophysiologiques.

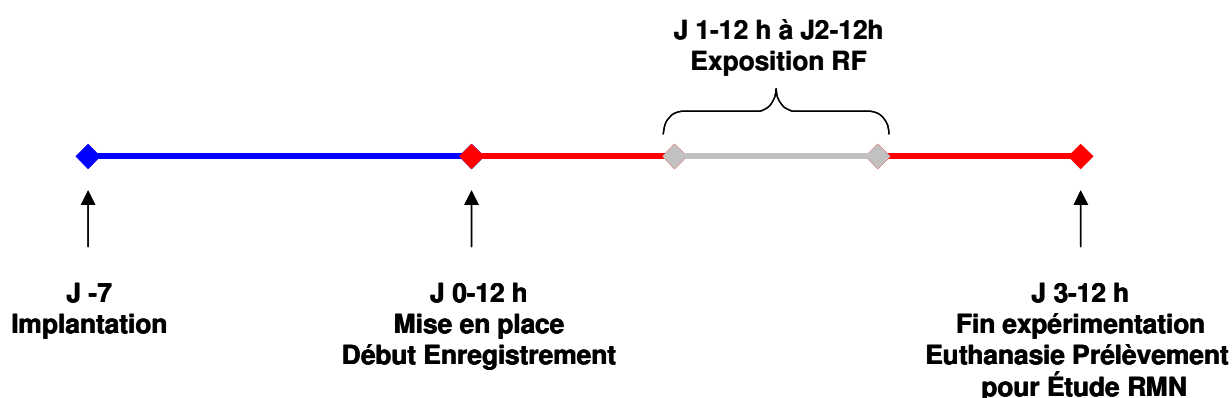
Nous avons choisi de présenter les résultats groupés, les deux fréquences réunies. Dans la première partie nous exposerons les effets sur les paramètres se rapportant à l'état général de l'animal, puis ceux spécifiques du système cholinergique pour terminer par les données métaboliques obtenues par spectrométrie RMN.

2.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL SPECIFIQUE

Le protocole utilisé reprend le modèle d'étude multiparamétrique. Les animaux sont munis de 4 électrodes électroencéphalographiques pour l'enregistrement de l'EEG, 2 électrodes musculaires pour l'EMG, d'une thermistance pour le suivi de la température et d'une sonde de microdialyse pour la mesure du taux d'ACh.

Après 7 jours de récupération post opératoire, les animaux sont mis en place dans la chambre anéchoïque pour l'expérimentation. L'ensemble des expériences est synchronisé à 12h. Les animaux sont exposés ou « sham » exposés à J1-12h pour une durée de 24h, puis restent encore 24 heures en mesure. Les groupes sont composés de 20 animaux pour le groupe témoin, et de 10 animaux pour chacun des groupes exposés, avec 4 groupes exposés (1 groupe par fréquence et par puissance soit groupe exposé 1,8 GHz-1,8 W/m², groupe exposé 1,8 GHz-9 W/m², groupe exposé 2,45 GHz-10 W/m², groupe exposé 2,45 GHz-50 W/m²).

A la fin de l'expérimentation les animaux sont euthanasiés et les cerveaux prélevés en vue de l'étude par RMN. Les hippocampes servent à l'étude métabolique par RMN HR-MAS, le reste du cerveau est utilisé pour l'étude de la composition lipidique des membranes. En raison des difficultés de mise au point de la technique HR-MAS seul les animaux exposés à 2,45 GHz ont fait l'objet d'une analyse exploitable.



Déroulement de l'expérimentation

2.3. ETAT GENERAL DES ANIMAUX

2.3.1. COMPORTEMENT

Observés par l'intermédiaire d'une caméra infrarouge située dans la chambre anéchoïque, les animaux exposés ne semblent pas montrer de modification du comportement comparativement aux animaux témoins et ceci quelque soit la fréquence, ou la puissance d'émission. Pour tous les animaux, il est possible d'observer une phase d'agitation importante durant les 2 heures suivant leur mise en place. Dans un premier temps les animaux sont stressés par leur nouvel environnement et présentent un comportement explorateur marqué. Passé ce période d'adaptation, les rats se calment et retrouvent une activité locomotrice plus faible. Ils se mettent à manger ou se toiletter, ce qui signe le retour à un comportement normal.

A la mise en marche du système d'exposition, et pour quelque exposition que se soit, les animaux ne manifestent aucun signe. Ils n'arrêtent pas leurs activités même transitoirement, ils continuent de dormir, manger, boire... Aucun sursaut ni aucun comportement d'évitement n'est observé. Les animaux ne présentent pas de signes de douleurs tel qu'une prostration, une lordose ou un hérissément du poil.

A la fin de l'exposition et pour les 24 heures restantes, les animaux conservent leur comportement habituel.

De plus l'absence de sursaut et d'évitement confirme que pour ces puissances d'expositions, les animaux ne perçoivent pas les ondes électromagnétiques ce qui pourrait induire un biais extérieur.

Il est à noter que pour cette série d'expérimentation, 4 animaux ont présenté des crises d'épilepsie à leur mise en place. Ils ont été éliminés de l'étude puis remplacés par la suite.

2.3.2. SUIVI DU POIDS

Pour cette partie de l'expérimentation, le poids a également été suivi comme indicateur de l'état de santé général des animaux. Les animaux ont été pesés les jours de leur implantation J-7, à leur mise en place dans la chambre anéchoïque J 0 puis à la fin de l'expérimentation avant leur euthanasie J +3.

Après avoir constaté dans la partie expérimentale précédente que 7 jours était une durée suffisante pour que les animaux récupèrent de manière satisfaisante du choc opératoire, nous nous sommes attachés à inclure dans l'étude seulement les rats ayant retrouvé, le jour de la mise en manipulation, un poids proche ou supérieur de leur poids avant implantation. En effet, un animal n'ayant pas totalement récupéré de l'opération chirurgicale est un animal qui risque d'être malade, affaibli et dont l'état général peut se répercuter sur les paramètres mesurés, et ceci au risque de masquer un effet induit par les ondes électromagnétiques, ou au contraire de potentialiser cet effet.

Afin de se soustraire de ce biais nous avons donc éliminé les animaux ayant perdu plus de 10% de leur poids initial. Cette précaution nous conduit à écarter deux animaux, remplacés par la suite. Ces animaux présentaient une perte de 70 g et de 45 g. L'autopsie a révélé, l'existence d'un hématome intracérébral liée au guide de sonde pour le premier, et une infection importante au niveau de l'implant avec un abcès purulent pour le deuxième.

Notre attention s'est portée par la suite sur la variation de poids observée pour chaque groupe durant la période de mesure soit entre J0 et J3. Cette variation peut être un indicateur de l'effet des ondes électromagnétiques sur l'état général des animaux. Si les champs de radiofréquences induisent un effet anorexigène ou nauséux des animaux, il est possible de s'attendre à une baisse de poids pour les animaux exposés.

La variation de poids relative pour cette période et par groupe est représentée sur la figure 1. Cet histogramme montre pour tous les groupes un gain de poids de l'ordre de 1,8% sur les trois jours. Cette observation confirme ce qui avait été précédemment observé, montrant ainsi la bonne adaptation des animaux au système de mesure. De plus l'absence de différence significative entre les groupes exposés et

le groupe témoins indique que les ondes électromagnétiques n'ont aucune influence sur ce paramètre. L'état général des animaux ne semble pas affecté ce qui confirme les observations du comportement.

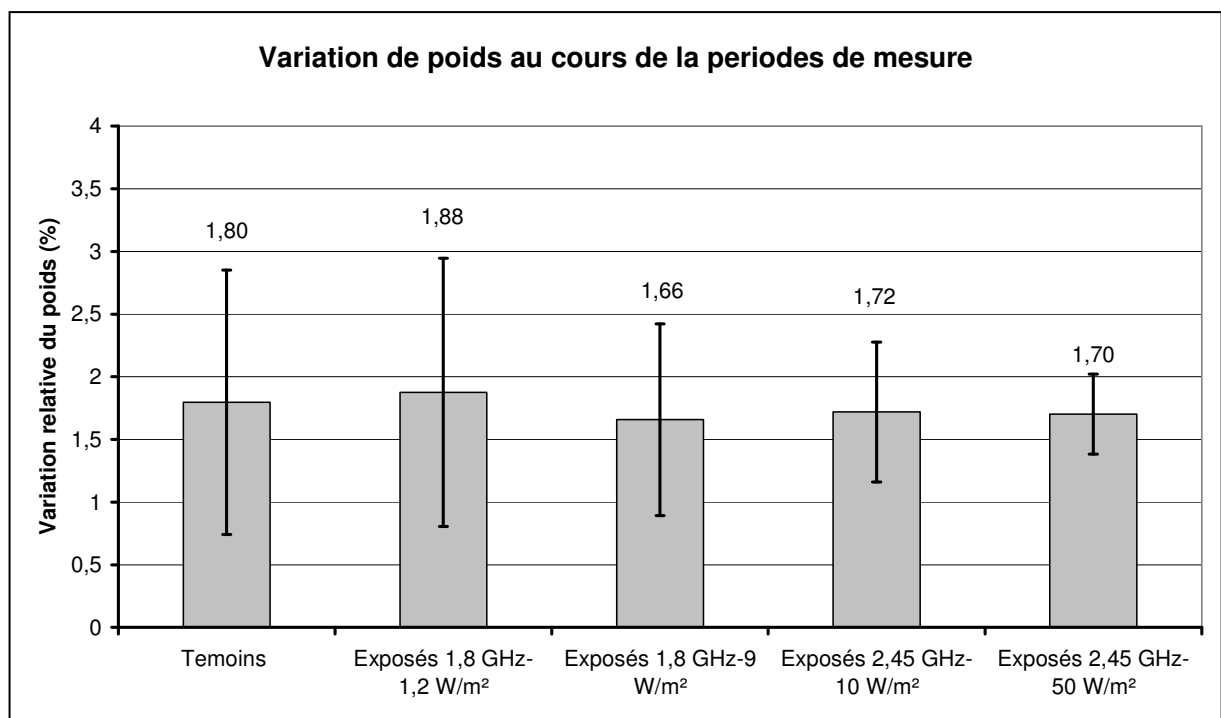


Figure 1: Variation relative du poids des animaux pour la période de mesure. Les valeurs correspondent à la moyenne de la variation relative pour chaque animal dans chaque groupe (n=20 pour le groupe témoins, n=10 pour chaque groupe exposé) \pm SEM.

2.3.3. TEMPERATURE

Finalement le suivi de l'état général des animaux a été complété par le contrôle de la température corporelle durant les trois jours d'expérimentation.

Dans un premier temps nous avons contrôlé l'évolution de la température de chaque animal de manière à vérifier l'absence d'état fébrile secondaire à une infection lié à l'implant ou à l'introduction de la sonde le jour de la manipulation. Un tel état pourrait interférer avec les effets liés aux ondes électromagnétiques. Ce contrôle n'a pas mis en évidence d'animaux avec une température anormalement élevée ou au contraire anormalement basse. Tous les animaux ont donc été pris en compte pour l'étude.

Dans un second temps nous avons étudié l'évolution de la température durant expérimentation en fonction du type d'exposition.

Les figures 2a et 2b représentent l'évolution de la température durant la période de mesure pour les trois groupes. La figure 2a est la température journalière moyenne, la figure 2b et la représentation par période de 6 heures permettant ainsi l'apparition de fluctuation circadienne.

L'histogramme 2a montre pour l'ensemble des groupes et pour les trois jours de mesure une température corporelle moyenne chez les animaux comprise entre 36,5 et 37°C. Ces valeurs plus faibles que les données de la littérature (comprise entre 37,5 et 38°C) peuvent s'expliquer par les différences dans le type de mesure. Ici la température est prise en sous cutanés alors que dans la littérature les mesures sont réalisées en intra péritonéale.

Sur ce graphique aucune différence significative de température n'est mise en évidence entre les groupes, mais également au sein d'un même groupe pour les trois jours d'enregistrement.

L'exposition aux ondes électromagnétiques le deuxième jour n'a aucune influence sur ce paramètre. Il n'y a ni hyperthermie, ni hypothermie durant les 24 heures d'exposition.

La courbe 2b nous permet de noter l'absence de modification des rythmes circadiens de la température. Pour les animaux exposés, quelque soit la fréquence ou la puissance, les cycles de température sont toujours présents avec une température plus élevée durant la nuit. Les cycles des différents groupes sont en

phase sans décalage. Les ondes électromagnétiques ne semblent donc pas induire d'effet sur les cycles de température.

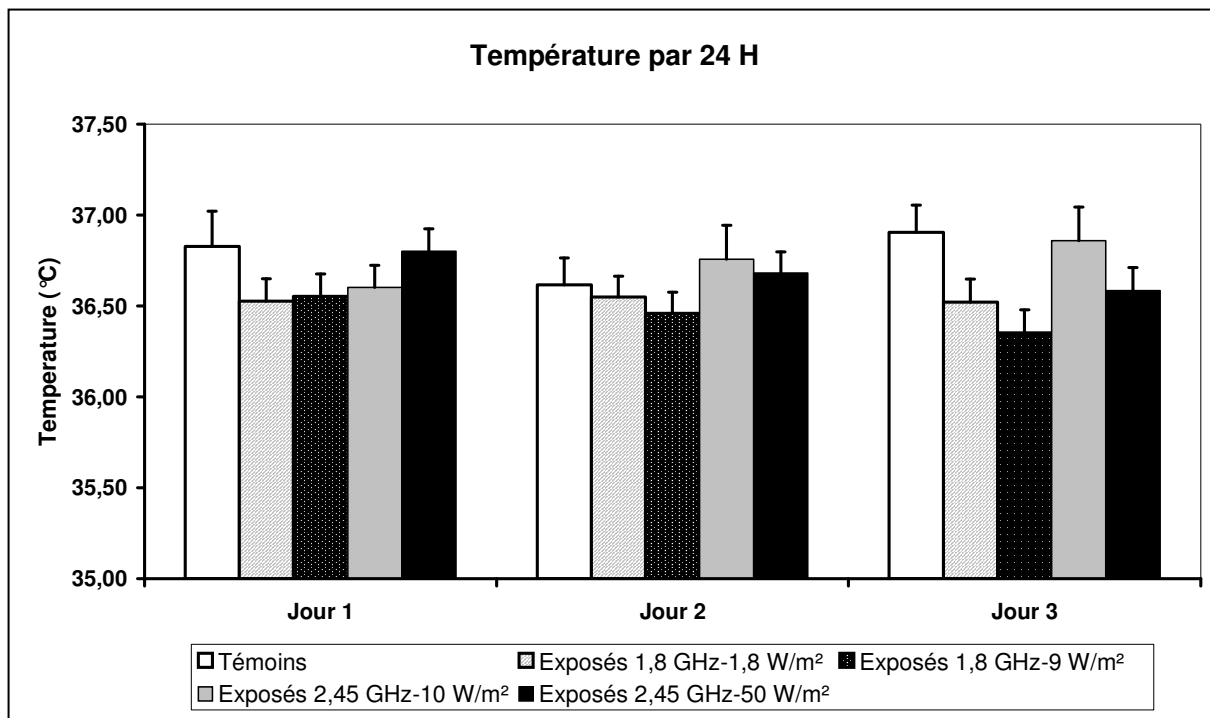


Figure 2a : Température moyenne \pm SD, enregistrées par 24 heures et par groupe. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$.

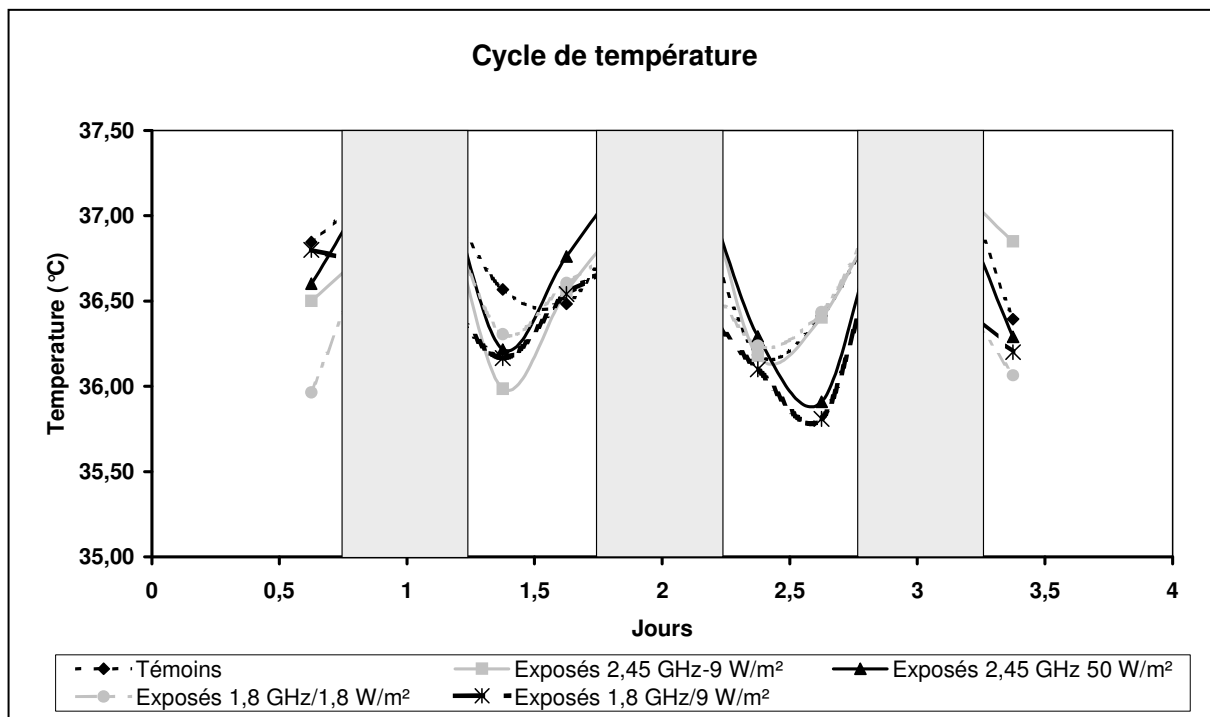


Figure 2b : température moyenne par groupe, calculée sur une période de 6 heures. Les rectangles grisés représentent les périodes nocturnes. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$.

2.4. PARAMETRES NEUROPHYSIOLOGIQUES

2.4.1. ANALYSE SPECTRALE DES EEG

2.4.1.1. Energie relative dans la bande delta

L'énergie relative présente dans la bande de fréquences delta est représentée sur les figures 3a et 3b. Cette bande représentative du sommeil lent mais également des états de souffrance neurologiques apparaît stable durant l'expérimentation.

L'histogramme 3a ne montre pas de différence significative entre les groupes et au sein d'un même groupe durant les 3 jours d'enregistrement. Les valeurs journalières sont toutes comprises entre 23,19 % (groupe 2,45 GHz-50 W/m², le troisième jour) et 30,19 % (groupe 2,45 GHz-10 W/m², le premier jour). Il est cependant possible d'observer pour l'ensemble des animaux, et comme décrit dans la première partie du travail expérimental, une tendance à une diminution d'énergie dans cette bande non significative entre le premier et le troisième jour (-1,97 % Témoins, -1,50 % exposés 1,8 GHz-1,8 W/m², -1,55 % exposés 1,8 GHz-9 W/m², -5,63 % 2,45 GHz-10 W/m² et -6,43 % 2,45 GHz-50 W/m²).

La figure 3b montre l'existence de cycles circadiens peu marqués. Cette courbe met en évidence pour chaque groupe une première valeur élevée de l'énergie dans la bande delta dans les premières heures d'enregistrement. Cette valeur correspond vraisemblablement à la répercussion des dégâts réalisés par la sonde à son introduction. Aucune différence significative n'apparaît entre les cycles. L'exposition aux ondes électromagnétiques n'induit ni une augmentation de l'énergie dans cette bande au cours de l'exposition (signe de dommages neurologiques) ni de modification dans les cycles, caractérisés par une chute de l'énergie relative durant la phase lumineuse et des minima présents dans la période 15-21h.

Les ondes électromagnétiques n'ont pas d'influence sur les ondes lentes. Les variations observables sur les trois jours d'enregistrement sont dues au système de mesures et principalement de la sonde de dialyse qui induit des lésions cérébrales. Ces lésions sont cependant transitoires avec un retour à la normale en quelques heures. Les ondes électromagnétiques ne potentialisent pas l'effet de la sonde ni ne ralentissent le retour à la normale.

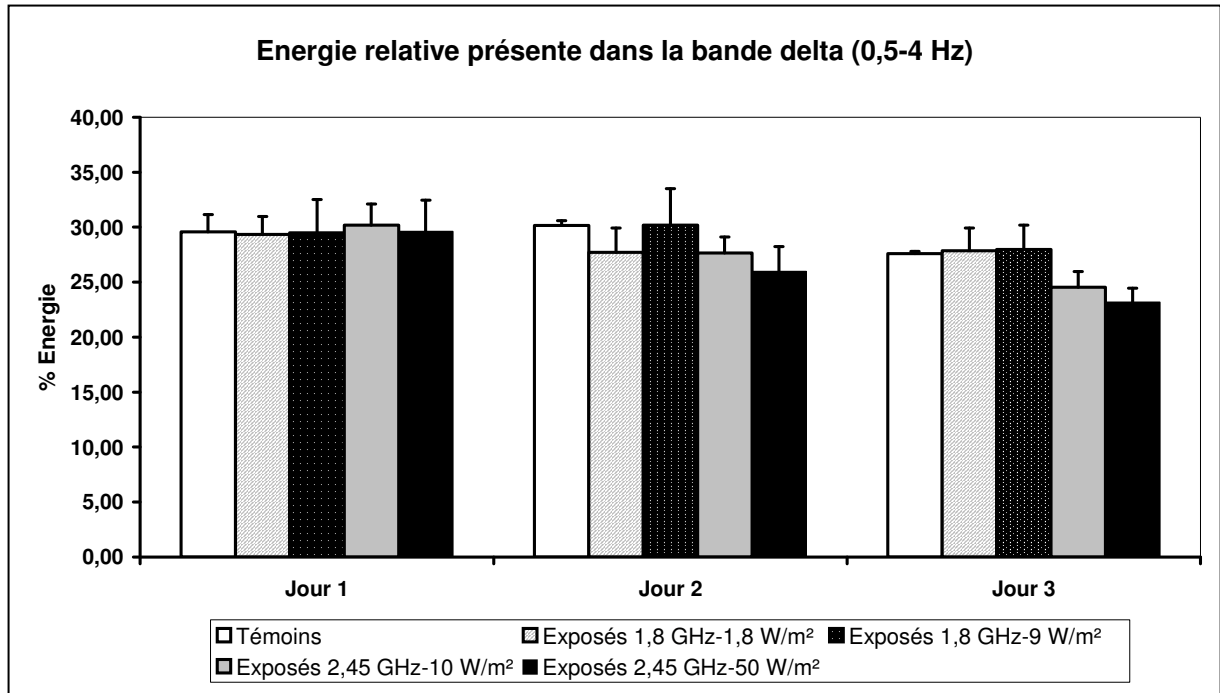


Figure 3a : Energie relative dans la bande delta. Les valeurs sont représentées comme la moyenne pour une période de 24 heures \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$.

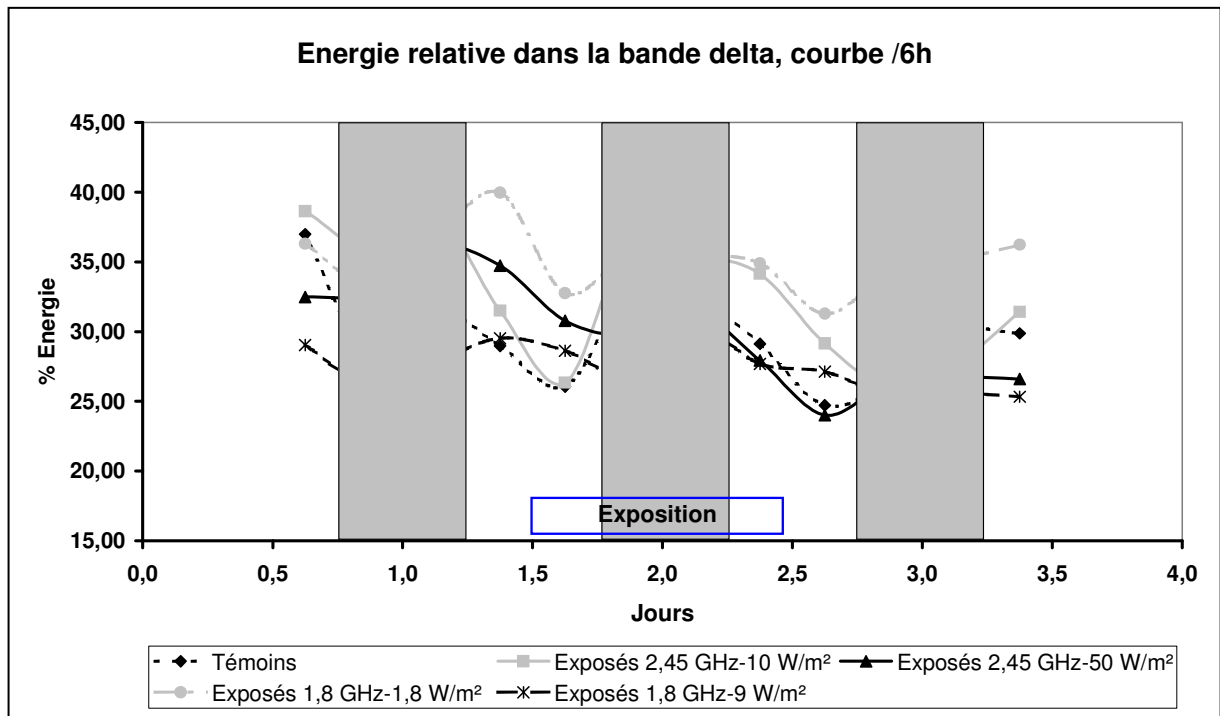


Figure 3b : Energie relative dans la bande delta . Chaque point correspond à l'énergie moyenne dans la bande delta pour une période de 6h. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$. Les rectangles grisés représentent les périodes nocturnes.

2.4.1.2. Energie relative dans la bande thêta

La valeur de l'énergie journalière moyenne présente dans la bande thêta est stable durant les trois jours de mesure et ceci pour l'ensemble des 5 groupes (figure 4a). Aucune différence significative n'est observable. L'exposition aux ondes électromagnétiques n'induit pas de modification de l'énergie dans cette bande (Témoins : $20,87 \pm 0,24\%$, exposés 1,8 GHz-1,8 W/m² : $20,37 \pm 0,48\%$, exposés 1,8 GHz-9 W/m² : $21,09 \pm 0,79\%$, exposés 2,45 GHz-10W/m² : $20,89 \pm 0,25\%$, exposés 2,45 GHz-50 W/m² $23,55 \pm 0,31\%$ le jour de l'exposition).

Une légère augmentation non significative de l'énergie est observable entre le premier jour et le troisième jour pour les groupes exposés à la fréquence 2,45 GHz (+2,03 % pour le groupe 10 W/m² et 2,62 % pour le groupe 50 W/m²). Pour les autres groupes l'énergie est particulièrement stable (+0,34% groupe témoins, +0,66 1,8 GHz-1,8 W/m² et -0,37% exposés 1,8 GHz-9 W/m²).

L'absence de variation entre les groupes se retrouve au niveau des cycles circadiens (figure 4b). Le rythme thêta est soumis à une fluctuation circadienne, cependant l'exposition aux ondes électromagnétiques ne perturbe pas ces cycles que se soit dans les valeurs des maxima et minima, mais également dans la valeur des acrophases.

Ces résultats ne montrent pas d'effet des ondes électromagnétiques sur l'électrophysiologie et entre autre sur le rythme thêta.

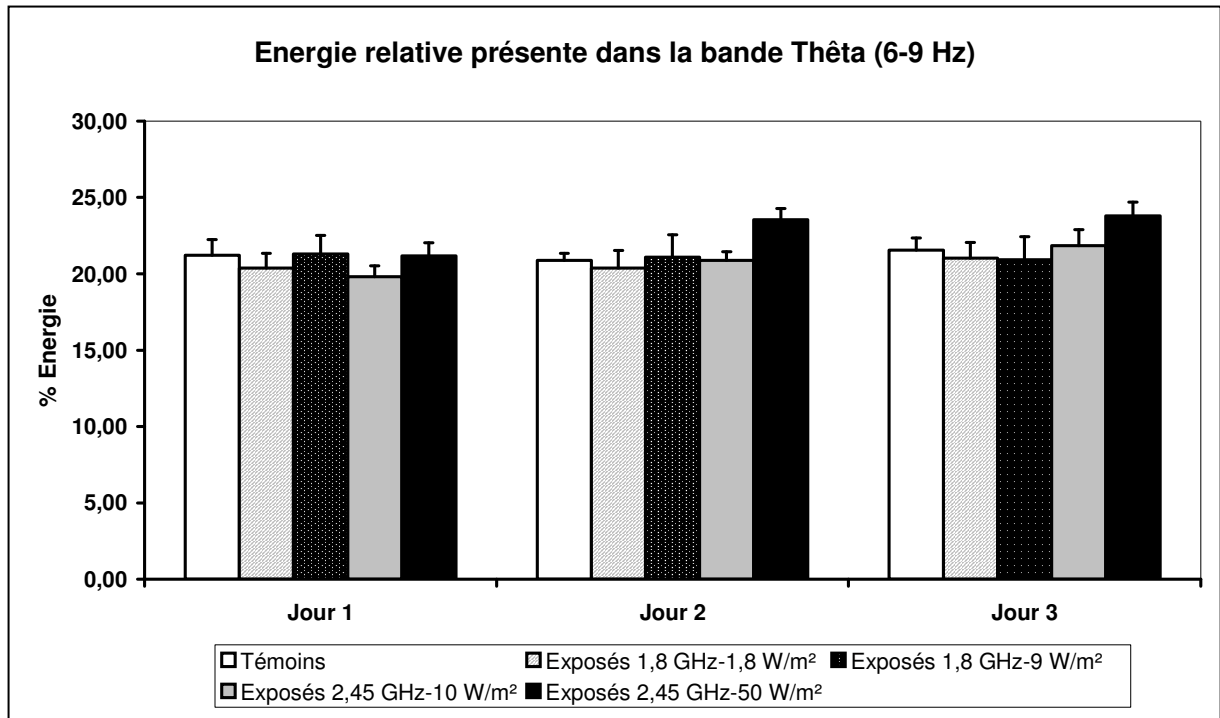


Figure 4a : Energie relative présente dans la bande Thêta. Les valeurs sont représentées comme la moyenne journalière \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$.

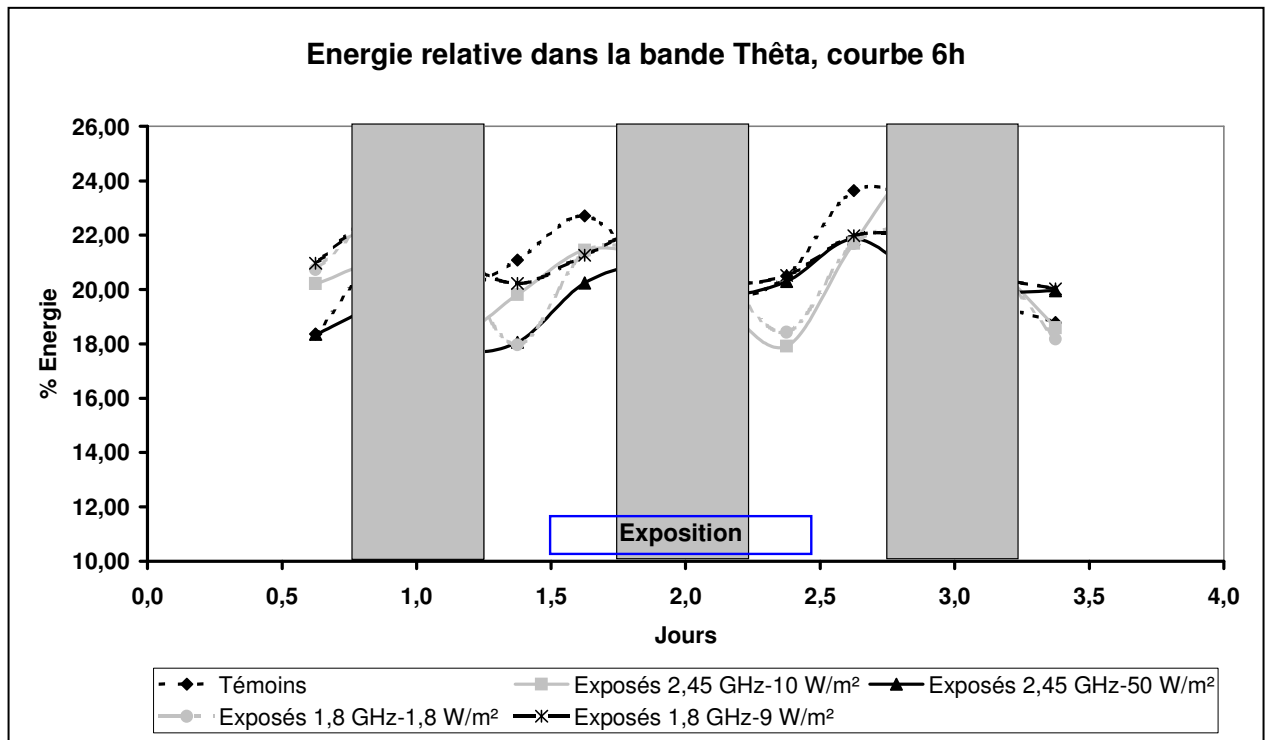


Figure 4b : Energie relative dans la bande thêta. Chaque point correspond à l'énergie moyenne dans la bande thêta pour une période de 6h. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$. Les rectangles grisés représentent les périodes nocturnes.

2.4.2. ANALYSE DE LA VIGILANCE

2.4.2.1. *Eveil*

Durant les trois jours de manipulation, le temps relatif moyen passé en éveil est respectivement de $61,45 \pm 4,11\%$, $63,3 \pm 4,78 \%$, $57,16 \pm 3,13 \%$, $57,36 \pm 3,47 \%$ et $53,35 \pm 5,8 \%$ pour les groupes témoins, exposés 1,8 GHz-1,8 W/m², exposés 1,8 GHz-9 W/m², exposés 2,45 GHz-10 W/m² et exposés 2,45 GHz-50 W/m².

La moyenne journalière est représentée sur la figure 5a. Cette figure ne montre aucune différence significative que se soit entre les groupes, ou entre les différents jours de l'expérimentation. L'exposition n'a pas d'influence sur le temps passé en éveil.

Sur ce graphique, il est possible d'observer pour chaque groupe une diminution non significative du temps passé en éveil entre le premier et le troisième jour. Cette baisse peut résulter de l'adaptation des animaux à leur environnement et d'une baisse de stress. Il est à noter que pour les groupes témoins et exposés 1,8 GHz-1,8 W/m² la baisse est répartie sur les trois jours de l'expérimentation. Pour les autres groupes, exposés à des puissances plus importantes, la baisse se trouve uniquement le jour de l'exposition et est suivie d'une ré augmentation dans les 24 heures suivantes.

La courbe par 6 heures (figure 3b) ne montre aucune modification observable au niveau des cycles circadien. Les animaux présentent des cycles en phases, l'exposition ne modifie pas les rythmes (maximum durant la phase nocturne), ni les amplitudes des cycles avec une différence moyenne entre la phase nocturne et la phase éclairée de temps passé en éveil de $20,26 \% \pm 3,28\%$ pour le groupe témoin, $15,48 \pm 3,14\%$ pour le groupe 1,8 GHz-1,8 W/m², $18,65 \pm 4,02 \%$ pour le groupe 1,8 GHz-9 W/m², $17,78 \pm 2,14\%$ pour le groupe 2,45 GHz-10 W/m², et $21,14 \pm 3,8\%$ pour le groupe 2,45 GHz-50 W/m².

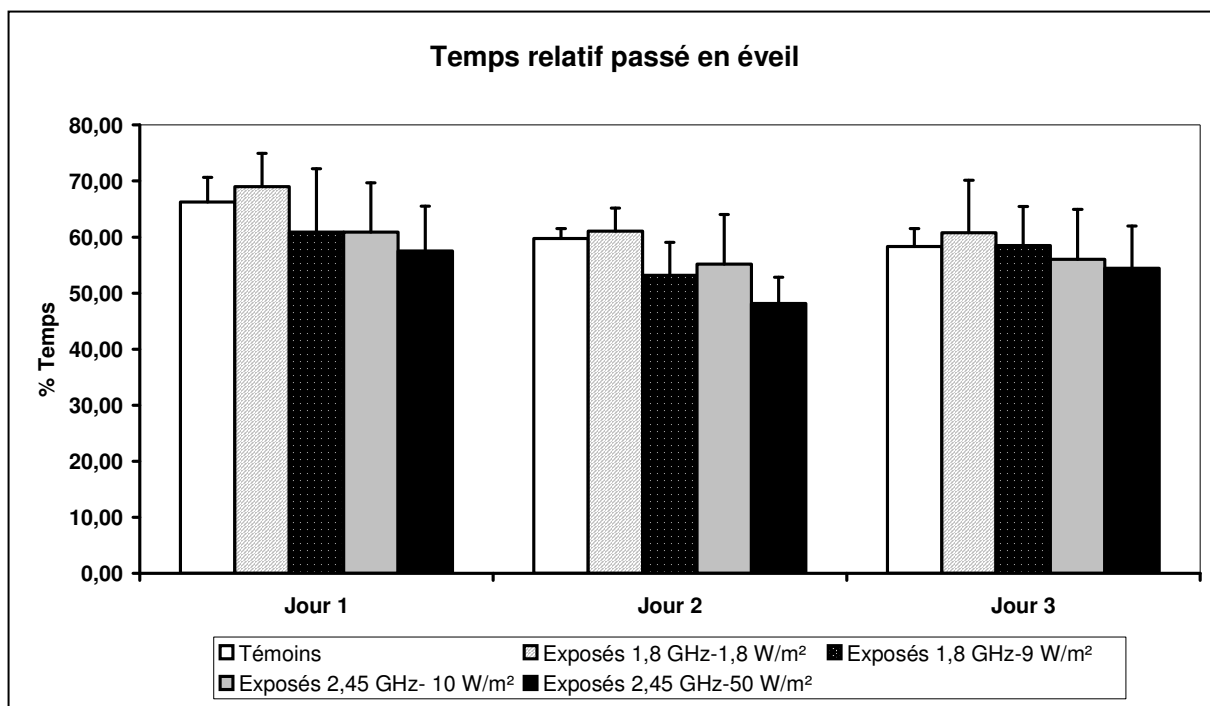


Figure 5a : Temps relatif passé en éveil. Les valeurs sont représentées comme la moyenne journalière \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$.

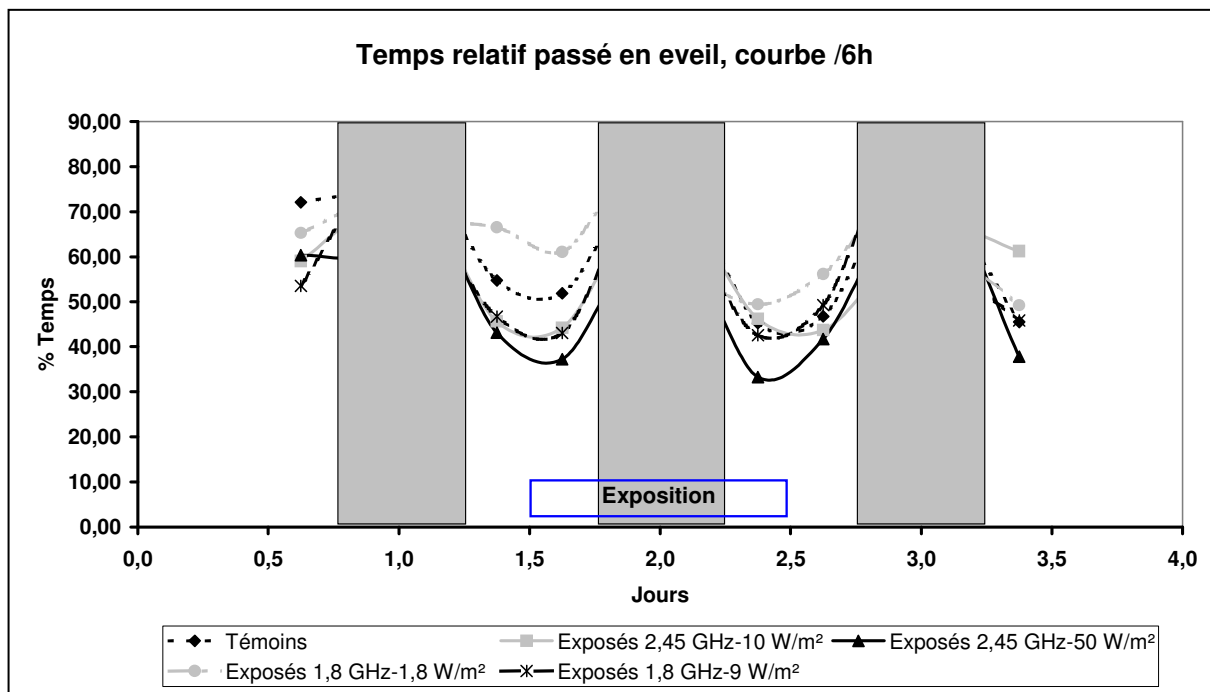


Figure 5b : Temps relatif passé en éveil. Chaque point correspond au temps moyen passé en éveil pour une période de 6 heures \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$. Les rectangles grisés représentent les périodes nocturnes.

2.4.2.2. Sommeil paradoxal

Le temps relatif passé en sommeil paradoxal est représenté sur la figure 6a (représentation par 24h) et figure 6b (représentation par 6h).

Le sommeil paradoxal est soumis à d'importantes fluctuations en comparaison de l'éveil. Le premier jour l'ensemble des animaux présente un niveau bas de sommeil paradoxal ($2,42 \pm 0,13\%$ témoins, $2,98 \pm 0,54$ exposés 1,8 GHz-1,8 W/m², $3,19 \pm 0,42$ exposés 1,8 GHz-9 W/m², $3,09 \pm 0,72$ exposés 2,45 GHz-10 W/m² et $3,06 \pm 0,71$ exposés 2,45 GHz-50 W/m².)

Le deuxième jour, les valeurs sont plus disparates ($4,68 \pm 0,63 \%$ témoins, $3,23 \pm 0,31\%$ exposés 1,8 GHz-1,8 W/m², $5,39 \pm 0,75\%$ 1,8 GHz-9 W/m², $3,47 \pm 0,80\%$ 2,45 GHz-10 W/m² et $6,99 \pm 0,74\%$ 2,45 GHz-50 W/m²), aucune différence significative n'est cependant enregistrée. L'ensemble des groupes voit le temps relatif de sommeil paradoxal augmenté, cette augmentation est la plus marquée pour le groupe 2,45 GHz-50 W/m² (+3,93 %).

Au troisième jour, l'ensemble des animaux présente des valeurs proches de temps passé en sommeil paradoxal. Les animaux exposés à 2,45 GHz-50 W/m² voient diminuer leur temps passé en sommeil paradoxal (-1,46 %) alors que pour les autres groupes l'augmentation continue (+0,47 % témoins, +0,32 % exposés 1,8 GHz-1,8 W/m², +0,82% 1,8 GHz-9 W/m² et +0,92% 2,45 GHz-10 W/m²).

Les cycles de sommeil paradoxal semblent moins organisés que ceux de l'éveil. Il est cependant possible d'observer pour chaque groupe une acrophase en fin d'après midi. Le groupe 1,8 GHz-1,8 W/m² possède les cycles de sommeil paradoxal les moins marqués.

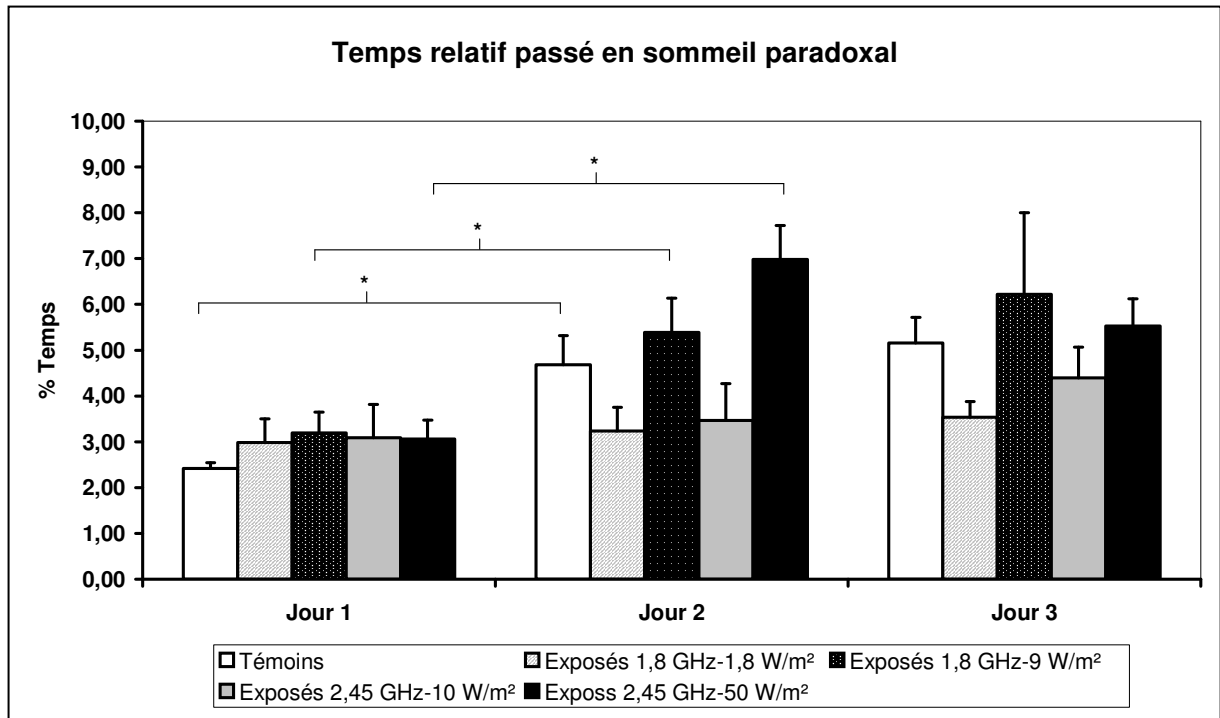


Figure 6a : Temps relatif passé Sommeil paradoxal. Les valeurs sont représentées comme la moyenne journalière \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$.

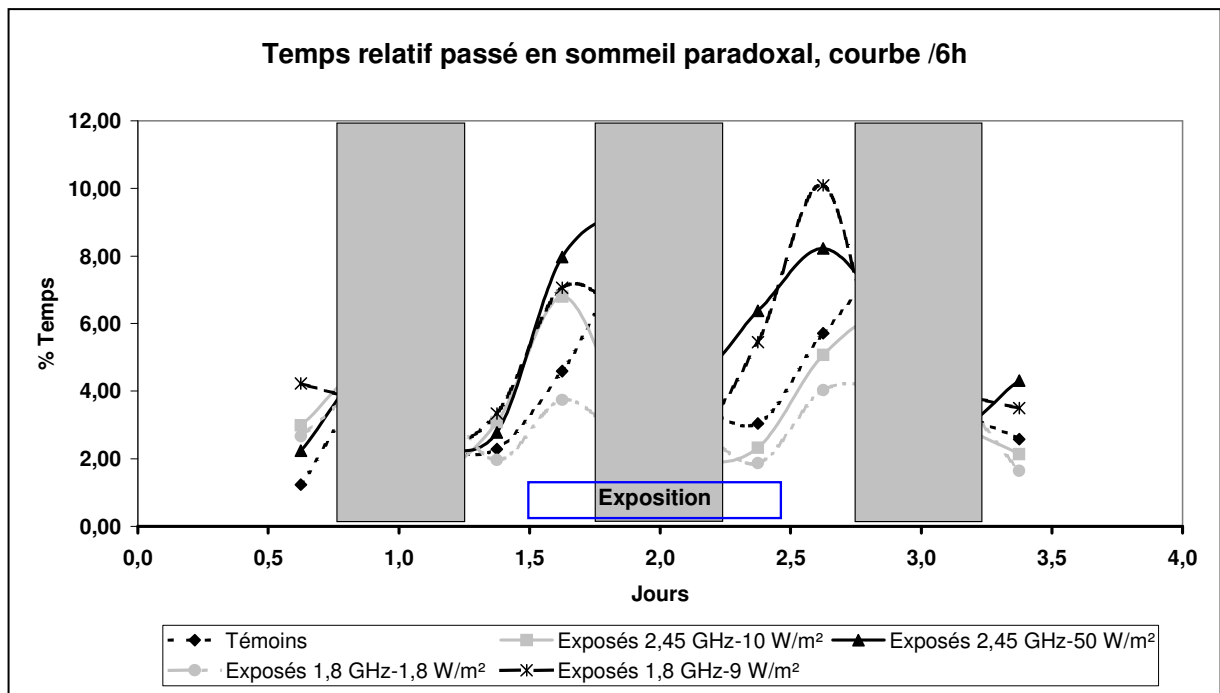


Figure 6b : Temps relatif passé en sommeil paradoxal. Chaque point correspond au temps moyen passé en sommeil paradoxal pour une période de 6 heures \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$. Les rectangles grisés représentent les périodes nocturnes.

2.4.3. SECRETION D'ACETYLCHOLINE

De manière identique aux autres paramètres mesurés, les ondes électromagnétiques n'induisent pas de modifications significatives de la sécrétion d'acétylcholine. La valeur moyenne d'ACh récoltée pour l'ensemble de l'expérimentation est $77,66 \pm 13,34$ nM pour les témoins, $63,38 \pm 18,54$ nM pour les exposés 1,8 GHz-1,8 W/m², $84,20 \pm 19,77$ nM pour les exposés 1,8 GHz-9 W/m², $91,3 \pm 13,84$ nM pour les exposés 2,45 GHz-10 W/m², et $98,67 \pm 20,87$ nM pour les exposés 2,45 GHz-50 W/m².

Comme exposé dans la première partie du travail expérimental il est possible d'observer pour chaque groupe une augmentation significative de la sécrétion d'acétylcholine au cours des 3 jours de manipulation (figure 7a) due à l'utilisation de neostigmine dans la technique de microdialyse.

Aucune différence n'est cependant observable entre les groupes si l'on considère le même jour, et ceci même le jour de l'exposition ($67,30 \pm 9,64$ nM pour les témoins, $62,00 \pm 7,34$ nM pour les exposés 1,8 GHz-1,8 W/m², $67,14 \pm 10,77$ nM pour les exposés 1,8 GHz-9 W/m², $85,96 \pm 11,84$ pour les exposés 2,45 GHz-10 W/m², et $89,95 \pm 11,87$ nM pour les exposés 2,45 GHz-50 W/m²).

La courbe 7b permet en outre de confirmer l'existence des cycles de sécrétions de l'ACh chez les animaux irradiés. Les courbes des groupes exposés sont parfaitement superposées au groupe témoins.

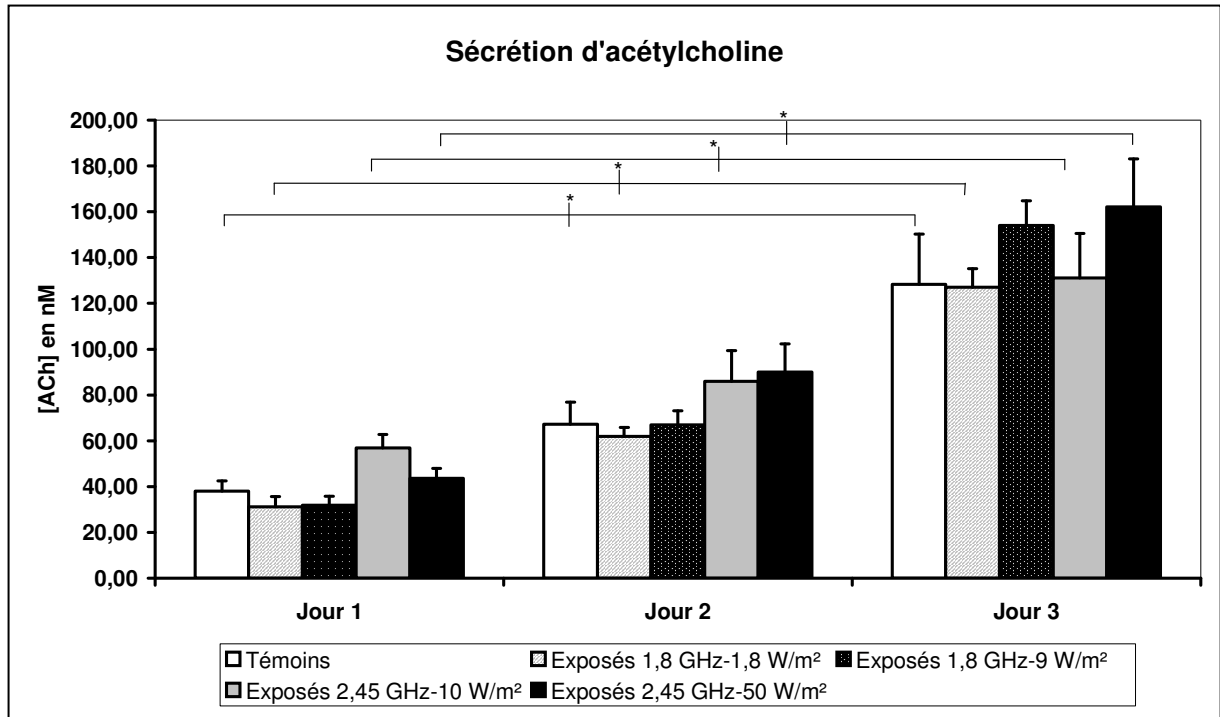


Figure 7a : Sécrétion d'acétylcholine au niveau de l'hippocampe. Les valeurs sont représentées comme la moyenne journalière \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$. * indique $p < 0,005$

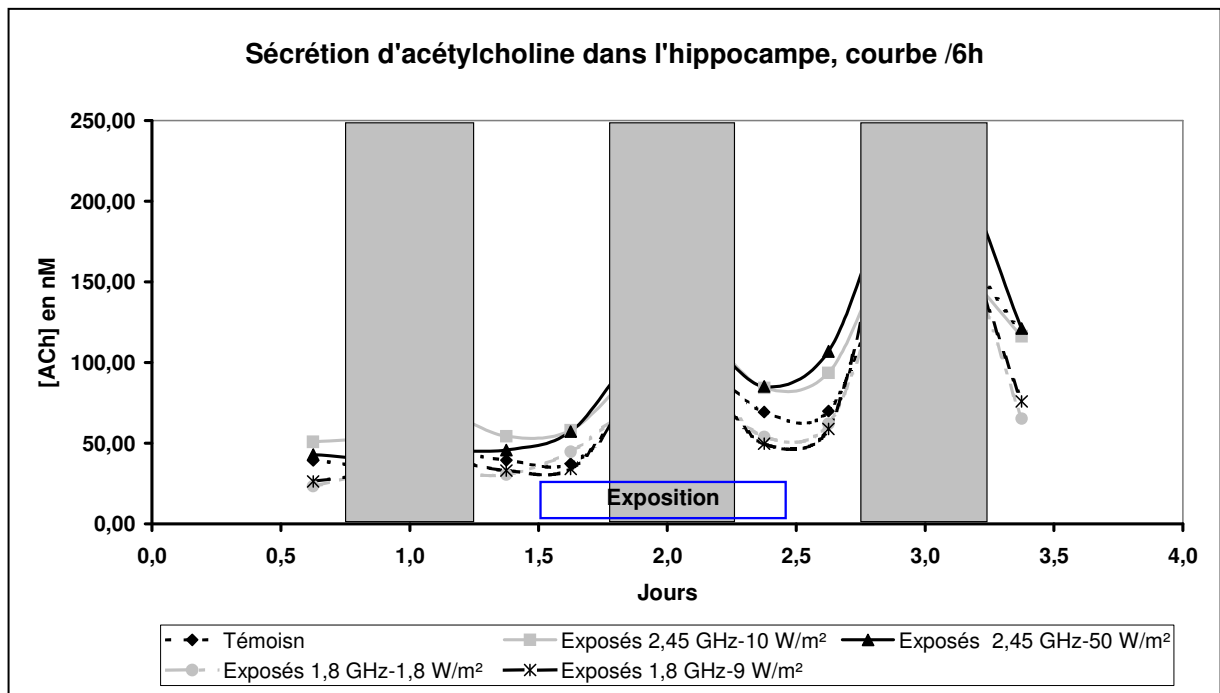


Figure 7b : Cycle de sécrétions de l'acétylcholine. Chaque point correspond à la sécrétion moyenne pour une période de 6 heures \pm SEM. Témoins $n=20$, groupes exposés $n=10$. Les rectangles grisés représentent les périodes nocturnes.

2.4.4. DISCUSSION

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence une sensibilité spécifique du système nerveux, et plus particulièrement du système cholinergique, lors de l'exposition à un champ de radiofréquences.

Alors que de précédents travaux ont pu mettre en évidence des effets sur la l'électroencéphalographie (Bawin *et al.*, 1973; Chizhenkova, 1988), la neurochimie (Mausset *et al.*, 2001; Testylier *et al.*, 2002), mais également sur la vigilance (Mann et Roschke, 1996; Borbely *et al.*, 1999), l'ensemble de nos résultats n'a montré aucun effet des ondes électromagnétiques sur la neurophysiologie.

Lai avait exprimé l'hypothèse d'une diminution de la recapture de la choline par son transporteur spécifique au niveau des synapses lors d'une exposition de faible intensité (Lai *et al.*, 1987). Cet effet induirait une diminution de la synthèse d'ACh et une baisse de sa sécrétion basale. Par la suite d'autres études ont suggéré une augmentation de l'activité des cholinestérases (Barteri *et al.*, 2005) ainsi que la diminution de la concentration des récepteurs ACh de type muscarinique. Testylier et al (Testylier *et al.*, 2002) montrent une abolition des cycles de la sécrétions d'acétylcholine, le taux d'ACh n'augmentant plus lors de la période d'activité du rat, et induisant ainsi une diminution globale de la sécrétions moyenne d'ACh

L'ensemble de ces résultats suggère un effet global visant une diminution de la stimulation cholinergique lors d'une exposition à des champs hyperfréquences.

D'un point de vue électroencéphalographie, certaines études ont montré une augmentation de l'énergie dans les bandes de basse fréquence, signant ainsi la possibilité d'atteintes neurologiques (Chizhenkova, 1988).

Ces études sont cependant critiquées aujourd'hui par l'absence ou la faible fiabilité des données dosimétriques. D'Andrea (D'Andrea *et al.*, 2003a; D'Andrea *et al.*, 2003b) suggère ainsi dans ses revues que les effets observés sur les systèmes cholinergiques, et plus généralement sur le système nerveux ne sont pas lié à un effet spécifique des ondes électromagnétique, mais à une élévation de température générale ou localisée. Cette hypothèse semble se confirmer par l'absence de la réplication de ces résultats dans les études faisant état d'une dosimétrie rigoureuse (Cassel *et al.*, 2004; Cobb *et al.*, 2004).

2.4.4.1. Considération dosimétrique

La vérification de l'absence d'effet thermique dans notre étude apparaît comme un point essentiel à discuter. Les effets des ondes électromagnétiques sont considérés comme thermiques dès lors que des effets observés apparaissent de manière concomitante à une augmentation de température ou lors de la mise en place de phénomène de thermorégulation. De tels effets sont globalement admis pour intervenir à des valeurs de DAS supérieures à 4 W/kg.

Dans un premier temps les valeurs de DAS corps entier et de DAS au niveau de la tête estimées par simulation numérique nous permettent d'affirmer que les expositions choisies n'entraînent pas d'augmentation de la température que se soit générale ou localisée par l'existence de points chauds (Respectivement le DAS moyen corps entier et le DAS tête sont pour les puissance maximales d'exposition 0,36 W/kg et 0,53 W/kg à 1,8 GHz et 1,8 W/kg et 2,5 W/kg à 2,45 GHz). Il est cependant communément admis que ces valeurs doivent être complétées par des mesures de variation thermique sur fantôme pour obtenir un dosimétrie parfaitement fiable. Face à la complexité de notre modèle, due entre autre à l'existence de l'implant, mais également par l'hétérogénéité de champs, une telle mesure nous est apparue peu représentative de la réalité et très délicate à mettre en œuvre.

Certaines données physiologiques mesurées sur l'animal nous permettent cependant de confirmer l'absence de tels effets. Ainsi lors de l'exposition nous n'enregistrons aucune différence significative de température entre les groupes, ni augmentation, ni diminution. Adair et al (Adair et Black, 2003) ont constaté qu'une exposition au RF à des puissances thermiques pouvait induire une baisse globale de la température corporelle par la mise en place des phénomènes de thermorégulation avant qu'il y ait un échauffement. Nous n'observons ni échauffement ni baisse de la température corporelle des animaux, nos résultats sont en faveur de l'absence d'effet thermique général sur l'animal.

D'autre part, l'emploi d'électrodes métalliques a été évoqué comme source de biais dans les effets observés sur l'EEG lors des expositions (Johnson et Guy, 1972). De telles électrodes sont susceptibles de focaliser les champs et d'induire l'apparition de points chauds sans modifier le DAS moyen. L'emploi d'électrodes en téflon recouvertes de carbone (Tyazhelov *et al.*, 1977; Chou et Guy, 1979) ou d'électrode en verre remplies d'électrolytes (Johnson et Guy, 1972) comme il est préconisé

apparaissaient techniquement difficilement utilisable sur notre modèle. Nous avons donc choisi d'utiliser des électrodes métalliques. Comme le montre la simulation FDTD ces électrodes métalliques ne semblent pas induire l'apparition de points chauds. Leur très faible diamètre (50 μm) associé à leur orientation (perpendiculaire à la progression du champ) limite leur capacité à faire antenne.

Ces résultats sont confirmés par les données EEG. La bande Delta voit son énergie augmenter lors de lésion cérébrale, tel que lors d'intoxication au soman (Carpentier *et al.*, 2001), tumeurs (Gastaut *et al.*, 1979), augmentation de la température. Un tel effet a pu être identifié dans la première partie expérimentale (Crouzier *et al.*, 2005) où l'introduction de la sonde, bien que de petite taille et très localisé, provoque une augmentation de l'énergie dans cette bande au cours des premières heures.

Il est donc envisageable que l'existence de points chauds, provoque l'apparition de dommages cérébraux et donc une augmentation de l'énergie dans la bande delta. Nos résultats ne présentent aucune différence entre les groupes exposés et le groupe témoins le jour de l'exposition. Ces résultats ne caractérisent donc pas l'existence de points chauds ou de zones de lésions cérébrales induites par les RF.

Il est possible en outre de penser que les travaux réalisés, montrant des augmentations d'énergie, dans la bande delta ont été réalisés avec de trop fortes puissances. Thuroczy et al (Thuroczy *et al.*, 1994) observent des effets pour des valeurs DAS de plus de 42 mW/kg, Takashima et al (Takashima *et al.*, 1979) pour de champs de 500 V/m soit une densité de puissance de 663 W/m², ce qui implique des effets thermiques et non des effets spécifiques.

2.4.4.2. Effets sur le système cholinergique

Notre étude n'a mis en évidence aucun effets sur le système cholinergique, que se soit à travers les données électrophysiologiques, neurochimiques ou de la vigilance.

Selon l'étude de Lai portant sur les performances mnésiques du rat au cours d'expositions RF (Lai *et al.*, 1994), il était légitime de s'attendre à une diminution de l'énergie dans la bande thêta. Dans cette étude, en complément des éléments directs (activation de récepteurs opioïdes (Lai *et al.*, 1992), baisse du transport de la

choline (Lai *et al.*, 1987)) signant une perturbation du système cholinergique, Lai observe des retentissements sur la mémoire avec des baisses des performances des animaux lors du test du radial Maze. Ce test fait appel à la mémoire spatiale du rat.

Ce type de mémorisation implique directement la voie septo-hippocampique où le rythme thêta hippocampique joue un rôle capital dans le fonctionnement de l'hippocampe (Winson, 1978) et lors de l'apprentissage. Expérimentalement l'abolition du rythme thêta par des antagonistes muscariniques se manifeste par une baisse de ces performances.

Aucune modification d'énergie dans cette bande n'a été enregistrée. Ces résultats vont donc à l'encontre de ceux de Lai. Cependant outre les critiques d'ordre dosimétrique, il est à noter que l'ensemble des travaux (Dubreuil *et al.*, 2002; Cassel *et al.*, 2004; Cobb *et al.*, 2004) tentant de reproduire les résultats de Lai ont échoué ne montrant aucun effet sur les performances mnésiques et donc indirectement sur le rythme EEG thêta. De plus aucun article actuel ne traite d'effet spécifique dans la bande thêta.

Face à ces résultats, il est possible de penser que les perturbations du système cholinergique sont d'intensité trop faible pour se répercuter au niveau du rythme thêta.

Les données neurochimiques corroborent les données électroencéphalographiques et l'absence d'effet au niveau de l'hippocampe. Aucune différence n'est observable le jour de l'exposition, entre les groupes exposés et le groupe témoins. Aucune diminution globale n'a été mise en évidence, ce qui confirme les résultats actuels traitant des performances mnésiques.

Peu d'articles traitent des effets neurochimiques exceptés Maussuet et al (Maussuet *et al.*, 2001) et Testylier et al (Testylier *et al.*, 2002). Maussuet n'observe pas l'acétylcholine, mais le GABA. Pour ce neurotransmetteur une baisse de sécrétions est enregistrée cependant uniquement pour de puissance supérieure à 4 W/kg, donc pour des puissances thermiques.

La disparition des cycles de sécrétions observés par Testylier et al (Testylier *et al.*, 2002) n'ont pas pu être mis en évidence. Dans cet article l'auteur ne laisse cependant que trois jours de récupération aux animaux, ce qui apparaît comme une durée insuffisante ne permettant pas une bonne récupération des animaux. Il est donc possible que l'effet observé soit lié à une hyper sensibilité des animaux

fragilisés par le choc opératoire et qui n'ont pas le temps de rétablir des cycles biologiques normaux. Une autre hypothèse pouvant expliquer cette différence de résultat réside dans la technique de microdialyse utilisée. Dans notre étude la microdialyse a été spécifiquement réalisée au niveau de l'hippocampe avec une sonde aiguille placée dans un guide juste avant l'expérimentation alors que Testylier à procéder à de la microdialyse transcorticale. Dans cette dernière, la fraction d'ACh est donc représentative de plusieurs structures, de plus il est possible que la disparition des cycles de sécrétions proviennent de la réaction gliale autour de la membrane, beaucoup plus importante avec cette technique, ce qui pourrait en partie masquer les variations circadiennes d'ACh.

L'absence d'effet sur les cycles de sécrétions de l'acétylcholine (neurotransmetteur impliqué l'éveil) se retrouvent corroborées par les données de la vigilance.

Aucune étude n'a été précédemment réalisée sur les cycles de vigilance des animaux. Chez l'homme de telles études montrent une augmentation du temps de sommeil lent et une diminution du temps passé en sommeil paradoxal. Notre étude ne montre aucune modification pour l'éveil, ni dans le temps passé dans cet état de vigilance, ni dans la structure circadienne. Ces résultats ne montrent donc pas une disparition de la cyclicité de la sécrétions d'acétylcholine au niveau des centres de l'éveil.

Concernant le sommeil paradoxal, l'autre état de vigilance sous contrôle cholinergique, les résultats montrent pour le jour de l'expérimentation des valeurs plus disparates entre les différents groupes, du temps moyen passé dans cet état. Les différences observées ne sont cependant pas significatives diminuant grandement la portée de ces résultats. De plus Lai indique que l'effet des micro-ondes sur les systèmes cholinergiques serait doses dépendant. Cette hypothèse n'est pas vérifiée au travers des expositions à 1,8 GHz-9 W/m² et 2,45 GH-10 W/m² dont les valeurs de DAS corps entier sont identiques, mais les valeurs de temps relatif passé en sommeil paradoxal présente un rapport 2. Enfin le fait que les animaux exposés aux plus fortes puissances passent plus de temps en sommeil paradoxal va dans le sens d'une stimulation des voies cholinergiques et non à une inhibition.

2.4.4.3. Limites de l'étude

Bien qu'aucun effet n'ait pu être mis en évidence sur la neurophysiologie, il ne faut pas exclure l'hypothèse que de potentiels effets n'aient pu être révélés par notre système :

Il est possible que le protocole lui-même ait masqué les effets des ondes électromagnétiques. La chirurgie est lourde, même si les animaux semblent avoir récupérés, il est envisageable que les perturbations induites par les ondes électromagnétiques soient bien plus faibles en comparaison du stress initialement provoqué.

De plus Lai (Lai *et al.*, 1991) suggère que l'utilisation d'inhibiteurs des acétylcholinestérases puisse masquer les effets des ondes électromagnétiques en produisant une augmentation de la cholinergie supérieure à la diminution induite par les HF. Ainsi lors de l'administration de physostigmine à ces animaux, Lai n'observe plus d'effets des HF sur les performances mnésiques. L'absence d'effets sur la cholinergie dans notre étude pourrait ainsi venir de l'utilisation de la néostigmine pour la microdialyse. Cependant pour ce travail, la concentration locale de neostigmine ainsi que le pourcentage d'AChE inhibée doit être bien inférieur à ceux obtenus par Lai dans son étude. Les résultats de Lai sont d'autant plus discutables que les travaux de réplication ont mis en évidence une importante létalité liée à la dose de physostigmine utilisée (Cobb *et al.*, 2004). Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser la mesure d'ACh sans néostigmine, mais dans de telles conditions, il est vraisemblable que la précision de mesure soit très insuffisante pour mettre en évidence un effet quelconque.

Enfin nous pouvons penser que 10 animaux par groupe est un nombre trop faible pour révéler statistiquement un effet de faible intensité. Afin de se soustraire de cette limite, il serait nécessaire d'augmenter le nombre d'individus à un minimum de 30 individus par groupe et répondre aux exigences formulées par les tests paramétriques beaucoup plus puissants. La réalisation de tels groupes apparaît au demeurant difficilement envisageable face aux conditions expérimentales et aux limites de temps imparties (seul un animal peut être mis en manipulation à la fois, la durée minimale par animal est de 3 jours).

2.5. DONNEES RMN

Afin d'évaluer l'impact de l'implantation sur le métabolisme cérébral et la composition lipidique, un groupe de 10 animaux non implantés, non exposés à été ajouté en plus des groupes exposés dans l'étude neurophysiologique. Ce groupe forme le groupe contrôle.

2.5.1. ANALYSE DE LA CONSTITUTION LIPIDIQUE PAR RMN LIQUIDE HAUTE RESOLUTION

2.5.1.1. RMN du proton 1H

La figure 8 représente l'intensité relative des pics de choline à 3,2 ppm et le pic du cholestérol à 0,6 ppm. L'intensité du pic de choline varie de manière non significative entre les groupes (minimum $0,049 \pm 0,008$ exposés 1,8 GHz-9 W/m², maximum $0,056 \pm 0,009$ exposés 2,45 GHz-50 W/m²). Le pic de cholestérol possède lui une intensité très stable d'un groupe à l'autre (minimum $0,0360 \pm 0,005$ témoins, maximum $0,0385 \pm 0,004$ exposés 1,8 GHz-1,8 W/m²). L'intensité du pic de cholestérol est donc utilisée comme référence pour la réalisation des index de comparaison utilisés en RMN du ^{13}C .

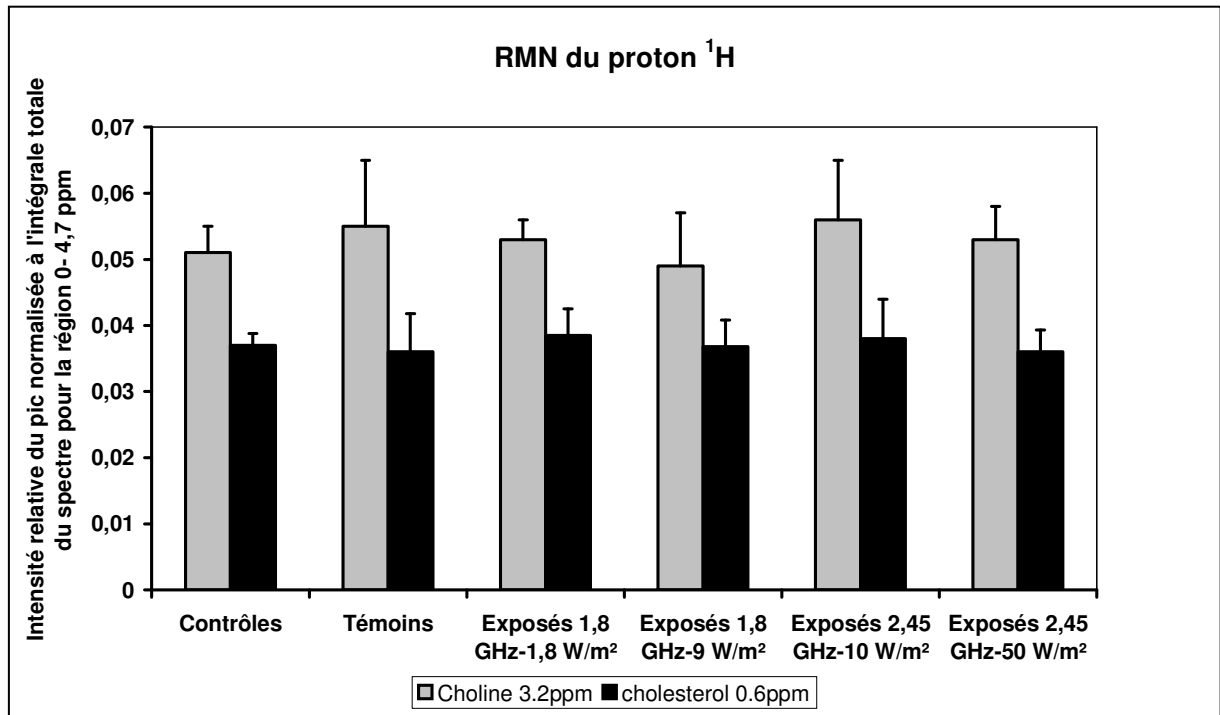


Figure 8 : RMN du proton ¹H (extraits lipidique cerveau sans hippocampes). Intensité relative des pic de choline et de cholestérol normalisé à l'intégrale totale du spectre pour la région 0-4,7ppm. Chaque valeur représente la moyenne pour le groupe \pm SEM. Contrôle n= 10, Témoins n= 12, groupes exposés n=10.

2.5.1.2. RMN du ^{13}C

Les résultats obtenus en RMN du carbone, selon les index décrits dans la partie matériels et méthodes, sont représentés sur la figure 9.

Quelque soit le paramètre analysé, aucune différence significative n'est mise évidence sur ce graphique. L'implantation ne semble pas avoir d'effet sur la composition lipidique, au même titre que l'exposition aux radiofréquences.

Considérant chaque paramètre, les valeurs apparaissent stables entre les groupes, excepté pour le ratio « chaîne/glycérol » qui est soumis à de plus importantes variations. Ces variations ne sont cependant pas significatives.

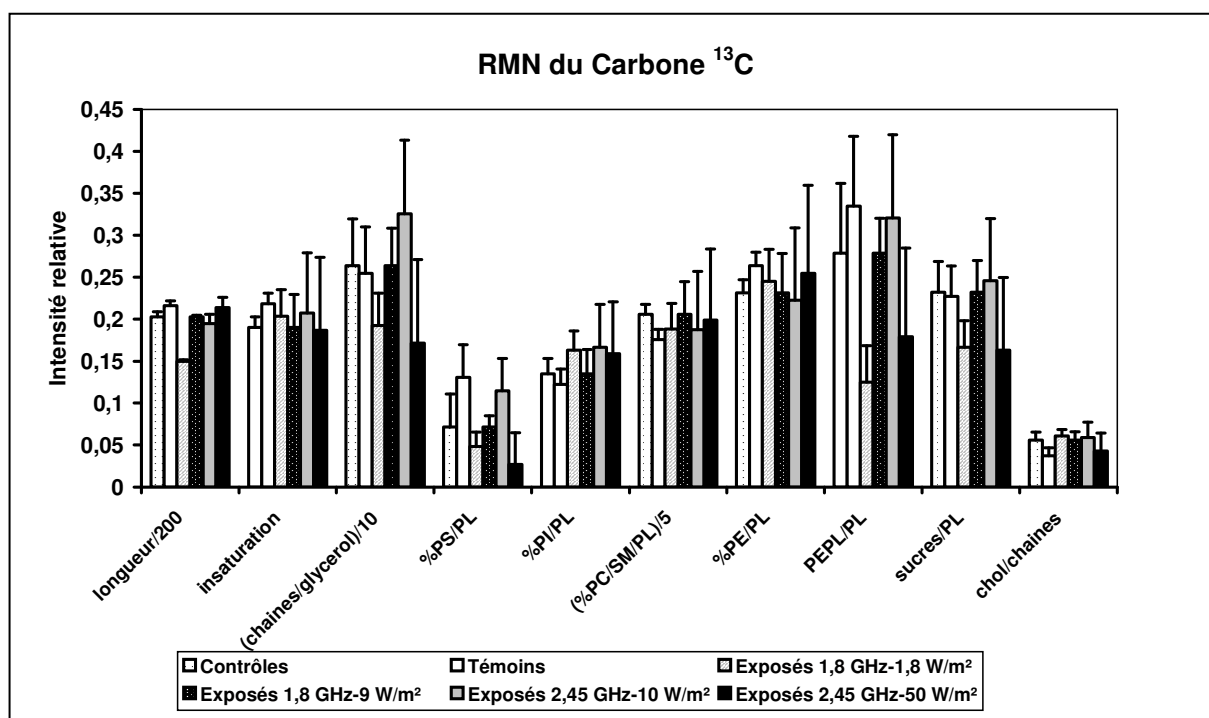


Figure 9 : RMN du carbone ^{13}C (extraits lipidique cerveau sans hippocampes). Intensité relative déterminée à partir du tableau index (cf. partie matériel et méthode, chapitre RMN). Chaque valeur représente la moyenne pour le groupe \pm SEM. Contrôle $n=10$, Témoins $n=12$, groupes exposés $n=10$. (PS : phosphatidyl serine, PL : Phospholipides totaux, PI : phosphatidyl inositol, PC : phosphatidyl choline, PE : phosphatidyl ethanolamine, PEPL phosphatidyl ethanolamine plasmalogène, SM : sphingomyéline, chol : cholinel)

2.5.1.3. RMN du ^{14}N

Les résultats obtenus en RMN ^{14}N sont représentés (figure 10) comme le ratio de l'intensité des pic à 27 ppm et à 52 ppm. Ces pics correspondent à l'ammonium $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ de la choline et de la sphingomyéline (27 ppm) et aux groupements amine des autres phospholipides (52 ppm).

Comme pour le ^{13}C , aucune variation significative n'est observée pour ce paramètre. Aucun effet n'est mesuré qu'il soit lié à l'implantation ou à l'exposition.

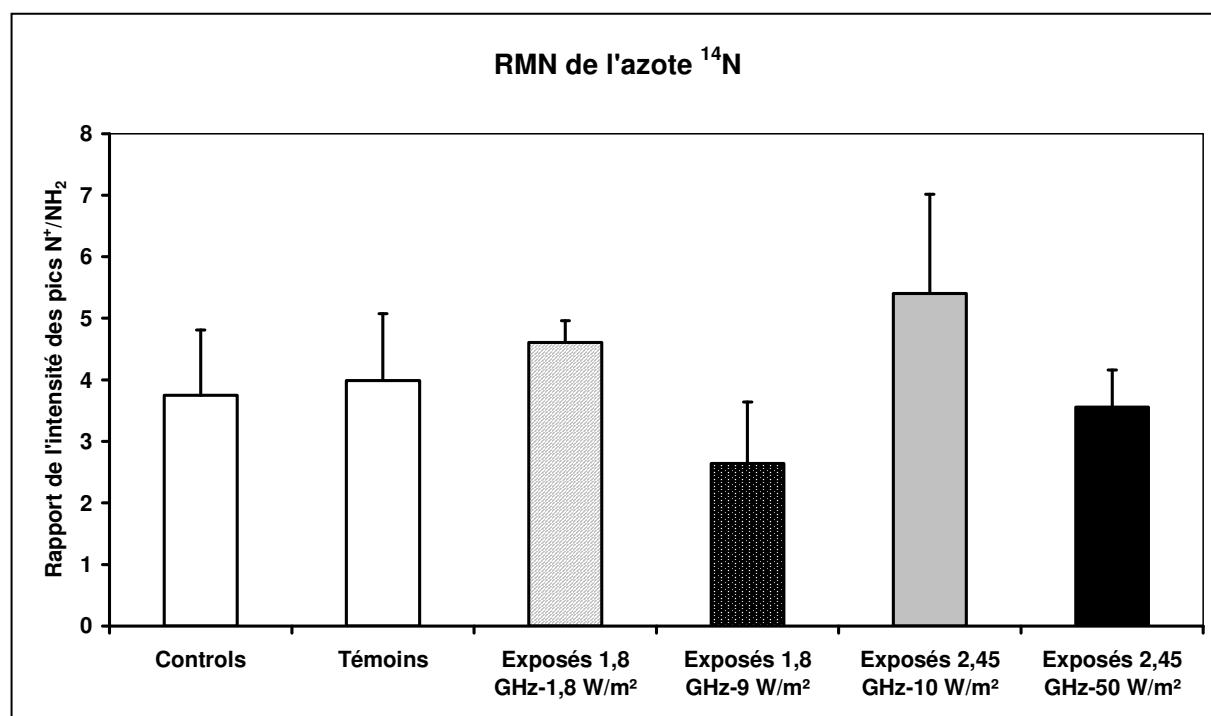


Figure 10 : RMN de l'azote ^{14}N (extraits lipidique cerveau sans hippocampes). Rapport de l'intensité des pic à 27 ppm (ammonium) et à 52 ppm (amine). Chaque valeur représente la moyenne pour le groupe \pm SEM. Contrôle $n=10$, Témoins $n=12$, groupes exposés $n=10$.

2.5.2. RMN HR-MAS (¹H)

Devant les difficultés méthodologiques de mise en place de la technique, les animaux exposés à la fréquence de 1,8 GHz n'ont pu faire l'objet de cette étude.

Les données métaboliques obtenues par RMN HR-MAS sont représentées sur la figure 11.

Grâce à la technique HR-MAS, 10 métabolites ont pu être identifiés. Leur valeur est exprimée en intensité relative ramenée au pic de la créatine, la créatine étant un métabolite ayant une concentration cérébrale très stable.

Parmi ces métabolites il est possible de différencier les différentes contributions de la choline, le lactate indicateur spécifique du métabolisme anaérobie, l'inositol possédant un rôle important de second messenger (Cerdan *et al.*, 1985), certains acides aminés et neurotransmetteurs ainsi que le N acétyl aspartate (NAA), marqueur important de système nerveux central, spécifique des neurones.

Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les groupes pour chaque métabolisme. L'intensité relative du NAA est plus faible, à la limite de la significativité pour le groupe exposé 2,45 GHz-50 W/m², par rapport au groupes contrôle et témoin. La valeur de NAA pour le groupe exposé 2,45 GHz-10 W/m² est également plus faible.

Pour les autres métabolites, les variations enregistrées sont très faibles et non significatives.

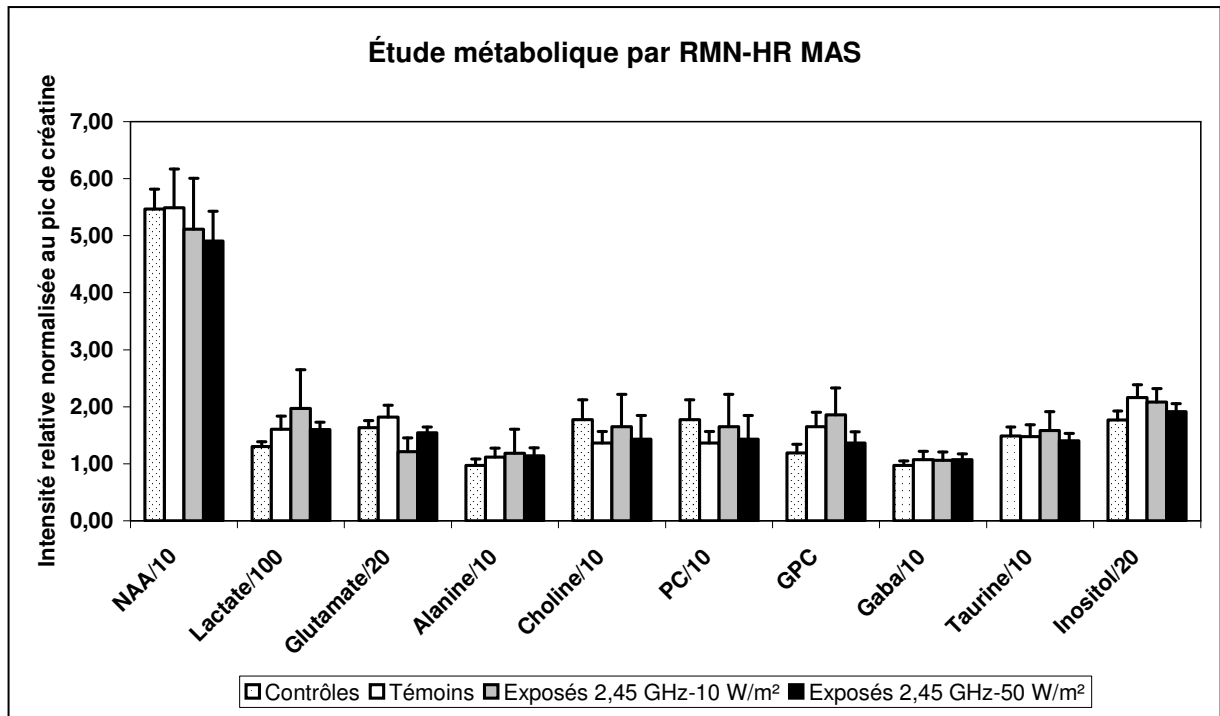


Figure 11 : Analyse métabolique des hippocampes implantés par RMN HR-MAS. Les valeurs correspondent à l'intensité relative normalisée au pic de la créatine. Pour chaque groupe, les résultats sont exprimés tel que moyenne \pm Ecart type. Contrôle $n=8$, témoins $n=6$, exposés 2,45 GHz-10 W/m² $n=6$, exposés 2,45 GHz-50 W/m² $n=6$.

* indique $p < 0,005$.

2.5.3. DISCUSSION

Les résultats de l'approche moléculaire obtenue par RMN sur les extraits lipidiques totaux ne montrent aucune différences significatives tout comme les résultats de neurophysiologie. La contribution relative de la choline à l'ensemble du spectre est inchangée, et ceci quelque soit le noyau étudié (^1H , ^{13}C , ^{14}N). Sur ces extraits, la résonance de la choline est composée de la résonance de plusieurs groupes tels que phosphocholine et glycerophosphocholine. Il était donc envisageable que la stabilité de la choline totale provienne d'une balance entre ces éléments. L'analyse HR-MAS met en évidence la stabilité des différentes contributions. Les ondes électromagnétiques ne semblent donc pas influencer le métabolisme de la choline et des phospholipides associés.

Les résultats des autres phospholipides ne montrent aucune modification suggérant ainsi une activité de leur métabolisme enzymatique normale, ainsi que l'absence d'effets sur les radicaux libres.

Concernant les résultats obtenus sur le N-acétyl aspartate, le NAA est un métabolite dont le rôle n'apparaît pas parfaitement établi. Il semble cependant être impliqué dans deux principales voies métaboliques. D'un côté, le NAA serait le produit de l'hydrolyse du N-acétylaspartylglutamate et aurait un rôle protecteur envers les effets neurotoxiques du glutamate lors de sa libération sous certaines conditions (Miller, 1991). D'un autre côté, le NAA peut être synthétisé à partir de l'acétyl CoA et de l'aspartate dans les mitochondries pour participer aux processus de myélinisation (Burri *et al.*, 1991).

L'ensemble des travaux semble relier directement la concentration de NAA à la quantité de neurones présente dans un tissu. Ainsi Tallan (Tallan, 1957) et Nadler et al (Nadler et Cooper, 1972) constatent que ce métabolite est plus concentré dans le système nerveux central et que sa concentration est plus importante dans la substance grise, que la substance blanche.

Nos résultats indiqueraient ainsi une diminution de NAA lors des expositions et donc une diminution du nombre de neurones au niveau de l'hippocampe. Ce type d'effet a déjà pu être mis en évidence lors de souffrances neurologiques tel que lors d'exposition aux radiations ionisantes, dans certains cas de tumeurs ou lors de

maladies neurodégénératives (Mohanakrishnan *et al.*, 1995) (Mohanakrishnan *et al.*, 1997).

Cependant, cet effet ne se traduit aucunement sur les données neurophysiologiques, nous amenant à penser que cet effet est très localisée, n'induisant aucune manifestation clinique. De même la perte enregistrée (-10%) apparaît beaucoup plus faible que celle enregistrée dans le cas de la maladie d'Alzheimer (- 30%) (Mohanakrishnan *et al.*, 1997).

De plus face au faible nombre d'animaux, ces résultats ne doivent être considérés que comme préliminaires et doivent être complétés par d'autres expérimentations, réalisées avec des animaux implantés et non implantés afin de se soustraire de l'existence d'un effet synergique lié à une potentialisation des effets des ondes électromagnétiques par l'implantation chirurgicale.

Enfin la technique HR-MAS est une technique très sensible, certaines difficultés méthodologiques ont pu être rencontrées durant cette étude, des différences dans les temps de prélèvement des hippocampes pourraient se répercuter sur les données observées, avec entre autre des modifications du lactate et du NAA.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était d'apporter des éléments de réponses tangibles quant aux craintes exprimées sur les effets des téléphones portables et des champs de radiofréquences plus généralement.

De précédents travaux nous ont amené à explorer les effets spécifiques des ondes électromagnétiques sur le système cholinergique.

Dans la première partie nous avons étudié spécifiquement le système cholinergique et les retentissements d'une perturbation de celui-ci sur plusieurs paramètres neurophysiologiques.

Après la mise au point d'un système d'analyse automatique de la vigilance, ce travail nous a conduit à explorer les effets de faibles doses de neurotoxiques organophosphorés sur la vigilance et les paramètres électrophysiologiques.

Les résultats de l'étude réalisée permettent de relier l'augmentation de la cholinergie à une augmentation de l'énergie dans la bande thêta et à des modifications de la vigilance, se caractérisant par une augmentation immédiate du sommeil paradoxal et une diminution retardée de l'éveil (effet remarqué dans la période 3-5 jours après injection de soman à 50 µg/kg).

Parallèlement à la problématique initiale, la disparition des perturbations observées après 5 jours, permet de rejeter partiellement l'hypothèse selon laquelle le syndrome de la guerre du Golfe résulterait d'une exposition unique à de faibles concentrations de composés organophosphorés. Cependant dans l'objectif de compléter la réponse à cette question, la réalisation d'une étude faisant appel à des administrations chroniques de neurotoxiques devrait être envisagée.

Dans le cadre de l'étude des effets des ondes électromagnétiques un modèle animal intégré, permettant le suivi simultané d'un ensemble de paramètres neurophysiologiques reflétant le système cholinergique, à été développé par la suite.

La complexité de ce modèle nous a conduit à réaliser une étude sans perturbation extérieure permettant sa validation et la détermination de ces limites.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence la bonne corrélation entre les cycles de l'éveil et ceux de la température. La microdialyse réalisée pour la première fois sur une durée de 3 jours montre une dérive de la concentration d'acétylcholine récoltée au cours de 3 jours d'expérimentation, liée à l'utilisation de néostigmine. Ces

résultats ont également permis de déterminer la bande téta la plus représentative chez le rat du système cholinergique (6-9 Hz).

La deuxième partie de cette thèse a été consacrée à l'étude des effets des champs des ondes électromagnétiques pour des puissances athermiques et aux fréquences 1,8 GHz et 2,45 GHz. L'étude présente à la fois une approche neurophysiologique du système cholinergique, et une approche plus générale du métabolisme cérébral et de la composition lipidique réalisée par RMN.

Ayant confirmé les conditions d'exposition athermique de l'étude, les données obtenues n'ont pu mettre en évidence d'effet des ondes électromagnétiques sur la neurophysiologie, et ceci quelque soit le paramètre étudié. Ces résultats sont en accord avec les données actuelles, qui ne semblent pas montrer d'effets sur le système nerveux excepté dans les conditions d'exposition thermique.

Les résultats obtenus en RMN ne montrent aucune modification de la structure lipidique.

Un effet a pu être mis en évidence concernant un métabolite, le N-acétyl aspartate. Cependant devant les difficultés méthodologiques et le faible nombre d'animaux utilisés dans cette partie de l'étude, il serait précipité de relier l'effet sur celui-ci directement à un effet des ondes électromagnétiques. D'autre part si ces effets sont réellement liés à l'exposition au champ RF, l'absence d'effet sur la neurophysiologie montre alors que cet effet n'est pas suffisant pour se répercuter sur la physiologie.

Aucun effet des ondes électromagnétiques hyperfréquences (1,8 GHz et 2,45 GHz) n'a pu être mis en évidence sur le système cholinergique. Les limites d'expositions aujourd'hui en vigueur semblent présenter les conditions suffisantes pour assurer la santé des personnes exposées concernant cette problématique.

Cependant les effets spécifiques des ondes électromagnétiques évoqués ne se limitent pas uniquement au système cholinergique. Des effets mutagènes et tératogènes sont également craints, de même qu'un doute concernant des effets sur la barrière hémato encéphalique persiste. La nécessité de poursuivre des études portant sur les effets spécifiques des champs de radiofréquences est donc évidente.

Outre la caractérisation de l'absence d'effet des ondes électromagnétiques, ce travail a permis de réaliser un modèle d'étude animal du système cholinergique performant, permettant une étude sur plusieurs jours.

Ce système permet de réduire le nombre d'animaux donc le temps de manipulation, mais également de suivre les interactions entre les différents paramètres mesurés. Il pourrait être utilisé pour des tests visant l'étude de molécules à visée thérapeutiques (anti Alzheimer principalement). Un développement annexe de ce système devrait être envisagé afin d'améliorer la technique de microdialyse et se soustraire de l'emploi de néostigmine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

- Adair E.R., Black D.R.** (2003) Thermoregulatory responses to RF energy absorption. *Bioelectromagnetics* Suppl:S17-38.
- Andersen P., Bland H.B., Myhrer T., Schwartzkroin P.A.** (1979) Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Research* 165:13-22.
- Anderson D.C., King S.C., Parsons S.M.** (1982) Proton gradient linkage to active uptake of [3H]acetylcholine by Torpedo electric organ synaptic vesicles. *Biochemistry* 21:3037-3043.
- Anderson V., Joyner K.H.** (1995) Specific absorption rate levels measured in a phantom head exposed to radio frequency transmissions from analog hand-held mobile phones. *Bioelectromagnetics* 16:60-69.
- Arai N., Enomoto H., Okabe S., Yuasa K., Kamimura Y., Ugawa Y.** (2003) Thirty minutes mobile phone use has no short-term adverse effects on central auditory pathways. *Clin Neurophysiol* 114:1390-1394.
- Aweda M.A., Gbenebitse S., Meidinyo R.O.** (2003) Effects of 2.45 GHz microwave exposures on the peroxidation status in Wistar rats. *Niger Postgrad Med J* 10:243-246.
- Baille V., Dorandeu F., Carpentier P., Bizot J.C., Filliat P., Four E., Denis J., Lallement G.** (2001) Acute exposure to a low or mild dose of soman: biochemical, behavioral and histopathological effects. *Pharmacol Biochem Behav* 69:561-569.
- Bak M., Sliwinska-Kowalska M., Zmyslony M., Dudarewicz A.** (2003) No effects of acute exposure to the electromagnetic field emitted by mobile phones on brainstem auditory potentials in young volunteers. *Int J Occup Med Environ Health* 16:201-208.
- Balcer-Kubiczek E.K., Harrison G.H.** (1985) Evidence for microwave carcinogenesis in vitro. *Carcinogenesis* 6:859-864.
- Barteri M., Pala A., Rotella S.** (2005) Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity. *Biophys Chem* 113:245-253.
- 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 Research* 58:365-384.

- Bennett T.L., Nunn P.J., Inman D.P.** (1971) Effects of scopolamine on hippocampal theta and correlated discrimination performance. *Physiology & Behavior* 7:451-454.
- Betti L., Trebbi G., Lazzarato L., Brizzi M., Calzoni G.L., Marinelli F., Nani D., Borghini F.** (2004) Nonthermal microwave radiations affect the hypersensitive response of tobacco to tobacco mosaic virus. *J Altern Complement Med* 10:947-957.
- Birendra N.M., Melvi M.J.** (1997) Role of cholinergic inputs to the medial preoptic area in regulation of sleep-wakefulness and body temperature in freely moving rats. *Brain Res* 750:311-317.
- Bise W.** (1978) Low power radio-frequency and microwave effects on human electroencephalogram and behavior. *Physiol Chem Phys* 10:387-398.
- Bligh E.G., Dyer W.J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.
- Board P.G.V.C.** (1995) Unexplained illnesses among desert storm veterans. *Arch internmed* 155:262-268.
- Borbely A.A., Huber R., Graf T., Fuchs B., Gallmann E., Achermann P.** (1999) Pulsed high-frequency electromagnetic field affects human sleep and sleep electroencephalogram. *Neurosci Lett* 275:207-210.
- Bouwman B.M., Lier H.v., Nitert H.E.J., Drinkenburg W.H.I.M., Coenen A.M.L., Rijn C.M.v.** (2005) The relationship between hippocampal EEG theta activity and locomotor behaviour in freely moving rats: effects of vigabatrin. *Brain Research Bulletin* 64:505-509.
- Breer H., Knipper M.** (1990) Regulation of high affinity choline uptake. *J Neurobiol* 21:269-275.
- Burri R., Steffen C., Herschkowitz N.** (1991) N-acetyl-L-aspartate is a major source of acetyl groups for lipid synthesis during rat brain development. *Dev Neurosci* 13:403-411.
- Butrous G.S., Male J.C., Webber R.S., Barton D.G., Meldrum S.J., Bonnell J.A., Camm A.J.** (1983) The effect of power frequency high intensity electric fields on implanted cardiac pacemakers. *Pacing Clin Electrophysiol* 6:1282-1292.
- Butt A.E., Testylier G., Dykes R.W.** (1997) Acetylcholine release in rat frontal and somatosensory cortex is enhanced during tactile discrimination learning. *Psychobiology* 25:18-33.

- Carpentier P., Foquin A., Dorandeu F., Lallement G.** (2001) Delta activity as an early indicator for soman-induced brain damage: a review. *Neurotoxicology* 22:299-315.
- Cassel J.C., Cosquer B., Galani R., Kuster N.** (2004) Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter radial-maze performance in rats. *Behav Brain Res* 155:37-43.
- Cerdan S., Parrilla R., Santoro J., Rico M.** (1985) ¹H NMR detection of cerebral myo-inositol. *FEBS Letters* 187:167-172.
- Chizhenkova R.A.** (1988) Slow potentials and spike unit activity of the cerebral cortex of rabbits exposed to microwaves. *Bioelectromagnetics* 9:337-345.
- Chou C.K., Guy A.W.** (1979) Carbon-loaded Teflon electrodes for chronic EEG recordings in microwave research. *J Microw Power* 14:399-404.
- Chou C.K., Guy A.W., Kunz L.L., Johnson R.B., Crowley J.J., Krupp J.H.** (1992) Long-term, low-level microwave irradiation of rats. *Bioelectromagnetics* 13:469-496.
- Cobb B.L., Jauchem J.R., Adair E.R.** (2004) Radial arm maze performance of rats following repeated low level microwave radiation exposure. *Bioelectromagnetics* 25:49-57.
- Collis C.S., FAU M.B., Segal L.A.** (1988) Effects of pulsed electromagnetic fields on Na⁺ fluxes across stripped rabbit colon epithelium. *J Appl Physiol* 65:124-130.
- Cook C.M., Thomas A.W., Prato F.S.** (2002) Human electrophysiological and cognitive effects of exposure to ELF magnetic and ELF modulated RF and microwave fields: a review of recent studies. *Bioelectromagnetics* 23:144-157.
- Cosquer B., Galani R., Kuster N., Cassel J.C.** (2005) Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: a plus-maze study including test validation. *Behav Brain Res* 156:65-74.
- Crouzier D., Baubichon D., Bourbon F., Testylier G.** (2005) Acetylcholine release, EEG spectral analysis, sleep staging and body temperature studies: A multiparametric approach on freely moving rats. *J Neurosci Methods* 151:159-167.
- Crouzier D., Baille Le Crom V., Four E., Lallement G., Testylier G.** (2004) Disruption of mice sleep stages induced by low doses of organophosphorus compound soman. *Toxicology* 199:59-71.

- Curcio G., Ferrara M., De Gennaro L., Cristiani R., D'Inzeo G., Bertini M.** (2004) Time-course of electromagnetic field effects on human performance and tympanic temperature. *Neuroreport* 15:161-164.
- D'Andrea J.A., Adair E.R., de Lorge J.O.** (2003a) Behavioral and cognitive effects of microwave exposure. *Bioelectromagnetics* Suppl:S39-62.
- D'Andrea J.A., Chou C.K., Johnston S.A., Adair E.R.** (2003b) Microwave effects on the nervous system. *Bioelectromagnetics* Suppl:S107-147.
- D'Costa H., Trueman G., Tang L., Abdel-rahman U., Abdel-rahman W., Ong K., Cosic I.** (2003) Human brain wave activity during exposure to radiofrequency field emissions from mobile phones. *Australas Phys Eng Sci Med* 26:162-167.
- Dubreuil D., Jay T., Edeline J.M.** (2002) Does head-only exposure to GSM-900 electromagnetic fields affect the performance of rats in spatial learning tasks? *Behav Brain Res* 129:203-210.
- Dykes R.W.** (1992) Evidence implicating acetylcholine in neuronal plasticity and in long-term changes in somatosensory cortex following deafferentation. *Clin Neuropharmacol* 15:546A-547A.
- Edelstyn N., Oldershaw A.** (2002) The acute effects of exposure to the electromagnetic field emitted by mobile phones on human attention. *Neuroreport* 13:119-121.
- Ellman G.L., Courtney K.D, Andres V, Featherstone R M.** (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.
- Eulitz C., Ullsperger P., Freude G., Elbert T.** (1998) Mobile phones modulate response patterns of human brain activity. *Neuroreport* 9:3229-3232.
- Finnie J.W., Blumbergs P.C., Manavis J., Utteridge T.D., Gebski V., Swift J.G., Vernon-Roberts B., Kuchel T.R.** (2001) Effect of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* 33:338-340.
- Finnie J.W., Blumbergs P.C., Manavis J., Utteridge T.D., Gebski V., Davies R.A., Vernon-Roberts B., Kuchel T.R.** (2002) Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* 34:344-347.

- Fossier P., Poulain B., Baux G., Tauc L.** (1988) Both presynaptic nicotinic-like and muscarinic-like autoreceptors regulate acetylcholine release at an identified neuro-neuronal synapse of Aplysia. *Pflugers Arch* 411:345-352.
- Freude G., Ullsperger P., Eggert S., Ruppe I.** (1998) Effects of microwaves emitted by cellular phones on human slow brain potentials. *Bioelectromagnetics* 19:384-387.
- Fritze K., Sommer C., Schmitz B., Mies G., Hossmann K.A., Kiessling M., Wiessner C.** (1997) Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 94:465-470.
- Gajsek P., Zirix J.M., Hurt W.D., Walters T.J., Mason P.A.** (2001) Predicted SAR in Sprague-Dawley rat as a function of permittivity values. *Bioelectromagnetics* 22:384-400.
- Gajsek P., Walters T.J., Hurt W.D., Zirix J.M., Nelson D.A., Mason P.A.** (2002) Empirical validation of SAR values predicted by FDTD modeling. *Bioelectromagnetics* 23:37-48.
- Gastaut J.L., Michel B., Hassan S.S., Cerda M., Bianchi L., Gastaut H.** (1979) Electroencephalography in brain edema (127 cases of brain tumor investigated by cranial computerized tomography). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 46:239-255.
- Giraldo E., Hammer R., Ladinsky H.** (1987) Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain as determined in binding studies with AF-DX 116 and pirenzepine. *Life Sci* 40:833-840.
- Goldman H., Lin J.C., Murphy S., Lin M.F.** (1984) Cerebrovascular permeability to ⁸⁶Rb in the rat after exposure to pulsed microwaves. *Bioelectromagnetics* 5:323-330.
- Govindaraju V., Young K., Maudsley A.A.** (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13:129-153.
- Gyls K.H., Jenden D.J.** (1996) Regulation of acetylcholine synthesis in the presence of hemicholinium mustard. *Life Sci* 58:1937-1946.
- Haarala C., Bjornberg L., Ek M., Laine M., Revonsuo A., Koivisto M., Hamalainen H.** (2003) Effect of a 902 MHz electromagnetic field emitted by mobile phones on human cognitive function: A replication study. *Bioelectromagnetics* 24:283-288.

- Haarala C., Ek M., Bjornberg L., Laine M., Revonsuo A., Koivisto M., Hamalainen H.** (2004) 902 MHz mobile phone does not affect short term memory in humans. *Bioelectromagnetics* 25:452-456.
- Hamblin D.L., Wood A.W.** (2002) Effects of mobile phone emissions on human brain activity and sleep variables. *Int J Radiat Biol* 78:659-669.
- Hietanen M., Kovala T., Hamalainen A.M.** (2000) Human brain activity during exposure to radiofrequency fields emitted by cellular phones. *Scand J Work Environ Health* 26:87-92.
- Hinrichs H., Heinze H.J.** (2004) Effects of GSM electromagnetic field on the MEG during an encoding-retrieval task. *Neuroreport* 15:1191-1194.
- Huber R., Graf T., Cote K.A., Wittmann L., Gallmann E., Matter D., Schuderer J., Kuster N., Borbely A.A., Achermann P.** (2000) Exposure to pulsed high-frequency electromagnetic field during waking affects human sleep EEG. *Neuroreport* 11:3321-3325.
- 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.
- 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.
- Ilhan A., Gurel A., Armutcu F., Kamisli S., Iraz M., Akyol O., Ozen S.** (2004) Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 340:153-162.
- Israel M., Manaranche R.** (1985) The release of acetylcholine: from a cellular towards a molecular mechanism. *Biol Cell* 55:1-14.
- Itowi N., Yamatodani A., Kiyono S., Hiraiwa M., Wada H.** (1990) Development of a computer program classifying rat sleep stages. *Journal of Neuroscience Methods* 31:137-143.
- IuA K.** (1963) [on Changes in the Electrical Activity of the Rabbit Cerebral Cortex During the Action of an Ultra-High-Frequency Electromagnetic Field. li. On the Direct Action of the Ultra-High-Frequency Field on the Central Nervous System.]. *Biull Eksp Biol Med* 56:42-46.

- Jarrard L.E.** (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60:9-26.
- Johnson C.C., Guy A.W.** (1972) Non ionizing electromagnetic wave effects in biological materials and systems. *Proc IEEE* 60:692-718.
- Kainz W., Casamento J.P., Ruggera P.S., Chan D.D., Witters D.M.** (2005) Implantable cardiac pacemaker electromagnetic compatibility testing in a novel security system simulator. *IEEE Trans Biomed Eng* 52:520-530.
- Karasinski P., Stinus L., Robert C., Limoge A.** (1994) Real-time sleep-wake scoring in the rat using a single EEG channel. *Sleep* 17:113-119.
- Katz B., Miledi R.** (1967) The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* 189:535-544.
- Keita M.S., Frankel Kohn L., Bertrand N., Lecanu L., Monmaur P.** (2000) Acetylcholine release in the hippocampus of the urethane anaesthetised rat positively correlates with both peak theta frequency and relative power in the theta band. *Brain Res* 887:323-334.
- Koivisto M., Krause C.M., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H.** (2000a) The effects of electromagnetic field emitted by GSM phones on working memory. *Neuroreport* 11:1641-1643.
- Koivisto M., Revonsuo A., Krause C., Haarala C., Sillanmaki L., Laine M., Hamalainen H.** (2000b) Effects of 902 MHz electromagnetic field emitted by cellular telephones on response times in humans. *Neuroreport* 11:413-415.
- Konopacki J., Maciver M.B., Bland B.H., Roth S.H.** (1987) Theta in hippocampal slices: relation to synaptic responses of dentate neurons. *Brain Res Bull* 18:25-27.
- Kramarenko A.V., Tan U.** (2003) Effects of high-frequency electromagnetic fields on human EEG: a brain mapping study. *Int J Neurosci* 113:1007-1019.
- Kramis R., Vanderwolf C.H., Bland B.H.** (1975) Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol* 49:58-85.
- Krause C.M., Sillanmaki L., Koivisto M., Haggqvist A., Saarela C., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H.** (2000) Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during a memory task. *Neuroreport* 11:761-764.

- Krause C.M., Haarala C., Sillanmaki L., Koivisto M., Alanko K., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H.** (2004) Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during an auditory memory task: a double blind replication study. *Bioelectromagnetics* 25:33-40.
- Kuster N., Schuderer J., Christ A., Futter P., Ebert S.** (2004) Guidance for exposure design of human studies addressing health risk evaluations of mobile phones. *Bioelectromagnetics* 25:524-529.
- Lai H.** (1992) Research on the neurological effects of nonionizing radiation at the University of Washington. *Bioelectromagnetics* 13:513-526.
- Lai H., Singh N.P.** (1995) Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 16:207-210.
- Lai H., Horita A., Guy A.W.** (1988) Acute low-level microwave exposure and central cholinergic activity: studies on irradiation parameters. *Bioelectromagnetics* 9:355-362.
- Lai H., Horita A., Guy A.W.** (1994) Microwave irradiation affects radial-arm maze performance in the rat. *Bioelectromagnetics* 15:95-104.
- Lai H., Horita A., Chou C.K., Guy A.W.** (1987) Effects of low-level microwave irradiation on hippocampal and frontal cortical choline uptake are classically conditionable. *Pharmacol Biochem Behav* 27:635-639.
- Lai H., Carino M.A., Horita A., Guy A.W.** (1989) Low-level microwave irradiation and central cholinergic activity: a dose-response study. *Bioelectromagnetics* 10:203-208.
- Lai H., Carino M.A., Horita A., Guy A.W.** (1992) Opioid receptor subtypes that mediate a microwave-induced decrease in central cholinergic activity in the rat. *Bioelectromagnetics* 13:237-246.
- Lai H., Carino M.A., Wen Y.F., Horita A., Guy A.W.** (1991) Naltrexone pretreatment blocks microwave-induced changes in central cholinergic receptors. *Bioelectromagnetics* 12:27-33.
- Lee T.M., Lam P.K., Yee L.T., Chan C.C.** (2003) The effect of the duration of exposure to the electromagnetic field emitted by mobile phones on human attention. *Neuroreport* 14:1361-1364.
- Lee T.M., Ho S.M., Tsang L.Y., Yang S.H., Li L.S., Chan C.C., Yang S.Y.** (2001) Effect on human attention of exposure to the electromagnetic field emitted by mobile phones. *Neuroreport* 12:729-731.

- Leung L.S., Martin L.A., Stewart D.J.** (1994) Hippocampal theta rhythm in behaving rats following ibotenic acid lesion of the septum. *Hippocampus* 4:136-147.
- Lin J.C., Lin M.F.** (1980) Studies on microwave and blood-brain barrier interaction. *Bioelectromagnetics* 1:313-323.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mann K., Roschke J.** (1996) Effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on human sleep. *Neuropsychobiology* 33:41-47.
- Marino A.A., Nilsen E., Frilot C.** (2003) Nonlinear changes in brain electrical activity due to cell phone radiation. *Bioelectromagnetics* 24:339-346.
- Marrosu F., Cozzolino A., Puligheddu M., Giagheddu M., Di Chiara G.** (1997) Hippocampal theta activity after systemic administration of a non-peptide delta-opioid agonist in freely-moving rats: relationship to D1 dopamine receptors. *Brain Res* 776:24-29.
- Marrosu F., Portas C., Mascia M.S., Casu M.A., Fa M., Giagheddu M., Imperato A., Gessa G.L.** (1995) Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* 671:329-332.
- Martinez-Bisbal M.C., Marti-Bonmati L., Piquer J., Revert A., Ferrer P., Llacer J.L., Piotto M., Assemat O., Celda B.** (2004) ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 17:191-205.
- Mason P., Miller S.A., Merritt J.H., Scholin T.L., Mahajan K., Murphy M.R.** (2001) An overview of the airforce research laboratory's current blood brain barrier (BBB) research effort. In: BEMS. St Paulm, Minnesota, USA.
- Mausset A.L., de Seze R., Montpeyroux F., Privat A.** (2001) Effects of radiofrequency exposure on the GABAergic system in the rat cerebellum: clues from semi-quantitative immunohistochemistry. *Brain Res* 912:33-46.
- Maysinger D., Herrera Marschitz M., Carlsson A., Garofalo L., Cuello A.C., Ungerstedt U.** (1988) Striatal and cortical acetylcholine release in vivo in rats with unilateral decortication: effects of treatment with monosialoganglioside GM1. *Brain Res* 461:355-360.
- McGehee D.S., Role L.W.** (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol* 57:521-546.

- Merritt J.H., Chamness A.F., Allen S.J.** (1978) Studies on blood-brain barrier permeability after microwave-radiation. *Radiat Environ Biophys* 15:367-377.
- Mesulam M.M., Mufson E.J., Wainer B.H., Levey A.I.** (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10:1185-1201.
- Miller B.L.** (1991) A review of chemical issues in ¹H NMR spectroscopy: N-acetyl-L-aspartate, creatine and choline. *NMR Biomed* 4:47-52.
- Mitchell C.L., McRee D.I., Peterson N.J., Tilson H.A., Shandala M.G., Rudnev M.I., Varetiskii V.V., Navakatikyan M.I.** (1989) Results of a United States and Soviet Union joint project on nervous system effects of microwave radiation. *Environ Health Perspect* 81:201-209.
- Mohanakrishnan P., Fowler A.H., Vonsattel J.P., Husain M.M., Jolles P.R., Liem P., Komoroski R.A.** (1995) An in vitro ¹H nuclear magnetic resonance study of the temporoparietal cortex of Alzheimer brains. *Exp Brain Res* 102:503-510.
- Mohanakrishnan P., Fowler A.H., Vonsattel J.P., Jolles P.R., Husain M.M., Liem P., Myers L., Komoroski R.A.** (1997) Regional metabolic alterations in Alzheimer's disease: an in vitro ¹H NMR study of the hippocampus and cerebellum. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52:B111-117.
- Monmaur P., Breton P.** (1991) Elicitation of hippocampal theta by intraseptal carbachol injection in freely moving rats. *Brain Res* 544:150-155.
- Monmaur P., Collet A., Puma C., Frankel-Kohn L., Sharif A.** (1997) Relations between acetylcholine release and electrophysiological characteristics of theta rhythm: A microdialysis study in the urethane-anesthetized rat hippocampus. *Brain Research Bulletin* 42:141-146.
- Moriyama E., Salcman M., Broadwell R.D.** (1991) Blood-brain barrier alteration after microwave-induced hyperthermia is purely a thermal effect: I. Temperature and power measurements. *Surg Neurol* 35:177-182.
- Morris R.G., Garrud P., Rawlins J.N., O'Keefe J.** (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Nadler J.V., Cooper J.R.** (1972) N-acetyl-L-aspartic acid content of human neural tumours and bovine peripheral nervous tissues. *J Neurochem* 19:313-319.
- Neckelmann D., Olsen O.E., Fagerland S., Ursin R.** (1994) The reliability and functional validity of visual and semiautomatic sleep/wake scoring in the Moll-Wistar rat. *Sleep* 17:120-131.

- Neubauer C., Phelan A.M., Kues H., Lange D.G.** (1990) Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex. *Bioelectromagnetics* 11:261-268.
- Paxinos G., Watson C.** (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates, Second Edition: Academic Press.
- Perry E.K., Smith C.J., Perry R.H., Whitford C., Johnson M., Birdsall N.J.** (1989) Regional distribution of muscarinic and nicotinic cholinergic receptor binding activities in the human brain. *J Chem Neuroanat* 2:189-199.
- Persson B.R., Salford L.G., Brun A.** (1997) Blood brain barrier permeability in rats exposed to electromagnetic fields used in wireless communication. *Wireless network* 3.
- Petsche H., Stumpf C., Gogolak G.** (1962) [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells.]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 14:202-211.
- Preece A.W., Iwi G., Davies-Smith A., Wesnes K., Butler S., Lim E., Varey A.** (1999) Effect of a 915-MHz simulated mobile phone signal on cognitive function in man. *Int J Radiat Biol* 75:447-456.
- Preston E., Vavasour E.J., Assenheim H.M.** (1979) Permeability of the blood-brain barrier to mannitol in the rat following 2450 MHz microwave irradiation. *Brain Res* 174:109-117.
- Regoli F., Gorbi S., Machella N., Tedesco S., Benedetti M., Bocchetti R., Notti A., Fattorini D., Piva F., Principato G.** (2005) Pro-oxidant effects of extremely low frequency electromagnetic fields in the land snail *Helix aspersa*. *Free Radical Biology and Medicine* 39:1620-1628.
- Reiser H., Dimpfel W., Schober F.** (1995) The influence of electromagnetic fields on human brain activity. *Eur J Med Res* 1:27-32.
- Reite M., Higgs L., Lebet J.P., Barbault A., Rossel C., Kuster N., Dafni U., Amato D., Pasche B.** (1994) Sleep inducing effect of low energy emission therapy. *Bioelectromagnetics* 15:67-75.
- Richards D.A., Morrone L.A., Bowery N.G.** (2000) Hippocampal extracellular amino acids and EEG spectral analysis in a genetic rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology* 39:2433-2441.

- Robert C., Guilpin C., Limoge A.** (1999) Automated sleep staging systems in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 88:111-122.
- Roschke J., Mann K.** (1997) No short-term effects of digital mobile radio telephone on the awake human electroencephalogram. *Bioelectromagnetics* 18:172-176.
- Salford L.G., Brun A., Sturesson K., Eberhardt J.L., Persson B.R.** (1994) Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microsc Res Tech* 27:535-542.
- Salford L.G., Brun A.E., Eberhardt J.L., Malmgren L., Persson B.R., Brun A., Sturesson K.** (2003) Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect* 111:881-883; discussion A408.
- Santini R., Santini P., Seigne M., Danze J.M.** (2001) [Symptoms notified by people living near cell phone relay stations]. *Presse Med* 30:1594.
- Santini R., Santini P., Danze J.M., Le Ruz P., Seigne M.** (2002) [Investigation on the health of people living near mobile telephone relay stations: I/Incidence according to distance and sex]. *Pathol Biol (Paris)* 50:369-373.
- Santini R., Santini P., Danze J.M., Le Ruz P., Seigne M.** (2003) [Symptoms experienced by people in vicinity of base stations: II/ Incidences of age, duration of exposure, location of subjects in relation to the antennas and other electromagnetic factors]. *Pathol Biol (Paris)* 51:412-415.
- Sargent P.B.** (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16:403-443.
- Sienkiewicz Z.J., Blackwell R.P., Haylock R.G., Saunders R.D., Cobb B.L.** (2000) Low-level exposure to pulsed 900 MHz microwave radiation does not cause deficits in the performance of a spatial learning task in mice. *Bioelectromagnetics* 21:151-158.
- Simunic D., Wach P., Renhart W., Stollberger R.** (1996) Spatial distribution of high-frequency electromagnetic energy in human head during MRI: numerical results and measurements. *IEEE Trans Biomed Eng* 43:88-94.
- Stavinoha W.B., Weintraub S.T., Modak A.T.** (1973) The use of microwave heating to inactivate cholinesterase in the rat brain prior to analysis for acetylcholine. *J Neurochem* 20:361-371.

- Szmigielski S.** (1996) Cancer morbidity in subjects occupationally exposed to high frequency (radiofrequency and microwave) electromagnetic radiation. *Sci Total Environ* 180:9-17.
- Takashima S., Onaral B., Schwan H.P.** (1979) Effects of modulated RF energy on the EEG of mammalian brains. Effects of acute and chronic irradiations. *Radiat Environ Biophys* 16:15-27.
- Tallan H.H.** (1957) Studies on the distribution of N-acetyl-L-aspartic acid in brain. *J Biol Chem* 224:41-45.
- Tauc L.** (1982) Non vesicular release of neurotransmitter. *Physiol Rev* 62:857-893.
- Tell R., Mantiply E.** (1980) Population exposure to VHF and UHF broadcast radiation in the United States. *Proc IEEE* 68:6-12.
- Testylier G., Tonduli L., Malabiau R., Debouzy J.C.** (2002) Effects of exposure to low level radiofrequency fields on acetylcholine release in hippocampus of freely moving rats. *Bioelectromagnetics* 23:249-255.
- Thuroczy G., Kubinyi G., Bodo M., Bakos J., Szabo L.D.** (1994) Simultaneous response of brain electrical activity (EEG) and cerebral circulation (REG) to microwave exposure in rats. *Rev Environ Health* 10:135-148.
- Timofeeva O.A., Gordon C.J.** (2001) Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain Res* 893:165-177.
- Tsurita G., Nagawa H., Ueno S., Watanabe S., Taki M.** (2000) Biological and morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field. *Bioelectromagnetics* 21:364-371.
- Tyazhelov V.V., Tigranian R.E., Khizhniak E.P.** (1977) New artifact free electrodes for recording of biological potentials in strong electromagnetic field. *Radion Science* 16:121-123.
- Urban P., Lukas E., Roth Z.** (1998) Does acute exposure to the electromagnetic field emitted by a mobile phone influence visual evoked potentials? A pilot study. *Cent Eur J Public Health* 6:288-290.
- Valvano J.** (2000) Measuring temperature using thermistors. *Circuit cellar on line* 121:1-6.
- Vance D.E.** (1991) Phospholipid metabolism and cell signalling in eucariotes. In: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (Vance DE, Vance J, eds), pp 205-241. Amsterdam, London, New York, Tokyo.: Elsevier.

- Vandervolf C., Kramis R., Robinson T.** (1977) Hippocampal electrical activity during waking behavior and sleep: analyses using centrally acting drugs. *Ciba Found Symp* 58:199-226.
- Von Klitzing I.** (1995) Low frequency pulsed electromagnetic fields influence EEG of man. *Pysica Medica* 11.
- Vorobyov V.V., Galchenko A.A., Kukushkin N.I., Akoev I.G.** (1997) Effects of weak microwave fields amplitude modulated at ELF on EEG of symmetric brain areas in rats. *Bioelectromagnetics* 18:293-298.
- Wagner P., Roschke J., Mann K., Hiller W., Frank C.** (1998) Human sleep under the influence of pulsed radiofrequency electromagnetic fields: a polysomnographic study using standardized conditions. *Bioelectromagnetics* 19:199-202.
- Wang B., Lai H.** (2000) Acute exposure to pulsed 2450-MHz microwaves affects water-maze performance of rats. *Bioelectromagnetics* 21:52-56.
- Ward T.R., Ali J.S.** (1985) Blood-brain barrier permeation in the rat during exposure to low-power 1.7-GHz microwave radiation. *Bioelectromagnetics* 6:131-143.
- Ward T.R., Elder J.A., Long M.D., Svendsgaard D.** (1982) Measurement of blood-brain barrier permeation in rats during exposure to 2450-MHz microwaves. *Bioelectromagnetics* 3:371-383.
- Williams W.M., Platner J., Michaelson S.M.** (1984a) Effect of 2450 MHz microwave energy on the blood-brain barrier to hydrophilic molecules. C. Effect on the permeability to [14C]sucrose. *Brain Res* 319:183-190.
- Williams W.M., Del Cerro M., Michaelson S.M.** (1984b) Effect of 2450 MHz microwave energy on the blood-brain barrier to hydrophilic molecules. B. Effect on the permeability to HRP. *Brain Res* 319:171-181.
- Williams W.M., Lu S.T., Del Cerro M., Michaelson S.M.** (1984c) Effect of 2450 MHz microwave energy on the blood-brain barrier to hydrophilic molecules. D. Brain temperature and blood-brain barrier permeability to hydrophilic tracers. *Brain Res* 319:191-212.
- Williams W.M., Hoss W., Formaniak M., Michaelson S.M.** (1984d) Effect of 2450 MHz microwave energy on the blood-brain barrier to hydrophilic molecules. A. Effect on the permeability to sodium fluorescein. *Brain Res* 319:165-170.
- Winson J.** (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201:160-163.

- Yamaguchi H., Tsurita G., Ueno S., Watanabe S., Wake K., Taki M., Nagawa H.** (2003) 1439 MHz pulsed TDMA fields affect performance of rats in a T-maze task only when body temperature is elevated. *Bioelectromagnetics* 24:223-230.
- Yamamoto J.** (1998) Effects of nicotine, pilocarpine, and tetrahydroaminoacridine on hippocampal theta waves in freely moving rabbits. *Eur J Pharmacol* 359:133-137.
- Yamamura H.I., Kuhar M.J., Snyder S.H.** (1974) In vivo identification of muscarinic cholinergic receptor binding in rat brain. *Brain Res* 80:170-176.