

ACCÈS OUVERT

Publié : 31 janvier 2024

Citation : Irigaray P, Awaida N, et al., 2024.
Biomarqueurs moléculaires en
Electrohypersensibilité et Sensibilité chimique
multiple : comment elles peuvent aider au
diagnostic, au suivi des malades et à la
compréhension étiopathologique, Archives de
recherche médicale, [en ligne] 12(1).
[https://doi.org/10.18103/mra.v](https://doi.org/10.18103/mra.v12i1.4771)

[12i1.4771](https://doi.org/10.18103/mra.v12i1.4771)

Droits d'auteur:© 2024 Société européenne de
médecine. Il s'agit d'un article en libre accès
distribué selon les termes de la licence
d'attribution Creative Commons, qui permet une
utilisation, une distribution et une reproduction
sans restriction sur n'importe quel support, à
condition que l'auteur et la source originaux
soient crédités.

[https://doi.org/10.18103/mra.v](https://doi.org/10.18103/mra.v12i1.4771)

[12i1.4771](https://doi.org/10.18103/mra.v12i1.4771)

ISSN :2375-1924

ARTICLE DE RECHERCHE

Biomarqueurs moléculaires de l'électrohypersensibilité et de la sensibilité chimique multiple : comment ils peuvent aider au diagnostic, au suivi des malades et à la compréhension étiopathologique.

Philippe Irigaray¹, Natalio Awaida², Dominique Belpomme^{1,3,*}

1. Institut européen de recherche sur le cancer et l'environnement (ECERI), Bruxelles, Belgique
2. Labo XV, Laboratoire de Biologie, Paris, France
3. Service d'oncologie médicale, Université de Paris, France

* Auteur correspondant: contact.belpomme@gmail.com

ABSTRAIT:

L'électrohypersensibilité (EHS) et la sensibilité chimique multiple (MCS) sont deux nouvelles affections neurologiques émergentes à l'échelle mondiale dans le cadre d'une pathologie environnementale liée à la sensibilité. Nous avons récemment étendu et confirmé notre observation précédente montrant que l'EHS et le MCS partagent des symptômes cliniques identiques et peuvent coexister sous la forme d'un syndrome neurologique unique commun dans 25 % des cas. Il n'existe actuellement aucune étude biologique publiée sur ces troubles, à l'exception de celle que nous avons précédemment publiée à titre préliminaire. Dans la présente étude, nous montrons que l'EHS, le MCS et le syndrome combiné partagent des changements biochimiques identiques. Plus précisément, en mesurant les niveaux de biomarqueurs moléculaires dans le sang périphérique et l'urine des malades faisant partie d'une cohorte de 2 018 cas consécutifs, nous montrons que les deux troubles et le syndrome combiné peuvent être objectivement caractérisés, dans environ 90 % des cas, par une diminution de la production de sulfate de 6-hydroxymélatonine dans l'urine, alors que dans 30 à 50 % ils se caractérisent par des taux accrus d'histamine et de protéines de choc thermique (HSP) 27 et/ou 70, ainsi que de protéine S100B et de nitrotyrosine dans le sang périphérique. Des niveaux accrus d'histamine et de HSP sont des indicateurs d'inflammation de bas grade, tandis que des niveaux accrus de protéine S100B et de nitrotyrosine sont des indicateurs de perturbation/ouverture de la barrière hémato-encéphalique. De plus, nous montrons que dans environ 15 % des cas, des auto-anticorps anti-myéline peuvent être détectés dans le sang des malades, expliquant ainsi l'apparition d'une réponse auto-immune. La sensibilité, la spécificité et la reproductibilité des tests biochimiques utilisés sont discutées, ainsi que le rôle de ces indicateurs utilisés comme biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des patients. Nous discutons également les cas présentant des modifications biologiques indétectables pour lesquelles ils peuvent néanmoins être diagnostiqués par l'analyse des neurotransmetteurs cérébraux dans les urines et l'imagerie cérébrale. Sur la base de ces données biologiques, il est suggéré que l'EHS et/ou le MCS sont de nouveaux troubles cérébraux, générés via un mécanisme étiopathogénique commun.

Mots clés: maladies neurologiques liées à la sensibilité ; Champ électromagnétique; électrohypersensibilité; intolérance environnementale idiopathique ; sensibilité chimique multiple.

Abréviations :

6-OHMS, sulfate d'hydroxy-mélatonine ; **BHE**, barrière hémato-encéphalique ; **SNC**, système nerveux central ; **EHS**, électrohypersensibilité ; **CEM**, champ électromagnétique ; **CRP-us**, protéine réactive C haute sensibilité ; **HSP27**, protéine de choc thermique 27 ; **HSP70**, protéine de choc thermique 70 ; **IEI-CEM**, Intolérance environnementale idiopathique attribuée aux champs électromagnétiques ; **IgE**, immunoglobuline E ; **MCS**, sensibilité chimique multiple ; **NOS**, stress nitroso-oxydatif ; **NTT**, Nitrotyrosine ; **DTC**, échographie Doppler transcrânienne ; **TSCU**, tomosphygmographie cérébrale ultrasonore ; **OMS**, Organisation mondiale de la santé ; **WiFi**, fidélité sans fil.

1. Introduction

La sensibilité chimique multiple (MCS) et l'électrohypersensibilité (EHS) sont de nouveaux troubles neurologiques émergents à l'échelle mondiale dans le cadre d'une pathologie environnementale acquise liée à la sensibilité. Les deux troubles ont été définis comme la survenue de manifestations symptomatiques pour des niveaux d'exposition environnementale inférieurs à ceux communément tolérés. Le MCS a été décrit pour la première fois en 1962 par l'allergologue américain Theron G Randolph comme un trouble provoqué par l'exposition à une faible concentration de plusieurs produits chimiques exogènes¹. L'EHS a ensuite été identifiée expérimentalement en 1991 par William Rea et définie de la même manière comme un trouble pathologique lié à la sensibilité résultant d'une exposition de faible intensité aux champs électromagnétiques (CEM)². Comme indiqué, la recherche expérimentale de provocation a été dans des conditions totalement contrôlées sur le plan environnemental en utilisant une série de champs électromagnétiques (CEM), dont la fréquence variait de 0 à 5 MHz. Les témoins placebo et les témoins sains n'ont présenté aucun symptôme, alors que 64 % des patients des patients sensibles aux CEM présentaient des symptômes.

Depuis la description fondamentale de Randolph, le MCS a été reconnu comme une intolérance environnementale acquise à de faibles niveaux d'exposition à plusieurs produits chimiques lors de l'atelier parrainé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) à Berlin en 1996³, et a été identifié et caractérisé plus précisément lors d'une réunion de consensus en 1999 à Atlanta (États-Unis)⁴.

Concernant l'EHS, il subsiste dans la littérature scientifique une confusion persistante entre l'EHS et le trouble pathologique décrit cliniquement appelé « intolérance environnementale idiopathique attribuée aux CEM » (IEI-CEM), qui ont tous deux été rapportés et reconnus par l'OMS⁵⁻⁶.

Suite à notre première tentative de caractérisation de l'EHS en 2015⁷, nous avons montré que l'EHS peut être identifié un trouble médical distinct⁸; et plus récemment, cela peut être causé par une exposition à des CEM anthropiques (c'est-à-dire par une exposition à des CEM d'origine humaine plutôt que naturelle) et éventuellement, dans certains cas, par des produits chimiques environnementaux comme dans la MCS⁹. De plus, nous avons montré que l'EHS et la MCS partagent des symptômes cliniques identiques et peuvent coexister sous la forme d'un syndrome neurologique commun unique lié à la sensibilité dans 25% des cas^{7,10}. Dans cette tentative, nous nous avons montré que l'EHS et la MCS ainsi que le syndrome combiné EHS/MCS pouvaient être caractérisés

dans le sang périphérique par une diminution des valeurs de niveau de vitamine D et une augmentation des valeurs de niveau de protéine réactive C à haute sensibilité (CRP-us) et d'immunoglobuline E (IgE), et plus caractéristiquement, par des valeurs accrues d'histamine, de protéine S100B, de protéine de choc thermique (HSP) 27 et/ou 70, de nitrotyrosine (NTT) et d'autoanticorps anti-myéline P0, alors que ces troubles pourraient également être caractérisés par une diminution du sulfate de 6-hydroxymélatonine (6-OHMS) dans les urines de 24 heures.

Dans cette étude, nous aimerions (1) réévaluer de manière critique les résultats obtenus précédemment en enquêtant sur davantage de patients ; (2) comparer les résultats obtenus chez les patients EHS avec ceux obtenus chez les patients atteints de MCS ou du syndrome combiné ; (3) discuter si les biomolécules étudiées précédemment utilisées comme indicateurs pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour un diagnostic objectif et le suivi des patients ; (4) et enfin, estimer comment ces biomarqueurs pourraient fournir un aperçu des mécanismes étiopathogéniques impliqués dans les deux troubles neurologiques liés à la sensibilité.

2. Matériels et méthodes

Dans cette étude, nous avons utilisé une cohorte dans laquelle les patients atteints d'EHS, de MCS ou des deux troubles ont été divisés en trois groupes respectivement en fonction de leur présentation clinique. Pour ces différents groupes, nous avons mesuré comme indiqué précédemment les indicateurs moléculaires répertoriés dans le tableau¹.

2.1. RECRUTEMENT DES PATIENTS

Les patients n'ont pas été activement recrutés. Ce recrutement est due au fait qu'il n'existe pas encore en France de médecins spécialisés dans la prise en charge des patients EHS et MCS. Tous les patients ont ainsi été spontanément orientés vers l'un de nous (DB) en suivant leurs propres informations. Étant donné que tous les patients ont été informés par les organisations caritatives de patients EHS et MCS que nous avons pris en charge médicalement les deux troubles et que tous les cas consécutifs ont été inclus dans l'étude, nous pensons raisonnablement que l'accumulation n'a pas souffert de biais de sélection.

2.2. CRITÈRES D'INCLUSION

Puisqu'il n'existe pas encore de caractérisation biologique publiée de l'EHS et du MCS montrant que ces troubles peuvent être définis par des critères biologiques, les critères d'inclusion pour le MCS étaient ceux internationalement reconnus par la réunion de consensus d'Atlanta en 1999⁴ qui reposaient sur le fait que les patients déclaraient être cliniquement intolérants à une faible exposition de produits chimiques exogènes (c'est-à-dire à une exposition inférieure à celle normalement tolérée).

Les critères d'inclusion pour les patients EHS étaient ceux proposés par l'OMS¹¹. Ils étaient similaires à ceux recommandés par la réunion de consensus d'Atlanta de 1999 pour le MCS, adaptés à l'EHS⁷. Ils concernent la reproductibilité de l'apparition des symptômes comme dans le MCS sous une exposition inférieure à celle normalement tolérée aux sources présumées de CEM, telles que les téléphones portables, la fidélité sans fil (WiFi), les lignes puissantes, les compteurs intelligents, etc⁸. Elles concernent également la régression ou la disparition des symptômes lorsque les incitants présumés ont été supprimés.

En plus de ces critères cliniques fournis par les patients interrogés, une attention particulière a été portée à l'absence de pathologies préexistantes et/ou coexistantes connues pouvant expliquer les symptômes cliniques observés tels que l'athérosclérose, le diabète, les maladies neurodégénératives ou psychiatriques, ce qui rendrait l'interprétation de données biologiques difficiles. Cela était particulièrement vrai pour la maladie d'Alzheimer, qui aurait été causée par une exposition aux CEM.^{12,13}. Pour cela, nous avons utilisé des tests standards adaptés pour éviter ces pathologies (section 2.4)

Nous soulignons que nos critères d'inclusion et la description symptomatique des cas n'étaient pas uniquement basés sur les affirmations subjectives des patients, mais sur une analyse clinique minutieuse de l'anamnèse médicale, un interrogatoire systématique en face-à-face et sur un examen physique des patients, pour éviter des pathologies non associées et rendre le diagnostic d'EHS et/ou de MCS aussi clair que possible.

2.3. INCLUSION DES PATIENTS

Cette étude est issue d'une analyse des patients enregistrés dans la base de données que nous avons constituée et entretenue prospectivement depuis 2009 en France et qui contient aujourd'hui plus de deux mille cas d'EHS et/ou de MCS. Il semble qu'il s'agisse de la série de patients de ce type la plus importante au monde. Cette base de données a été transmise au Comité français de protection des personnes sous le numéro d'enregistrement 2017-A02706-47, et est également enregistrée dans la base de données européenne des essais cliniques (EudraCT), sous le numéro d'enregistrement 2018-001056-36.

Tous les patients inclus ont donné leur consentement éclairé pour une enquête de recherche clinique et biologique et ont été enregistrés de manière anonyme. Pour l'inscription, comme indiqué ci-dessus, nous n'avons pas utilisé le téléphone, des entretiens ou des enquêtes par questionnaire sur Internet, mais plutôt des entretiens en face-à-face et des examens médicaux, une méthode qui minimise les biais subjectifs dépendants du patient ou les analyses imprécises. Cette présente étude est basée sur l'analyse de 2 070 cas enregistrés de 2009 à 2021, parmi lesquels 2 018 cas sont évaluable pour la détermination de l'association EHS avec MCS. Il s'agissait de 1 428 cas d'EHS, 85 de MCS et 505 (25%) de syndrome combiné. Les changements biologiques chez les patients atteints de ce syndrome combiné ont été comparés à ceux porteurs de MCS ou d'EHS. Les patients ont également été comparés à un groupe témoin de sujets apparemment sains.

2.4. TESTS EN LABORATOIRE

L'analyse de toutes les biomolécules utilisées comme indicateurs a été réalisée dans un seul laboratoire à Paris, en France. Dans la plupart des cas, les prélèvements ont été effectués avant le traitement du patient. Les valeurs limites normales de référence en laboratoire ont été vérifiées en effectuant les analyses sur un groupe de sujets normaux sans EHS ni MCS. Ce groupe de volontaires sains apparemment normaux a été utilisé comme groupe témoin (section 3.1).

Tous les patients enregistrés ont d'abord été examinés avec des tests de laboratoire hématologiques, métaboliques, hépatiques et rénaux standard, afin d'éliminer les pathologies non liées. Ensuite, des analyses de sang périphérique et d'urine plus caractéristiques ont été effectuées. Ils sont répertoriés dans le tableau 1. Chaque test a été effectué selon la méthode recommandée par le fabricant. La CRP-us, les vitamines D2-D3 et les IgE ont été mesurées à l'aide d'un test immunologique automatisé classique [Architect Ci 4100 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Chicago, IL, USA)] ; tandis que pour l'histamine, nous avons utilisé un test spécifique ELISA (IBL International GmbH, Hambourg, Allemagne) ; pour la protéine S100B, des tests immunologiques chimioluminescents automatisés quantitatifs [Liason S100 (DiaSorin Deutschland GmbH, Dietzenbach, Allemagne)] ; pour la NTT, un test ELISA compétitif (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) ; pour la détection des autoanticorps anti-myéline P0, une analyse qualitative par Western Blot (IMMCO Diagnostics, Buffalo, NY, USA) ; pour les protéines chaperones HSP 27 et HSP 70, des tests immunologiques enzymatiques spécifiques à haute sensibilité (Stressgen Biotechnologies Corporation, San Diego, CA, USA) ; et pour la mesure du 6-OHMS dans l'urine, un test ELISA (IBL International GmbH, Hambourg, Allemagne).

Le tableau 1 indique les différentes biomolécules étudiées, les méthodes de leur mesure et les valeurs normales de référence utilisées par le laboratoire, auquel appartenait notre groupe témoin d'individus en bonne santé.

Tableau 1. Tests utilisés en routine pour la mesure des biomolécules étudiées. Méthodes de mesure et plage normale.

Biomarqueur	Auteur, année	Échantillon type	Valeurs normales de référence	Valeurs de contrôle +/- SE*
Inflammation de bas grade				
Protéine C réactive ultrasensible (CRP-us)	Pearson et coll., 2003 ¹⁴	Sérum	≤ 3mg/l	0,57 +/-0,04
Vitamine D2-D3	Belsey, Deluca et Potts 1971 ¹⁵	Sérum	≥ 30ng/ml	31,58+/-0,96
Histamine	Lebel et coll., 1996 ¹⁶	Plasma	≤ 10 nM	4,96+/-0,03
IgE	Dessaint et coll., 1975 ¹⁷	Sérum	≤ 100 U/ml	46,32+/-3,75
Protéine de choc thermique 27 (HSP27)	De et Roach, 2004 ¹⁸	Sérum	≤ 5ng/ml	1,99+/-0,08
Protéine de choc thermique 70 (HSP70)	Pockley, Berger et Corton 1998 ¹⁹	Sérum	≤ 5ng/ml	2,43+/-0,09
Perturbation/ouverture de la barrière hémato-encéphalique				
Nitrotyrosine (NTT)	Ischiropoulos et coll., 1992 ²⁰	Sérum	≥ 0,6 µg/l et ≤ 0,9 µg/ml	0,73+/-0,01
Protéine S100B	Smit, Korsé et Bonfrer. 2005 ²¹	Sérum	≤ 0,105 µg/l	0,06+/-0,01
Réponse auto-immune				
Anti-myéline P0 protéine autoanticorps	Arnold, Pfaltz et Altermatt. 1985 ²²	Plasma	Négatif	Négatif
Métabolites de la mélatonine				
Hydroxy-mélatonine-sulfate (6- OHMS)	Nanninga, Schumacher, et Leidenberger. 1989 ²³	Urine	≥ 5 ng/l et ≤ 40	33,96 +/-1,93

*Ces valeurs normales de référence correspondent à celles utilisées dans cette étude. Elles ont été fournies par le laboratoire dans lequel les tests biologiques ont été effectués. Les valeurs normales de référence étaient celles provenant des fabricants des tests (section 2.4) qui ont été confirmées par l'analyse d'un groupe témoin normal (section 3.1).

** Valeurs avec erreur standard obtenues à partir de 80 sujets normaux.

2.5. CHOIX DES BIOMOLÉCULES UTILISÉES COMME INDICATEURS PATHOLOGIQUES

Notre recherche de biomolécules utilisées comme indicateurs pour la caractérisation de l'EHS et/ou du MCS et leur justification scientifique a été rapportée précédemment^{7,10}. Nous avons recherché les changements biologiques provoqués chez les humains par des lésions cérébrales et chez les animaux par des radiations artificielles ou des produits chimiques exogènes ; nous avons ensuite choisi plusieurs biomolécules qui pourraient être qualifiées de biomarqueurs, comme définis par le consensus scientifique international^{24,25} (rubrique 4.2).

En résumé, nous avons mesuré régulièrement la CRP-us, et le sécostéroïde 25 hydroxy-vitamine D, car il a été suggéré que le niveau élevé de CRP-us et les faibles niveaux de vitamine D dans le sang périphérique des patients sont associés à des processus inflammatoires et/ou auto-immuns²⁶. Car lors d'une lésion cérébrale, la réponse inflammatoire peut déclencher une dégranulation des mastocytes, entraînant une libération massive d'histamine dans le sang²⁷⁻²⁸, nous avons également mesuré les taux d'histamine dans le sang périphérique des patients.

En outre, comme le mécanisme de dégranulation des mastocytes le mieux connu peut impliquer la liaison croisée de l'IgE à son récepteur de surface cellulaire spécifique de haute affinité²⁹, nous avons également mesuré les taux d'IgE totaux dans le sang périphérique.

De plus, étant donné que l'histamine est capable d'augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) via le stress nitroso-oxydatif (NOS)³⁰⁻³¹, nous avons recherché d'éventuels indicateurs liés au NOS qui pourraient être impliqués dans la perturbation/ l'ouverture du BHE. Nous avons identifié le NTT, car il résulte des effets toxiques du peroxy-nitrite (ONOO-) sur les protéines, et est considéré comme un indicateur de perturbation/ouverture de la BHE³²⁻³⁵. De plus, nous avons pris en compte la protéine S100B liant le calcium, produite et libérée principalement par les astrocytes périvasculaires, car il a été démontré que l'augmentation de cette biomolécule dans le sang périphérique est associée à une perturbation/ouverture de la BHE³⁶⁻³⁸, bien qu'il ne soit pas spécifique et ne dépende probablement pas de NOS.

Nous avons également considéré que les expositions non thermiques aux CEM pourraient induire un stress cellulaire répétitif, conduisant à une surexpression et à une libération continue de HSP dans les tissus exposés, en particulier dans le cerveau³⁹⁻⁴³.

Il est bien connu que dans des conditions de stress cellulaire lié à l'inflammation, la surexpression de HSP favorise une réponse anti-inflammatoire⁴⁴⁻⁴⁶. Nous avons donc émis l'hypothèse que la principale protéine de stress inductible HSP70, qui s'oppose à l'apoptose neuronale⁴⁷⁻⁴⁸ et perturbation/ ouverture BHE^{47,49}, pourrait être impliqué, ainsi que la protéine de stress anti-inflammatoire HSP2750. Nous avons donc systématiquement mesuré les niveaux de HSP70 et HSP27 dans le sang périphérique des patients afin de déterminer si ces protéines chaperonnes pouvaient être associées à une inflammation de bas grade, comme cela a été mis en évidence dans des expériences utilisant une exposition non thermique aux CEM^{39-42,51}. De plus, au cours du NOS, les protéines peuvent être largement modifiées et dénaturées, acquérant de nouveaux épitopes pouvant entraîner une perte de spécificité et d'activité biologique, donc dans la synthèse des autoanticorps⁵²⁻⁵³. Nous avons donc émis l'hypothèse que sous l'exposition à des facteurs de stress environnementaux, des protéines telles que la protéine myéline zéro (myéline P0) – la protéine la plus abondante dans le système nerveux – pourraient être dénaturées à un tel degré qu'elles acquerraient des propriétés auto-antigéniques. Nous avons ainsi systématiquement recherché la présence d'auto-anticorps contre la myéline P0 dans le sang des patients.

Enfin, comme indiqué précédemment^{7,10} étant donné que de nombreux patients EHS et/ou MCS présentaient des troubles du sommeil, et que ces effets seraient associés à l'exposition aux CEM et médiés par l'hormone pinéale, la mélatonine⁵⁴, nous avons systématiquement mesuré le métabolite dérivé de la mélatonine sulfate de 6-hydroxymélatonine (6-OHMS) dans les urines de 24 heures des patients⁵⁵. Nous avons également calculé le rapport 6-OHMS/créatinine dans la collecte d'urine de 24 heures, afin de réduire la variabilité de la mesure du 6-OHMS attribuée à la dilution de l'urine.

2.6. NEUROTRANSMETTEURS CÉRÉBRAUX URINAIRES ET IMAGERIE CÉRÉBRALE

Dans un nombre limité de cas, nous avons également recherché des neurotransmetteurs cérébraux dans les urines^{8,10}. Cela a été particulièrement vrai dans les cas d'EHS sans changement moléculaire détecté par les tests de routine. Dans de tels cas ainsi que dans d'autres, nous avons utilisé des techniques d'imagerie cérébrale pour poser ou confirmer le diagnostic d'EHS et/ou de MCS, comme nous et d'autres l'avons rapporté dans des études précédentes^{8,56-57}. Pour cela, nous avons utilisé la tomosphygmographie cérébrale ultrasonore (TSCU), l'échographie Doppler transcrânienne (DTC), l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle cérébrale et/ou la tomographie par émission de positons (données non présentées).

Comme souligné précédemment, ces examens d'imagerie ont été systématiquement réalisés en cas de résultats négatifs des biomarqueurs de routine et soigneusement interprétés.

2.7. ANALYSES STATISTIQUES

Quatre tests statistiques différents ont été utilisés : i) le test t de Student bilatéral, pour la comparaison entre les valeurs des patients ; ii) le test du chi carré pour analyser différentes distributions de fréquences ; iii) le test de corrélation de Pearson pour rechercher une corrélation entre deux variables quantitatives ; et iv) le test de Kruskal – Wallis pour évaluer si les échantillons proviennent de la même distribution. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (XLSTAT 2018.1.49725 ; Addinsoft^{https://www.xlstat.com}).

Compte tenu du fait que le test bilatéral de Student a été utilisé pour effectuer deux comparaisons (patients MCS versus patients EHS et patients EHS/ MCS versus patients EHS), la correction de Bonferroni a été appliquée, ce qui fixe le seuil de signification α à 0,05/2, soit 0,025. En revanche, l'analyse statistique utilisant le test du chi carré a utilisé une valeur seuil de $\alpha = 0,05$.

3. Résultats

3.1. TESTS BIOMOLÉCULAIRES DE ROUTINE UTILISÉS CHEZ DES SUJETS SAINS

Les 10 biomarqueurs sélectionnés par notre approche initiale ont été testés chez 80 sujets apparemment normaux pour tester la validité des valeurs limites normales de référence utilisées par le laboratoire dans lequel tous les échantillons ont été analysés. Tous les sujets inclus dans cette étude témoin ne présentaient aucun symptôme clinique d'EHS et/ou de MCS et un TSCU normal. Globalement, nous avons confirmé la validité des valeurs normales de référence utilisées par ce laboratoire. Le tableau 1 résume les valeurs limites normales de référence recommandées par le laboratoire qui ont été validées par l'analyse de notre groupe témoin.

3.2. MESURE DE BIOMOLÉCULES CHEZ LES PATIENTS EHS ET/OU MCS

Nous avons régulièrement utilisé les 10 biomolécules différentes du sang périphérique et de l'urine répertoriées dans le tableau 1.

3.2.1. Inflammation de bas grade

Une augmentation des taux de CRP-us a été constatée dans environ 15% des cas au total, plus précisément dans 14,9%, 15% et 15,7%, respectivement, des groupes EHS, MCS et EHS/MCS, sans différence significative (Tableau 2).

Tableau 2. Fréquence de l'inflammation présumée de bas grade mesurée dans le sang périphérique des patients atteints d'EHS et/ou de MCS, comme indiqué par les protéines chaperonnes CRP-us, histamine, IgE et HSP.

Biomolécules Valeurs normales	Cas évaluable au-dessus de la normale						p*	p**	p***
	EHS		MCS		EHS/MCS				
	Rapport	%	Rapport	%	Rapport	%			
CRP-us < 3mg/l	185/1245	14.9	12/80	15	67/441	15.7	0,99	0,93	1
Histamine < 10 nmol/l	455/1332	34.2	21/80	26.25	122/481b	25.4	0,18	0,0004	0,97
IgE < 100 U/ml	255/1278	20	14/80	17.5	102/456	22.4	0,69	0,30	0,41
HSP70 < 5 ng/ml	131/821	16	7/57	12.3	52/350	14.9	0,58	0,69	0,76
PSH 27 < 5 ng/ml	159/780	20.4	8/56	14.3	61/331	18.4	0,35	0,51	0,57
HSP27 et/ou HSP70	205/776	26.42	12/56	21.4	54/313	17.25	0,51	0,001	0,57

Nous avons utilisé le test du Chi carré de Pearson pour comparer les distributions.

*Comparaison entre les groupes EHS et MCS. **Comparaison entre les groupes EHS et EHS/MCS.

***Comparaison entre l'EHS/MCS et le MCS.

Ces augmentations des valeurs moyennes de CRP-us ne différaient pas significativement entre les trois groupes de patients (Tableau 3). Nous avons donc systématiquement recherché des causes non liées d'inflammation/infection chez ces patients, et n'en avons trouvé aucune. De plus, la CRP-us étant considérée comme un biomarqueur du déclin cognitif ou de la démence liée à l'âge, et plus particulièrement de la maladie d'Alzheimer⁵⁸⁻⁵⁹, nous avons systématiquement recherché la maladie d'Alzheimer chez ces patients.

Dans trois cas, la maladie d'Alzheimer a été découverte lors du suivi des patients. Cela peut être dû à une exposition antérieure excessive aux champs électromagnétiques¹²⁻¹³, mais il n'a pas été prouvé que cela était spécifiquement lié à l'EHS. Nous avons donc considéré ces trois cas comme des cas non évaluable. Nos données suggèrent donc que dans chacun des différents groupes, un nombre limité de patients peuvent présenter un certain type d'inflammation systémique.

Tableau 3. Valeurs de niveau moyen de biomolécules de bas grade liées à l'inflammation dans le sang périphérique de patients atteints d'EHS et/ou de MCS.

Biomarqueur Normal Valeurs	EHS Moyenne ± SE	MCS Moyenne ± SE	EHS/MCS Moyenne ± SE	p*	p**	p***
CRP-us < 3mg/l	8,48+/-0,92	5,66+/-0,33	9,10+/-1,41	0,44	0,72	0,31
Histamine < 10 nmol/l	24,49+/-1,04	18,87+/-2,29	20,83+/-1,49	0,25	0,09	0,59
IgE < 100 U/ml	416,13+/- 31,95	304,64+/- 97,49	312,99+/-26,31	0,42	0,06	0,91
HSP70 < 5 ng/ml	8,11+/-0,23	6,93+/-0,36	7,88+/-1,19	0,24	0,63	0,09
PSH 27 < 5 ng/ml	7,65+/-0,18	7,26+/-0,22	7,21+/-0,16	0,64	0,23	0,91

SE : erreur type. p : probabilité que la différence soit due à une variation aléatoire.

*Comparaison entre les groupes de patients EHS et MCS pour les valeurs de niveau moyen en utilisant la méthode bilatérale test t ($\alpha = 0,025$).

Comparaison entre les groupes de patients EHS et EHS/MCS pour les valeurs de niveau moyen à l'aide du test t bilatéral ($\alpha = 0,025$). *Comparaison entre les groupes de patients EHS/MCS et MCS pour les valeurs de niveau moyen à l'aide du test t bilatéral ($\alpha = 0,025$).

Nous avons également constaté une diminution du taux de vitamine D dans le sang périphérique d'une majorité de patients. Les tableaux 4 et 5 présentent les résultats que nous avons obtenus pour la vitamine D.

Comme indiqué dans le tableau 4, les valeurs moyennes des niveaux de vitamine D ont diminué dans tous les groupes de patients sans différence significative.

Tableau 4. Niveaux moyens de vitamine D dans le sang périphérique des patients atteints d'EHS et/ou de MCS.

Valeurs normales	EHS Moyenne ± SE	MCS Moyenne ± SE	EHS/MCS Moyenne ± SE	p*	p**	p***
Vitamine D >30 ng/ml	20,22+/-0,22	18,95+/-0,86	19,88+/-0,39	0,14	0,44	0,32

SE : erreur type. p : probabilité que la différence soit due à une variation aléatoire.

*Comparaison entre les groupes de patients EHS et MCS pour les valeurs de niveau moyen en utilisant la méthode bilatérale test t ($\alpha = 0,025$).

Comparaison entre les groupes de patients EHS et EHS/MCS pour les valeurs de niveau moyen à l'aide du test t bilatéral ($\alpha = 0,025$). *Comparaison entre les groupes de patients EHS/MCS et MCS pour les valeurs de niveau moyen à l'aide du test t bilatéral ($\alpha = 0,025$).

Cependant, comme indiqué dans le tableau 5, cette diminution des taux de vitamine D a été constatée dans environ 66 %, 82 % et 62 % des cas respectivement dans les groupes EHS, MCS et combinés, avec un nombre significativement plus élevé de patients présentant une diminution du niveau de vitamine D et les groupes

combinés pour lesquels nous n'avons trouvé aucune différence significative. Cela suggère que l'exposition aux produits chimiques induit une carence en vitamine D plus fréquente que l'exposition aux CEM.

Tableau 5. Fréquence des valeurs anormales des taux de vitamine D dans le sang périphérique des patients atteints d'EHS et/ou de MCS.

	Cas évaluable en dessous de la normale						p*	p**	p***
	EHS		MCS		EHS/MCS				
	Rapport	%	Rapport	%	Rapport	%			
Vitamine D > 30ng/ml	858/1293	66.36	61/74	82.43	291/467	62.30	0,006	0,13	0,001

Nous avons utilisé le test du Chi carré de Pearson pour comparer les distributions.

*Comparaison entre les groupes EHS et MCS. **Comparaison entre les groupes EHS et EHS/MCS.

***Comparaison entre l'EHS/MCS et le MCS.

Une augmentation du niveau d'IgE circulantes a été détectée respectivement dans 20%, 17,5% et 22,4% des groupes EHS, MCS et MCS/EHS, sans différence statistiquement significative entre les trois groupes (Tableau 2). Pour les IgE, les valeurs moyennes augmentées n'étaient pas significativement différentes entre les trois groupes étudiés (Tableau 3). Ceci n'était pas associé à la coexistence d'allergies non liées. Étant donné que la libération d'histamine par les mastocytes implique la forte affinité des IgE avec son récepteur membranaire situé à la surface des mastocytes^{29,60}, nous avons recherché une corrélation entre les taux d'histamine et d'IgE dans le sang périphérique des patients. Cependant, une telle corrélation n'a pas été trouvée.

Un résultat majeur de notre étude est que l'histamine dans le sang périphérique s'est avérée globalement augmentée dans 32% des cas, soit chez 25 à 34% des patients, selon le groupe étudié, ce qui signifie que cette anomalie pathologique concernait tous les groupes de patients. Ceci a été confirmé en démontrant que pour les patients présentant de telles valeurs accrues, les valeurs moyennes accrues du taux sanguin périphérique ne différaient pas de manière significative entre les 3 groupes (Tableau 3). Cependant, nous avons constaté un nombre significativement plus élevé de patients présentant des taux d'histamine élevés dans le groupe EHS que dans le groupe combiné, tandis que la fréquence des patients présentant des taux d'histamine accrues dans le groupe MCS a tendance à être moins fréquente que dans le groupe EHS, mais sans différence significative.

Comme indiqué dans le tableau 2, selon le groupe considéré, des taux accrus de protéines chaperons HSP70 et HSP27 ont été détectés dans le sang périphérique dans 12 à 16% et 14 à 20% des cas respectivement, sans différence significative de fréquence entre les 3 groupes. Cependant, collectivement, soit pour les 17 à 26 % de patients présentant des taux accrus de HSP70 et/ou de HSP27, il y avait un nombre significativement plus élevé de patients présentant l'une ou les deux protéines chaperons accrues dans le groupe EHS que dans le groupe syndrome combiné, mais il n'y avait pas de différence significative entre le groupe MCS et le groupe EHS, ni entre le groupe MCS et le groupe syndrome combiné (Tableau 2). Pour les patients présentant une augmentation de HSP70 ou de HSP27, les valeurs moyennes augmentées n'étaient pas différentes entre les trois groupes (Tableau 3). Par conséquent, ces données qui montrent que l'inflammation de bas niveau liée à l'histamine est plus fréquente dans le groupe de patients EHS que dans le groupe EHS/MCS indiquent que l'EHS est associée à une réponse anti-inflammatoire liée à HSP70-27 plus fréquente, alors que cette réponse est moins fréquente dans les groupes de patients MCS et combinés, qui ne montrent pas de différence de fréquence entre ces deux derniers groupes.

3.2.2. Perturbation/ouverture de la barrière hémato-encéphalique

Comme souligné ci-dessus, il a été démontré que les protéines S100B et NTT sont probablement des indicateurs de perturbation/ouverture de la BHE³²⁻³⁷. Notre objectif était de rechercher une corrélation statistique entre la protéine S100B et le NTT dans 1 487 cas évaluable. Nous avons utilisé le test de corrélation de Pearson et avons constaté que les protéines S100B et NTT étaient faiblement mais néanmoins positivement corrélées (valeur de p : $6,55 \times 10^{-22}$ et ρ : 0,2459).

Comme indiqué dans le tableau 6, les taux de protéine circulante S100B ont été globalement augmentés dans 25% des cas étudiés, soit chez 23,2 à 26,9% des patients, sans différence significative entre les trois groupes. De même, une augmentation des taux sanguins de NTT libres ou protéiques combinés a été constatée chez environ 26% de tous les patients étudiés, soit globalement dans 25,6 à 27,7% des cas, sans différence statistique entre les trois groupes.

De plus, le tableau 7 indique que pour le NTT et la protéine S100B, nous n'avons trouvé aucune différence significative dans les valeurs moyennes entre les trois groupes.

Tableau 6. Fréquence des valeurs anormales de S100B et NTT dans le sang périphérique des patients EHS et/ ou MCS.

Valeurs normales	Cas évaluable au-dessus de la normale						p*	p**	p***
	EHS		MCS		EHS/MCS				
	Rapport	%	Rapport	%	Rapport	%			
S100B < 0,105 µg/l	318/1370	23.2	22/83	26,5	131/487	26,9	0,58	0,12	0,99
NTT >0,3 et <0,9µg/ml	270/1034	26.1	18/65	27,7	117/458	25.6	0,89	0,86	0,82
Augmentation du NTT et/ou S100B	354/923	38.3	24/49	49	169/405	41,7	0,18	0,27	0,41

Nous avons utilisé le test du Chi carré de Pearson pour comparer les distributions.

*Comparaison entre les groupes EHS et MCS. **Comparaison entre les groupes EHS et EHS/MCS.

***Comparaison entre l'EHS/MCS et le MCS.

Tableau 7. Valeurs moyennes des niveaux de S100B et de NTT dans le sang périphérique des patients EHS et/ou MCS.

Valeurs normales	EHS Moyenne ± SE	MCS Moyenne ± SE	EHS/MCS Moyenne ± SE	p*	p**	p***
S100B < 0,105 µg/l	0,20+/-0,02	0,20+/-0,03	0,22+/-0,03	0,94	0,55	0,75
NTT > 0,3 et < 0,9 µg/ml	1,44+/-0,07	1,30+/-0,12	1,32+/-0,04	0,63	0,31	0,85

SE : erreur type. p : probabilité que la différence soit due à une variation aléatoire.

*Comparaison entre les groupes EHS et MCS pour les valeurs de niveau moyen par le test t bilatéral ($\alpha = 0,025$). **Comparaison entre les groupes EHS et EHS/MCS pour les valeurs de niveau moyen par le test bilatéral ($\alpha = 0,025$). ***Comparaison entre les groupes EHS/MCS et MCS pour les valeurs de niveau moyen par le test t bilatéral ($\alpha = 0,025$).

Enfin, il apparaît que des augmentations des taux de protéine S100B et/ou NTT peuvent être détectées dans 38 à 49 % des cas, sans différence significative entre les trois groupes, lorsque l'un ou l'autre ou les deux indicateurs sont mesurés (Tableau 6). Ceci confirme notre précédente publication ayant montré qu'en plus de l'augmentation des taux d'histamine, l'augmentation des taux de ces deux biomolécules peut refléter un changement majeur dans le sang périphérique des patients atteints d'EHS et/ou de MCS⁷. Puisque, comme indiqué ci-dessus, les protéines S100B et NTT sont potentiellement des indicateurs de perturbation/ouverture de la BHE, nous considérons qu'une telle perméabilité à la BHE peut être détectée dans 40 à 50 % des cas, quelle que soit la présentation étiopathogénique de l'EHS et/ou du MCS.

3.2.3. Réponse auto-immune anti-myéline P0

Comme indiqué dans le tableau 8, nous avons détecté des auto-anticorps contre la myéline P0 chez 14% à près de 17% des patients, sans différence statistiquement significative entre les trois groupes étudiés, suggérant que, chez ces patients, l'EHS et/ou le MCS sont associés à un certain type de réponse auto-immune contre la myéline P0. De plus, il a été démontré que des processus auto-immuns peuvent résulter d'une exposition à long terme à des CEM d'origine humaine⁶¹.

Tableau 8. Nombre et pourcentages de patients EHS et/ou MCS avec un test positif pour la détection des auto-anticorps contre la protéine myéline P0.

	Cas évaluable au-dessus de la normale						p*	p**	p***
	EHS		MCS		EHS/MCS				
	Positif Rapport	Positif %	Positif Rapport	Positif %	Positif Rapport	Positif %			
Auto-anticorps contre la myéline P0 protéine (test qualitatif)	204/1204	17	10/77	13	66/446	14.8	0,37	0,29	0,68

Nous avons utilisé le test du Chi carré de Pearson pour comparer les distributions. *Comparaison entre les groupes EHS et MCS. **Comparaison entre les groupes EHS et EHS/MCS. *** Comparaison entre les groupes EHS/ MCS et MCS.

3.2.4. Production de sulfate de 6-hydroxymélatonine dans l'urine

La 6-OHMS et la créatinine ont été mesurées dans les échantillons d'urine de 24 heures chez tous les patients évaluable des trois groupes EHS, MCS et EHS/MCS. Dans l'ensemble, 86 à 92% ont présenté une diminution à la fois du rapport 6-OHMS et du rapport 6-OHMS/créatinine, sans différence statistiquement significative entre les trois groupes, suggérant que ces patients présentent une diminution des défenses antioxydantes liées à la mélatonine⁶²⁻⁶³, ainsi, ils peuvent être plus à risque de maladies chroniques associées à la NOS. Puisqu'il a été démontré qu'une diminution de la production de mélatonine est associée à des troubles du sommeil⁶⁴, cela peut expliquer pourquoi les patients EHS et/ou MCS peuvent également présenter des troubles du sommeil¹⁰. Cependant, dans environ 8 à 14% des cas, une augmentation des taux de 6-OHMS dans les urines, et par conséquent du rapport 6-OHMS/créatinine, a été observée dans les trois groupes de patients, sans différence significative. Nous n'avons actuellement aucune explication claire de cette augmentation de la production urinaire de 6-OHMS. Cela peut être dû à une surproduction inexplicite de CEM et/ou de mélatonine induite par des produits chimiques par la glande pinéale, et/ou à une augmentation conséquente de la consommation de mélatonine liée à la NOS.

3.2.5. Détection globale des changements biomoléculaires

La figure 1 résume les résultats globaux obtenus lors de l'utilisation en routine des biomolécules étudiées, dans les groupes EHS et MCS et dans les groupes de syndrome combiné. Dans cette analyse, nous n'avons pas pris en compte la CRP-us, la vitamine D et les IgE en raison de leur manque extrême de spécificité.

La figure 1 rapporte le pourcentage et le nombre de cas en fonction du nombre de sept biomolécules caractéristiques étudiées. Comme on pouvait s'y attendre, tous les changements anormaux n'ont pas été observés chez les patients, certains n'ayant détecté qu'un seul changement anormal, d'autres deux ou plus. Selon le test de Kruskal-Wallis avec $p=0,96$, la répartition est la même dans les trois groupes de patients considérés. Une majorité de cas présentaient un changement anormal du sang périphérique détecté, tandis que selon le groupe de patients considéré, 14 à 24% des cas n'avaient aucun niveau anormal de biomolécules détecté, ce qui signifie que dans de tels cas, la mesure de ces indicateurs de routine n'était pas suffisante pour caractériser biologiquement l'EHS et/ou le MCS.

3.2.6. Présentation symptomatique sans changement biomoléculaire anormal

L'investigation biochimique décrite ci-dessus a objectivement caractérisé l'EHS, le MCS et le syndrome combiné dans 76 à 86 % des cas (Fig. 1). Aucun symptôme clinique particulier n'a pu être identifié pour distinguer les 14 à 24% de cas non contributifs (c'est-à-dire les cas avec des valeurs normales de taux de biomolécules) des 76 à 86% de cas avec EHS et/ou MCS biologiquement caractérisés (données non présentées). Cependant, comme indiqué ci-dessus (section 2.6), des neurotransmetteurs cérébraux mesurés dans les urines et l'imagerie cérébrale ont été utilisés, pour néanmoins permettre le diagnostic d'EHS et/ou de MCS dans de tels cas non contributifs⁸ (section 8 3.2.7. Tableau 9).

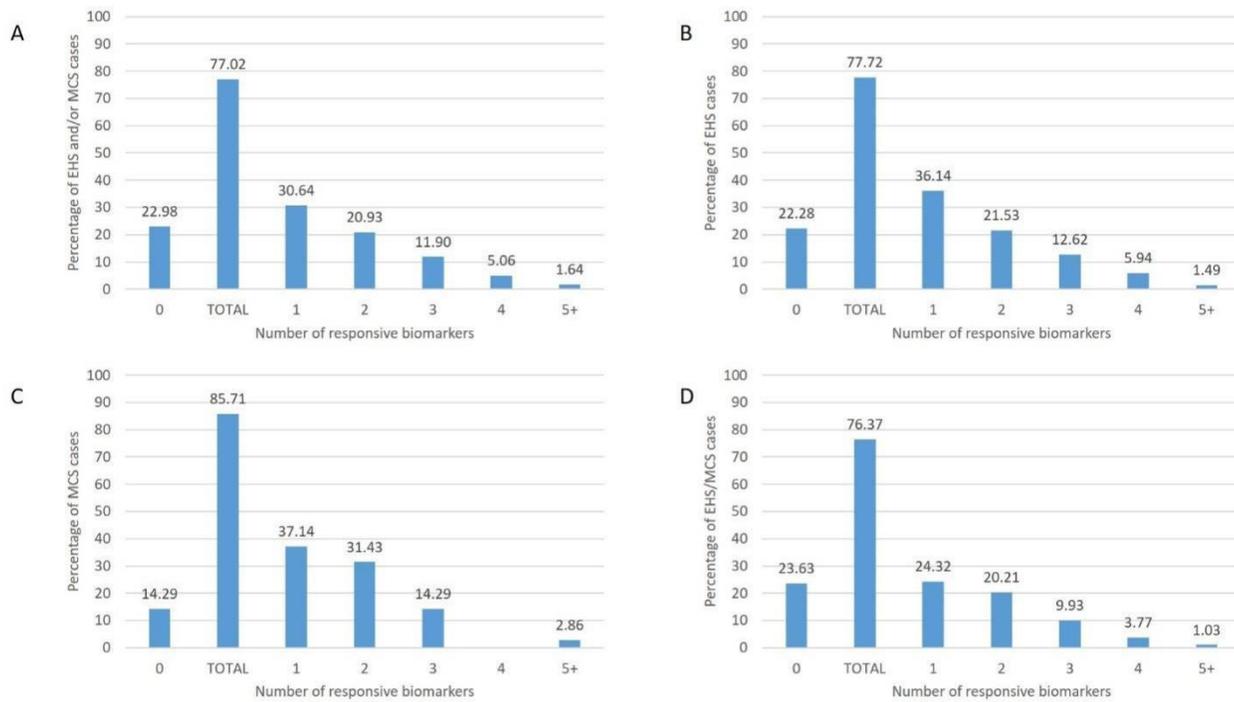


Figure 1. Pourcentages et nombres de patients EHS et/ou MCS (nombre total = 672) selon le nombre d'indicateurs détectés (dont histamine, 6-OHMS, HSP 27/70, autoanticorps contre la myéline P0, S100B et NTT) dans la population globale étudiée (A), dans le groupe EHS (B), dans le groupe MCS (C) et dans le groupe EHS/ MCS (D). La barre dite « total » correspond au pourcentage de patients présentant un ou plusieurs indicateurs détectables. La barre appelée 0 correspond au pourcentage de patients sans valeurs anormales détectables de biomolécules.

3.2.7. Détection urinaire des neurotransmetteurs

Le tableau 9 résume nos données. Nous avons montré pour la première fois que l'EHS est associée à des modifications des taux normaux de neurotransmetteurs cérébraux dans l'urine ; et que divers profils anormaux de neurotransmetteurs

peuvent exister parmi les patients, c'est-à-dire que les niveaux de neurotransmetteurs diffèrent d'un patient à l'autre, une découverte pour laquelle nous n'avons actuellement aucune explication claire, mais qui signifie globalement que l'EHS est un trouble cérébral⁸.

Tableau 9. Ratio et pourcentage de patients EHS présentant des niveaux altérés de divers neurotransmetteurs et de leurs métabolites dans l'urine⁸.

Neurotransmetteur	Patients	Pourcentage (%)
Diminution de 3-4 DOPAC	18/42	43
Augmentation de la dopamine	17/42	41
Diminution de l'adrénaline	12/42	28
Augmentation de la noradrénaline	11/42	26
Augmentation de l'adrénaline	8/42	19
Diminution de la sérotonine	5/42	12
Augmentation de la sérotonine	4/42	9.5

3-4 DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique.

4. Discussion

En utilisant les susmentionnés critères internationalement reconnus d'Atlanta pour la MCS et de même, les critères reconnus par l'OMS pour l'EHS, nous avons fourni pour la première fois une analyse biologique de l'EHS et/ou du MCS, et montrons que ces deux troubles peuvent être caractérisés objectivement par des anomalies biologiques identiques. Nous avons notamment montré que quelle que soit leur présentation étiopathogénique, l'EHS, le MCS et le syndrome combiné sont associés à une diminution de la production de 6-OHMS dans les urines de 24 heures dans 86 à 92 % des cas, alors que dans le sang périphérique il y a une augmentation de l'histamine et de l'HSP 27 et/ou 70 dans environ 30 % et 20 % respectivement, et une augmentation de la protéine S100B et/ou NTT dans environ 40 à 50 % des cas. Une augmentation de l'histamine et de l'HSP sont vraisemblablement des indicateurs d'une inflammation de faible niveau, tandis qu'une augmentation de la protéine S100B et du NTT sont vraisemblablement des indicateurs d'une perturbation/ouverture de la BHE. De plus, nous avons pu détecter des auto-anticorps antimyéline P0 dans 15 à 17% des cas, ce qui signifie que ces troubles sont également associés à une réponse auto-immune. Cela signifie que de tels indicateurs biomoléculaires du sang périphérique et de l'urine peuvent caractériser objectivement ces troubles.

Il y a trois points à discuter : Un point majeur est de savoir si les biomolécules que nous avons étudiées peuvent être considérées comme des biomarqueurs de maladies et peuvent donc aider à l'établissement de diagnostics, à l'évaluation du traitement et au suivi des patients. Deuxièmement, nous aimerions discuter de la manière dont nos données peuvent éclairer l'hypothèse d'un mécanisme étiopathogénique commun pour l'EHS et le MCS. Enfin, certaines limites de notre étude doivent être discutées.

4.1. LES BIOMOLÉCULES ÉTUDIÉES SONT-ELLES DES BIOMARQUEURS QUI PEUVENT AIDER AU DIAGNOSTIC ET AU SUIVI DU PATIENT ?

Une approche clinique symptomatique est nécessaire mais tout à fait insuffisante pour poser un diagnostic objectif de toute maladie, y compris l'EHS et/ou le MCS. L'identification et la mesure de biomarqueurs fiables constituent en effet une étape clinique préliminaire cruciale pour identifier et caractériser la maladie. Étonnamment, un tel objectif bioclinique n'avait pas été pris en compte auparavant dans l'établissement de critères de diagnostic permettant d'identifier l'EHS et/ou le MCS⁶⁵. Il est donc nécessaire d'utiliser des biomarqueurs et des techniques d'imagerie complémentaires adaptés, comme cela a été récemment confirmé dans le rapport de consensus scientifique multinational sur l'EHS et le MCS que nous avons récemment lancé⁶⁶.

Dans notre étude, nous avons constaté que les tests sanguins standards habituels chez les patients EHS et/ou MCS étaient généralement normaux, à l'exception de dysfonctionnements biologiques non spécifiques de la thyroïde et du foie dans plusieurs cas⁶⁷.

Ces dernières pourraient être associées de manière causale à l'exposition aux CEM ou à d'autres causes, plutôt qu'être des caractéristiques biologiques de l'EHS ou du MCS (données non présentées). Nous avons donc recherché des biomolécules caractéristiques à partir de données expérimentales *in vitro* et *in vivo* précédemment rapportées, obtenues à partir d'études sur des animaux exposés à des champs électromagnétiques ou à des produits chimiques ou à partir de rapports cliniques humains (section 3.4), et avons choisi certaines molécules qui pourraient être mesurées de manière routinière et répétée pour une caractérisation appropriée des patients atteints d'EHS et / ou de MCS (Tableau 1).

En effet, le choix des biomolécules utilisées dans notre étude et leur rôle comme biomarqueurs méritent discussion. Les biomarqueurs destinés à la pratique clinique et à la recherche ont été définis par le groupe de travail sur la définition des biomarqueurs du National Institute of Health (NIH) des États-Unis²⁴, et plus récemment par le groupe de travail sur les biomarqueurs de la Food and Drug Administration (FDA)-NIH²⁵, en tant qu'indicateurs objectivement mesurables pouvant être utilisés de manière systématique et répétée pour évaluer la présentation et l'évolution de la maladie. Chez les patients pour lesquels ils peuvent être mis en évidence, les biomarqueurs peuvent aider non seulement à établir un diagnostic objectif des maladies, mais également à fournir une évaluation des interventions thérapeutiques et un suivi des patients¹⁰.

Il existe en effet trois arguments justifiant que les biomolécules que nous avons étudiées puissent être considérées comme des biomarqueurs. Premièrement, comme indiqué dans cette étude, nous avons observé que les modifications des niveaux de ces biomolécules étaient associées à la présentation clinique d'EHS et/ou de MCS dont nous avons précédemment montré qu'elles étaient similaires dans les trois groupes individualisés de patients, alors que les niveaux de ces biomolécules étaient normaux chez tous les individus en bonne santé que nous avons jusqu'à présent étudiés en tant que témoins. Deuxièmement, nous avons précédemment montré que chez les patients atteints d'EHS, les niveaux accrus d'histamine, de protéines S100B et de HSP27-70 étaient significativement corrélés à la réponse au traitement (utilisation de préparation de papaye fermentée)⁶⁸, c'est-à-dire qu'une normalisation des valeurs de niveau de ces biomolécules pourrait être obtenue lorsque l'on observerait la disparition de tous les symptômes cliniques (réponse complète), alors que l'augmentation des valeurs de ces biomolécules persistait, voire augmentait, en cas d'échec thérapeutique (réponse progressive ou stable). Troisièmement, nous avons pu diagnostiquer une rechute clinique dans les cas d'EHS et de syndrome combiné lors du suivi des patients principalement en utilisant des mesures répétitives de la protéine S100B, qui semble être le meilleur biomarqueur pour suivre de tels patients (données non présentées).

Il semble donc que l'utilisation médicale des biomarqueurs étudiés dans notre étude puisse contribuer à l'identification de l'EHS et/ou du MCS en tant que troubles, mais pas comme moyen d'établir leur origine causale, ni leurs propriétés associées à l'(hyper)sensibilité⁶⁹.

Ils peuvent cependant aider à diagnostiquer objectivement ces troubles et à suivre les patients. De plus, ils peuvent donner un aperçu de certains aspects de leur processus physiopathologique.

4.2. VERS UN PROCESSUS ÉTIOPATHOGÈNE COMMUN

Sur la base de cette étude biologique, incluant nos découvertes sur les neurotransmetteurs, nous confirmons que l'EHS et le MCS sont des troubles somatiques cérébraux objectifs^{7,8,70}. En effet, contrairement à d'autres rapports⁷¹⁻⁷², ces troubles ne peuvent être présumés d'origine purement psychologique ou psychiatrique, ni être considérés comme de vagues déficiences fonctionnelles indéfinies⁶⁹⁻⁷⁰. Au contraire, comme nous l'avons montré précédemment, ils peuvent être causés par une exposition aux champs électromagnétiques et/ou à des produits chimiques^{9,10}. Cela n'exclut cependant pas que des facteurs de risque tels que des traumatismes ou des maladies infectieuses puissent contribuer à déclencher la survenue de ces troubles⁷³, mais ces facteurs de risque ne doivent pas être confondus avec les CEM d'origine humaine et/ou les produits chimiques environnementaux comme causes principales directes ou avec les types d'intolérance associés à ces troubles.

Comme indiqué ci-dessus, nous montrons dans la présente étude que l'EHS et le MCS et leur combinaison sont caractérisés par des anomalies biologiques identiques, ce qui signifie que l'apparition des symptômes peut partager un mécanisme physiopathologique commun déclenché par l'exposition aux CEM et/ou aux produits chimiques environnementaux. Cette interprétation est confortée par notre observation de l'association EHS et MCS chez les mêmes patients dans le cadre d'un syndrome pathologique commun^{7,74}. Ainsi, non seulement l'EHS mais aussi le MCS devraient être étudiés cliniquement et biologiquement, afin d'identifier clairement l'EHS et d'éclairer le mécanisme physiopathologique commun présumé impliqué dans les deux troubles.

Une découverte majeure de notre étude est que l'histamine semble jouer un rôle critique à la fois dans les changements pathologiques induits par les CEM et/ou les produits chimiques, puisqu'elle est augmentée dans le sang périphérique d'environ 30 % des patients EHS et/ou MCS. Cette molécule joue un rôle physiopathologique essentiel en tant que neurotransmetteur dans le cerveau. Par exemple, il a été démontré que l'histamine neuronale est impliquée dans le cycle du sommeil, l'activité motrice, la plasticité synaptique et la mémoire^{27,75-78}. Comme nous l'avons montré précédemment^{9,10,79}, toutes ces fonctions se sont avérées affectées chez les patients EHS et/ou MCS. De plus, cette molécule n'est pas seulement un neurotransmetteur produit et libéré par le système nerveux central (SNC), mais également un médiateur inflammatoire produit et libéré par les mastocytes dans les troubles allergiques²⁷, et autrement dans les processus neuro-inflammatoires non allergiques²⁹.

Les mastocytes sont des régulateurs essentiels dans la pathogenèse des maladies du SNC⁸⁰⁻⁸¹, et les mastocytes cérébraux sont impliqués dans la perturbation/l'ouverture de la BHE et peuvent contribuer aux modifications cérébrales locales dues à la libération de médiateurs angiogéniques stockés dans leurs granules.

En utilisant les biomarqueurs S100B et NTT, nous avons montré la possibilité d'une perturbation/ouverture de la BHE chez environ 40 à 50% des patients, quels que soient les groupes de patients étudiés par l'EHS, le MCS et l'EHS/MCS combinés.

Il existe des preuves que les CEM anthropiques (c'est-à-dire d'origine humaine) peuvent perturber/ouvrir la BHE et, par conséquent, rendre le cerveau non protégé contre les substances toxiques pour le sang⁸²⁻⁸⁵. Cela a été particulièrement démontré expérimentalement chez des rats exposés à des CEM anthropiques⁸⁶⁻⁹⁰. De plus, en utilisant des techniques d'imagerie, nous avons déjà montré que l'EHS pouvait être associée à plusieurs modifications vasculaires cérébrales⁵⁷. La présente découverte confirme d'autres données précédemment rapportées montrant que la protéine S100B dérivée de la glie pourrait être non seulement un biomarqueur de l'ouverture/perturbation de la BHE, mais également un marqueur de lésions/dysfonctionnements cérébraux liés à l'hypoperfusion^{91,92}. Ceci n'est pas spécifique puisqu'il a été démontré qu'il survient particulièrement dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer⁹³ et sclérose latérale amyotrophique⁹⁴.

Sur la base de la présente étude et de notre étude précédente montrant que l'EHS est associée à la NOS dans 70 à 80 % des cas⁹⁵, nous proposons un modèle physiopathologique hypothétique dans lequel le rôle délétère présumé des CEM et/ou des produits chimiques sur le cerveau implique deux étapes principales : a) *une étape inflammatoire locale primaire liée à la NOS* (avec libération d'histamine et/ou de médiateurs angiogéniques par les mastocytes et/ou par d'autres cellules gliales réactives en prolifération) ; et B) *une étape secondaire d'amplification neuro-inflammatoire liée à la NOS*, avec perturbation/ouverture de la BHE et transmigration des cellules inflammatoires circulantes dans le cerveau.

4.3. LIMITES DE L'ÉTUDE

Il existe plusieurs limites à notre étude. Premièrement, nous n'avons pas corrélé la présentation biologique de ces troubles avec une mesure simultanée des CEM et/ou de l'exposition chimique. Cela a abouti à l'inclusion des patients dans les différents groupes sur la base de critères cliniques antérieurs reconnus au niveau international, mais pas sur des mesures objectives de l'intolérance spécifique aux facteurs de stress environnementaux.

De plus, bien que nous ayons interrogé et examiné physiquement tous les patients inclus, nous n'avons pas mesuré systématiquement les CEM et/ou l'exposition chimique des patients, nous n'avons donc pas été en mesure de mettre en évidence objectivement un quelconque changement biologique lié à une faible exposition aux CEM et/ou produits chimiques qui sont des propriétés caractéristiques de l'EHS et du MCS. Il convient de noter que ces deux limites de l'étude étaient dues à la pollution omniprésente et multiforme actuelle de notre environnement, qui rend tout à fait impossible toute mesure distincte des facteurs de stress environnementaux impliqués chez chaque patient.

De plus, quels que soient les trois groupes étudiés, en utilisant des tests de routine, nous n'avons pas pu détecter de changements biologiques anormaux dans 14 à 24% des cas, qui ne pouvaient cependant pas être distingués cliniquement des cas présentant des changements biologiques. Nous avons cependant prouvé que ces cas non contributifs étaient de véritables EHS et/ou MCS sur la base de leur tableau clinique similaire, de l'imagerie DTC et TSCU et de l'analyse urinaire des neurotransmetteurs. Nous n'avons actuellement aucune explication claire. Ils pourraient impliquer d'autres molécules inflammatoires libérées encore inconnues. De plus, les biomarqueurs que nous utilisons régulièrement (notamment l'histamine) peuvent ne pas être libérés dans le sang à partir des tissus où ils sont produits localement : ils peuvent être labiles, les rendant non détectables au moment du test.

À l'exception de la diminution de la production urinaire de 6-OHMS dans environ 90% des cas, tous les changements biomoléculaires que nous avons pu mesurer ont été détectés dans un nombre relativement limité de cas. Il faut donc considérer que ce n'est pas un seul biomarqueur en particulier qui doit être utilisé pour diagnostiquer objectivement ces troubles, mais plusieurs d'entre eux.

Enfin, nous aimerions discuter de la sensibilité, de la spécificité et de la reproductibilité des tests biochimiques que nous avons utilisés pour tous les biomarqueurs étudiés (Tableau 1). Concernant la spécificité, une considération majeure est que tous les biomarqueurs étudiés ne sont pas spécifiques, puisque par exemple, l'augmentation de l'histamine, des protéines S100B et NTT et des auto-anticorps anti-myéline P0 dans le sang périphérique, et la diminution de la production de 6-OHMS dans l'urine sont des changements biologiques observés dans de nombreuses maladies ou troubles neurodégénératifs chroniques⁹⁶⁻⁹⁷. Pour la sensibilité, comme indiqué sur la figure 1, l'utilisation de ces biomarqueurs n'a pas permis d'identifier et de caractériser les cas d'EHS et/ou de MCS dans 14 à 24% des cas. Pourtant, nous avons souligné l'utilité de l'analyse des neurotransmetteurs cérébraux et des techniques d'imagerie cérébrale pour diagnostiquer objectivement de tels cas non contributifs^{8,57}. Quant à la reproductibilité, ces tests biochimiques restent à reproduire par d'autres laboratoires, nos résultats étant fournis par un laboratoire de biologie unique à Paris (France). Globalement, il faut souligner que la sensibilité et la spécificité de la méthodologie utilisée devraient être améliorées par l'utilisation d'autres biomarqueurs.

5. Conclusion

Nous avons montré que l'EHS, le MCS et le syndrome combiné peuvent être objectivement caractérisés dans environ 90% des cas par une diminution de la production de 6-OHMS dans les urines ; et dans environ 30% et 20% par des valeurs accrues d'histamine et de HSP27 et/ou HSP70, respectivement ; et de la protéine S100B et/ou NTT dans 40 à 50% dans le sang périphérique. Ceci suggère que ces troubles, quelle que soit leur présentation étiopathogénique, peuvent être associés à la fois à une inflammation de faible niveau (augmentation de l'histamine et de HSP27/70) et à une ouverture/dysfonctionnement de la BHE (augmentation de la protéine S100B et/ou NTT). De plus, nous avons constaté une diminution profonde de la vitamine D dans le sang périphérique des patients ainsi que des auto-anticorps antimyéline P0 chez environ 15% des patients, indiquant une réponse auto-immune dans de tels cas.

En résumé, nous avons montré que pour les patients présentant des valeurs élevées, les valeurs moyennes accrues de tous les biomarqueurs étudiés ne diffèrent pas entre les trois groupes de patients EHS, MCS et EHS/MCS, ce qui signifie que ces troubles pathologiques sont similaires non seulement sur le plan clinique⁷⁴ mais sur la base de leur changement biologique. Il existe cependant plusieurs différences entre les trois groupes quant à la fréquence des patients présentant de telles valeurs anormales. Pour la vitamine D, la diminution s'est avérée significativement plus fréquente dans le groupe des patients EHS que dans les autres groupes. Cela suggère que cette altération pourrait être principalement causée par des produits chimiques. Pour l'histamine, nous avons constaté que son augmentation était significativement plus fréquente dans le groupe EHS que dans le groupe combiné EHS/MCS, résultat qui est cohérent avec le fait que le groupe EHS s'est avéré associé à une augmentation significative de la réponse anti-inflammatoire HSP 27- 70 par rapport aux autres groupes. Pour les protéines S100B et NTT, nous n'avons trouvé aucune différence significative de fréquence d'implication dans les trois groupes, ce qui signifie que ces biomarqueurs sont des indicateurs de ces troubles quelle que soit leur présentation étiopathogénique.

Enfin, notre étude conclut que la mesure des biomarqueurs peut contribuer au diagnostic objectif, à l'évaluation thérapeutique, au suivi des patients et à la compréhension étiopathogénique. Cela ouvre une nouvelle voie pour la recherche en EHS et/ou MCS. Des recherches supplémentaires sont cependant nécessaires pour valider la pertinence d'une telle approche combinée clinique et biologique.

Financement: Cette recherche a été financée par la subvention numéro 10092023 de l'Association pour la recherche sur le traitement contre le cancer (ARTAC).

(Rebutting Industry Science with Knowledge) Consultance à Bruxelles pour sa révision scientifique et anglaise minutieuse du manuscrit.

Remerciements: Les auteurs remercient Anthony Tweedale de RISK

Les références

- Randolph TG. Human Ecology and Susceptibility to the Chemical Environment. Charles C Thomas, Springfield, IL, 1962, p.148pp.
- Rea WJ, Pan Y, Ryvyes EF, et al. Electromagnetic field sensitivity. *J Bioelectr*. 1991;10:214–256. Doi: 10.3109/15368379109031410
- Report of the Workshop on Multiple Chemical Sensitivities (MCS), Berlin, Germany, (21–23 February 1996) <https://apps.who.int/iris/handle/10665/26723/browse?authority=Multiple+Chemical+Sensitivity&type=mesh>
- Bartha L, Baumzweiger W, Buscher DS, et al. Multiple chemical sensitivity: a 1999 consensus. *Arch Environ Health*. 1999;54:147–149. Doi: 10.1080/00039899909602251
- WHO (World Health Organization). Electromagnetic Fields and Public Health, Electromagnetic Hypersensitivity; WHO Fact Sheet No. 296. 2005. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Mild KH, Repacholi M, van Deventer E, Ravazzani P. Electromagnetic hypersensitivity. In: Proceedings of the WHO International Seminar and Working Group Meeting on EMF Hypersensitivity, Prague, Czech Republic, 25–27 October 2004. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006. ISBN 92-4-159412-8.
- Belpomme D, Campagnac C, Irigaray P. Reliable disease biomarkers characterizing and identifying electrohypersensitivity and multiple chemical sensitivity as two etiopathogenic aspects of a unique pathological disorder. *Rev Environ Health*. 2015;30:251–271. Doi:10.1515/reveh-2015-0027
- Belpomme D, Irigaray P. Electrohypersensitivity as a newly identified and characterized neurologic pathological disorder: how to diagnose, treat, and prevent it. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1915. Doi:10.3390/ijms21061915.
- Belpomme D, Irigaray P. Why electrohypersensitivity and related symptoms are caused by non-ionizing man-made electromagnetic fields: an overview and medical assessment. *Env Res*. 2022;212:113374. Doi: 10.1016/j.envres.2022.113374.
- Belpomme D, Irigaray P. Electrohypersensitivity as a Worldwide, Man-made Electromagnetic Pathology: A Review of the Medical Evidence. In *Electromagnetic Fields of Wireless Communications: Biological and Health Effects*, Panagopoulos Ed.; 2023, p.297-367.
- WHO (World Health Organization). Framework for Developing Health-Based EMF Standards. WHO, Geneva, Switzerland, 2006; ISBN 9241594330.
- Sobel E, Dunn M, Davanipour Z, Qian Z, Chui HC. Elevated risk of Alzheimer's disease among workers with likely electromagnetic field exposure. *Neurology*. 1996;47:1477-1481. Doi:10.1212/wnl.47.6.1477.
- Garcia AM, Sisternas A, Hoyos SP. Occupational exposure to extremely low frequency electric and magnetic fields and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2008;37:329–340. Doi:10.1093/ije/dym295.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107:499-511. Doi: 10.1161/01.cir.0000052939.59093.45.
- Belsey R, Deluca HF, Jr. Potts JT. Competitive binding assay for vitamin D and 25-OH vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 1971;33:554-557. Doi: 10.1210/jcem-33-3-554.
- Lebel B, Arnoux B, Chanez N, et al. Ex vivo pharmacologic modulation of basophil histamine release in asthmatic patients. *Allergy*. 1996;51:394-400. Doi: 10.1111/j.1398-9995.1996.tb04636.x.
- Dessaint JP, Bout D, Wattre P, Capron A. Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology*. 1975;29:813-823.
- De AK, Roach SE. Detection of the soluble heat shock protein 27 (hsp27) in human serum by an ELISA. *J Immunoassay Immunochem*. 2004;25:159-170. Doi: 10.1081/ias-120030525.
- Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest*. 1998;27:367-377. Doi:10.3109/08820139809022710.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298:431-437. Doi: 10.1016/0003-9861(92)90431-u.
- Smit LH, Korse CM, Bonfrer JM. Comparison of four different assays for determination of serum S-100B. *Int J Biol Markers*. 2005;20:34-42. Doi: 10.1177/172460080502000106.
- Arnold W, Pfaltz R, Altermatt HJ. Evidence of serum antibodies against inner ear tissues in the blood of patients with certain sensorineural hearing disorders. *Acta Otolaryngol*. 1985;99:437-444. Doi: 10.3109/00016488509108935.
- Schumacher M, Nanninga A, Leidenberger F. S-35 and 1-125 radioimmunoassays for the measurement of 6-sulphatoxymelatonin in human urine. *Acta Endocrinol*. 1989;120:132.
- Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5:463–466. Doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177.
- FDA-NIH Biomarker Working Group, (2016): BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US). 2016. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/
- Albert PJ, Proal AD, Marshall TG. Vitamin D: the alternative hypothesis. *Autoimmun Rev*. 2009;8:639–644. Doi: 10.1016/j.autrev.2009.02.011.
- Marquardt DL. Histamine. *Clin Rev Allergy*. 1983;1:343-351. Doi: 10.1007/BF02991225.
- Rocha SM, Pires J, Esteves M, Graça B, Bernardino L. Histamine: a new immunomodulatory player in the neuron-glia crosstalk. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:120. Doi: 10.3389/fncel.2014.00120.
- Greaves MW, Sabroe RA. Histamine: the quintessential mediator. *J Dermatol*. 1996;23:735–740. Doi: 10.1111/j.1346-8138.1996.tb02694.x.
- Mayhan WG. Role of nitric oxide in histamine-induced increases in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res*. 1996;743:70–76. Doi: 10.1016/s0006-8993(96)01021-9.
- Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*. 2000;20:131-147. Doi: 10.1023/a:1007074420772.
- Tan KH, Harrington S, Purcell WM, Hurst RD. Peroxynitrite mediates nitric oxide-induced blood-brain barrier damage. *Neurochem Res*. 2004;29:579–587. Doi:10.1023/b:nere.0000014828.32200.bd.
- Phares TW, Fabis MJ, Brimer CM, Kean RB, Hooper DC. A peroxynitrite-dependent pathway is responsible for blood-brain barrier permeability changes during a central nervous system inflammatory response: TNF-alpha is neither necessary nor sufficient. *J Immunol*. 2007;178:7334–7343. Doi: 10.4049/jimmunol.178.11.7334.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87:315–424. Doi: 10.1152/physrev.00029.2006.
- Yang S, Chen Y, Deng X, et al. Hemoglobin-induced nitric oxide synthase overexpression and nitric oxide production contribute to blood-brain barrier disruption in the rat. *J Mol Neurosci*. 2013;51:352–363. Doi: 10.1007/s12031-013-9990-y.
- Kapuraj M, Krizanac-Bengez Lj, Barnett G, et al. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res*. 2002;940(1-2):102–104. Doi: 10.1016/s0006-8993(02)02586-6.
- Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta*. 2004;342:1–12. Doi: 10.1016/j.cccn.2003.12.008.
- Koh SX, Lee JK. S100B as a marker for brain damage and blood-brain barrier disruption following exercise. *Sports Med*. 2014;44:369–385. Doi: 10.1007/s40279-013-0119-9.
- de Pomerai D, Daniells C, David H, et al. Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature*. 2000;405:417–418. Doi: 10.1038/35013144.
- French PW, Penny R, Laurence JA, McKenzie DR. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. *Differentiation*. 2001;67:93–97. Doi:10.1046/j.1432-0436.2001.670401.x.

41. Yang XS, He G-L, Hao Y-T, et al. Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields elicits an HSP-related stress response in rat hippocampus. *Brain Res Bull.* 2012;88:371–378. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.04.002.
42. Kesari KK, Meena R, Nirala J, Kumar J, Verma HN. Effect of 3G cell phone exposure with computer controlled 2-D stepper motor on non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway in rat brain. *Cell Biochem Biophys.* 2014;68:347–358. Doi: 10.1007/s12013-013-9715-4.
43. Ikwegbue PC, Masamba P, Oyinloye BE, Kappo AP. Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer. *Pharmaceuticals (Basel).* 2017;11:2. Doi:10.3390/ph11010002.
44. Berberian PA, Myers W, Tytell M, Challa V, Bond MG. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Pathol* 1990;136:71–80.
45. Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol.* 1993;9:601–634. Doi:10.1146/annurev.cb.09.110193.003125.
46. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 1996;381:571–579. Doi: 10.1038/381571a0.
47. Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1053:74–83. Doi:10.1196/annals.1344.007.
48. Sabirzhanov B, Stoica BA, Hanscom M, Piao CS, Faden AI. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 2012;123:542–554. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07927.x.
49. Kelly S, Yenari MA. Neuroprotection: heat shock proteins. *Curr Med Res Opin.* 2002;18:s55–s60.
50. Leak RK, Zhang L, Stetler RA, et al. HSP27 protects the blood-brain barrier against ischemia-induced loss of integrity. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013;12:325–337. Doi:10.2174/1871527311312030006.
51. Blank M, Goodman R. Electromagnetic fields stress living cells. *Pathophysiology.* 2009;16:71–78. Doi:10.1016/j.pathophys.2009.01.006.
52. Ohmori H, Kanayama N. Mechanisms leading to autoantibody production: link between inflammation and autoimmunity. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003;2:232–241. Doi: 10.2174/1568010033484124.
53. Profumo E, Buttari B, Riganò R. Oxidative stress in cardiovascular inflammation: its involvement in autoimmune responses. *Int J Inflamm.* 2011;2011:295705. Doi:10.4061/2011/295705.
54. Burch JB, Reif JS, Yost MG, Keefe TJ, Pitrat CA. Reduced excretion of a melatonin metabolite in workers exposed to 60 Hz magnetic fields. *Am J Epidemiol.* 1999;150:27–36. Doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009914.
55. Kovács J, Brodner W, Kirchlechner V, Arif T, Waldhauser F. Measurement of urinary melatonin: a useful tool for monitoring serum melatonin after its oral administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:666–670. Doi:10.1210/jcem.85.2.6349.
56. Heuser G, Heuser SA. Functional brain MRI in patients complaining of electrohypersensitivity after long term exposure to electromagnetic fields. *Rev Environ Health.* 2017;32:291–299. Doi:10.1515/reveh-2017-0014.
57. Irigaray P, Lebar P, Belpomme D. How Ultrasonic Cerebral Tomosphygmography can Contribute to the Diagnosis of Electrohypersensitivity. *J Clin Diagn Res.* 2018;6:143.
58. Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ. Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol.* 2002;52:168–174. Doi:10.1002/ana.10265.
59. Dik MG, Jonker C, Hack CE, Smit JH, Comijs HC, Eikelenboom P. Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology.* 2005;64:1371–1377. Doi: 10.1212/01.WNL.0000158281.08946.68.
60. Gazerani P, Pourpak Z, Ahmadiani A, Hemmati A, Kazemnejad A. A correlation between migraine, histamine and immunoglobulin E. *Scand J Immunol.* 2003;57:286–290. Doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01216.x.
61. Grigoriev YG, Grigoriev OA, Ivanov AA, et al. Autoimmune process after long-term lowlevel exposure to electromagnetic field (experimental results). Part 1. Mobile communications and changes in electromagnetic conditions for the population: Need for additional substantiation of existing hygienic standards. *Biophysics.* 2010;55:1041–1045.
62. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 1997;336:186–195. Doi:10.1056/NEJM199701163360306.
63. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz ST, Tuzcu M. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochemistry (Mosc.).* 2006;71:S91–S95. Doi: 10.1134/s0006297906130153.
64. Xie Z, Chen F, Li WA, et al. A review of sleep disorders and melatonin. *Neuro Res.* 2017;39:559–565. Doi:10.1080/01616412.2017.1315864.
65. Baliatsas C, Van Kamp I, Lebrecht E, Rubin GJ. Idiopathic environmental intolerance attributed to electromagnetic fields (IEI-EMF): a systematic review of identifying criteria. *BMC Public Health.* 2012;12: 643. Doi: 10.1186/1471-2458-12-643.
66. Belpomme D, Carlo GL, Irigaray P, et al. The critical importance of molecular biomarkers and imaging in the study of electrohypersensitivity. A scientific consensus international report. *Int J Mol.* 2021;22(14):7321. Doi:10.3390/ijms22147321.
67. Dahmen N, Ghezel-Ahmadi D, Engel A. Blood laboratory findings in patients suffering from self-perceived electromagnetic hypersensitivity (EHS). *Bioelectromagnetics.* 2009;30:299–306. Doi: 10.1002/bem.20486.
68. Irigaray P., Garrel C., Houssay C., Mantello P., Belpomme D. Beneficial effects of a Fermented Papaya Preparation for the treatment of electrohypersensitivity self-reporting patients: results of a phase I-II clinical trial with special reference to cerebral pulsation measurement and oxidative stress analysis. *FFHD.* 2018; 8(2):122–144. Doi: 10.31989/ffhd.v8i2.406.
69. Belpomme D, Irigaray P. Why scientifically unfounded and misleading claim should be dismissed to make true research progress in the acknowledgment of electrohypersensitivity as a new worldwide emerging pathology. *Rev Environ Health.* 2021;37:303–305. Doi:10.1515/reveh-2021-0104.
70. Belpomme D, Irigaray P. Why the psychogenic or psychosomatic theories for electrohypersensitivity causality should be abandoned, but not the hypothesis of a nocebo-associated symptom formation caused by electromagnetic fields conditioning in some patients. *Environ Res.* 2022;114839, Online ahead of print.
71. Frick U, Rehm J, Eichhammer P. Risk perception, somatization, and self-report of complaints related to electromagnetic fields - a randomized survey study. *Int J Hyg Environ Health.* 2002;205:353–360. Doi: 10.1078/1438-4639-00170.
72. Rubin GJ, Hahn G, Everitt BS, Cleare AJ, Wessely S. Are some people sensitive to mobile phone signals? Within participants double blind randomised provocation study. *BMJ.* 2006;332:886–891. Doi: 10.1136/bmj.38765.519850.55.
73. Havas M. Electrosmog and electrosensitivity: What doctors need to know to help their patients heal. *Anti-Aging Therapeutics Volume XV,* Klatz R and R Goldman (Eds), AAM, Chicago, IL, 2014.
74. Belpomme D., Irigaray P. Combined Neurological Syndrome in Electrohypersensitivity and Multiple Chemical Sensitivity: A Clinical Study of 2018 Cases. *J. Clin. Med.* 2023;12(23):7421. Doi:https://doi.org/10.3390/jcm12237421
75. Wada H, Inagaki N, Yamatodani A, Watanabe T. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole brain activity? *Trends Neurosci.* 1991;14:415–418. Doi: 10.1016/0166-2236(91)90034-r.
76. Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T, Wada H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol.* 1994;42:685–702. Doi: 10.1016/0301-0082(94)90017-5.
77. Haas HL, Sergeeva VA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev.* 2008;88:1183–1241. Doi:10.1152/physrev.00043.2007.
78. Panula P, Nuutinen S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:472–487. Doi: 10.1038/nrn3526.
79. Belpomme D, Hardell L, Belyaeva I, Burgio E, Carpenter DO. Thermal and non-thermal health effects of low intensity non-ionizing radiation: An international perspective. *Environ Pollut.* 2008;242:643–658. Doi:10.1016/j.envpol.2018.07.019.
80. Padawer J. Quantitative studies with mast cells. *Ann NY Acad Sci.* 1963;103:87–138. Doi:10.1111/j.1749-6632.1963.tb53693.x
81. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:787–799. Doi: 10.1038/nri1460.
82. Salford LG, Brun AE, Eberhardt JL, Marmgren L, Persson BR. Nerve Cell Damage in Mammalian Brain after Exposure to Microwaves from GSM Mobile Phones. *Env Health Perspect.* 2003;111:881–883. Doi:10.1289/ehp.6039.
83. Salford LG, Brun A, Stureson K, Eberhardt JL, Persson BR. Permeability of the bloodbrain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microsc Res Tech.* 1994;27:535–542. Doi:10.1002/jemt.1070270608.
84. Nordal RA, Wong CS. Molecular targets in radiation-induced blood-brain barrier disruption. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62:279–287. Doi:10.1016/j.ijrobp.2005.01.039.
85. Nitty H, Brun A, Eberhardt J, Malmgren L, Persson BR, Salford LG. Increased bloodbrain barrier permeability in mammalian brain 7 days after exposure to the radiation from a GSM-900 mobile phone. *Pathophysiology.* 2009;16:103–112. Doi:10.1016/j.pathophys.2009.01.001
86. Stam R. Electromagnetic fields and the blood-brain barrier. *Brain Res Rev.* 2010;65:80–97. Doi:10.1016/j.brainresrev.2010.06.001.

87. Oscar KJ, Hawkins TD. Microwave alteration of the blood-brain barrier system of rats. *Brain Res.* 1977;126:281-293. Doi: 10.1016/0006-8993(77)90726-0.
88. Merritt JH, Chamness AF, Allen SJ. Studies on blood-brain barrier permeability after microwave-radiation. *Radiat Environ Biophys.* 1978;15:367-377. Doi: 10.1007/BF01323461.
89. Eberhardt JL, Persson BR, Brun AE, Salford LG, Malmgren LO. Blood-brain barrier permeability and nerve cell damage in rat brain 14 and 28 days after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Electromagn Biol Med.* 2008;27:215-229. Doi:10.1080/15368370802344037.
90. Ding G-R, Li K-C, Wang X-W, et al. Effect of electromagnetic pulse exposure on brain micro vascular permeability in rats. *Biomed Environ Sci.* 2009;22:265-268. Doi: 10.1016/S0895-3988(09)60055-6.
91. Michetti F, Corvino V, Geloso MC, et al. The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem.* 2012;120:644-659. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07612.x.
92. Stamatakis E, Stathopoulos A, Garini E, et al. Serum S100B protein is increased and correlates with interleukin 6, hypoperfusion indices, and outcome in patients admitted for surgical control of hemorrhage. *Shock.* 2013;40:274-280. Doi: 10.1097/SHK.0b013e3182a35de5.
93. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. Glialneuroal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1alpha+ microglia and S100beta+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:285-290.
94. Migheli A, Cordera S, Bendotti C, Atzori C, Piva R, Schiffer D. S-100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 1999;261:25-28. Doi: 10.1016/s0304-3940(98)01001-5.
95. Irigaray P, Caccamo D, Belpomme D. Oxidative stress in electrohypersensitivity self-reporting patients: results of a prospective in vivo investigation with comprehensive molecular analysis. *Int J Mol Med.* 2018;42:1885-1898. Doi:10.3892/ijmm.2018.3774.
96. Chrousos G.P, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA.* 1992;267:1244-1252.
97. Holmstrom KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redo-dependent signaling. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:411-421. Doi:10.1038/nrm3801.