



**HAL**  
open science

# Téléphonie mobile et neurotoxicité sur le système nerveux central

René de Seze

► **To cite this version:**

René de Seze. Téléphonie mobile et neurotoxicité sur le système nerveux central. Rapport Scientifique  
INERIS, 2008, 2007-2008, pp.53-57. ineris-01869198

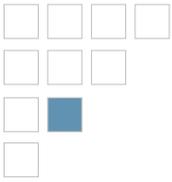
**HAL Id: ineris-01869198**

**<https://ineris.hal.science/ineris-01869198>**

Submitted on 6 Sep 2018

**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.



# Téléphonie mobile et neurotoxicité sur le système nerveux central

> RENÉ DE SEZE

Les champs radiofréquences (RF) font partie de notre environnement quotidien. Depuis quelques années, l'utilisation de téléphones cellulaires émettant des RF à proximité de la tête et donc du cerveau pose le problème de l'éventuelle influence des ondes RF sur le système nerveux central (SNC).

Des travaux de recherche récents montrent des effets de champs électromagnétiques radiofréquences sur des marqueurs biochimiques dans le cerveau du rat, que ce soit concernant l'activité neuronale, la liaison de neurotransmetteurs à leurs récepteurs ou plus particulièrement le marqueur de neurotoxicité GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (O'Callaghan and Sriram, 2005 ; Ransom et al, 2003). Concernant ce dernier, son évolution peut être le signe d'une modification temporaire (inflammation) ou persistante (gliose), pouvant entraîner des conséquences physiologiques. Il est donc important d'étudier ce marqueur de neurotoxicité pour comprendre les mécanismes sous-tendant un effet et d'en mesurer l'impact (études expérimentales chez le rat).

Par ailleurs, les résultats d'études animales ne pouvant pas toujours être extrapolés à l'homme, il a paru important de rechercher chez des volontaires exposés si l'on pouvait mettre en évidence une modification de marqueurs de l'inflammation à l'aide d'examen non ou très peu invasifs (étude de biomarqueurs chez l'homme).

## ÉTUDES EXPÉRIMENTALES CHEZ LE RAT

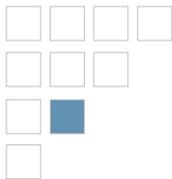
### ÉTAT DES CONNAISSANCES

Lors du programme français COMOBIO, différents facteurs ont été étudiés après exposition RF à un signal 900 MHz. Suite à une cartographie complète du cerveau en suivant le métabolisme ((C14)2-déoxyglucose) et l'activité neuronale (c-Fos), Bontempi a mis en évidence une modification des deux paramètres dans différentes zones cérébrales, tant

au niveau superficiel le plus exposé (cortex frontal) que dans des structures profondes (hippocampe, cortex temporal) pour des débits d'absorption spécifique (DAS) de 1,5 et 3 W/kg. Des DAS inférieurs et supérieurs n'ont pas montré d'effet (Bontempi et al., 2002 ; 2004). D'autre part, Mausset et al. (2004) trouvent une modification des propriétés de liaison pour les neurotransmetteurs GABA, glutamate et dopamine au niveau de différentes structures cérébrales (cortex, striatum et hippocampe) et une augmentation de la protéine GFAP après une exposition de 15 min à 6 W/kg au niveau du striatum, du cortex frontal et de l'hippocampe. Ces travaux montrent une forte augmentation de la production de GFAP au niveau du cortex frontal à 2 (+300 %) et 3 jours (+200 %), une augmentation au niveau du cortex du cervelet à 3 jours (+150 %) ( $p < 0,001$ ). Ces résultats indiquent une inflammation temporaire des zones externes du cerveau (cortex) mais pas de modification des structures profondes (hippocampe et globus pallidus du striatum). Concernant d'éventuelles modifications comportementales, malgré les effets significatifs trouvés sur la mémoire de travail chez le rat avec des impulsions de type radar par Lai (1994), les deux répliques de cette étude (Cobb et al., 2004 ; Cassel et al., 2004) ne confirment pas d'effet. De plus, dans le cadre du programme COMOBIO, Bontempi a soumis les animaux à des épreuves comportementales de mémoire de travail et de mémoire de référence après exposition selon les paramètres ayant montré des effets pour les marqueurs d'activité neuronale. Malgré cela, aucun déficit mnésique n'a été observé. Dans le même programme, Dubreuil et al. (2002, 2003) ne trouvent aucun effet sur la mémoire spatiale et l'apprentissage.

### OBJECTIFS

Dans le cadre du projet européen RAMP précédemment réalisé dans les laboratoires de l'INERIS, on a reproduit l'étude de Mausset et al. (2004) pour une exposition de 15 min à 6 W/kg et suivi



l'évolution de la protéine GFAP 2, 3, 6 et 10 jours après exposition. Puis, on a étudié l'intensité et l'amplitude de cet effet après exposition semi-chronique (1 à 2 mois) et chronique (6 mois).

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Système d'exposition

Le système d'exposition expérimental consiste en une antenne-boucle, qui a la propriété de permettre une exposition principalement localisée au niveau de la tête des rats. L'antenne est alimentée par l'intermédiaire d'un générateur de radiofréquences couplé à un amplificateur de puissance. Un diviseur permet d'alimenter 4 antennes pour exposer 4 animaux en simultané. Un coupleur permet de mesurer et d'enregistrer la puissance incidente et la puissance réfléchie. Le rapport des deux est un reflet du bon couplage ou non de l'antenne avec la tête du rat, et témoigne de la quantité d'énergie électromagnétique absorbée par l'animal.

Les champs électromagnétiques émis sont des rayonnements radiofréquences modulés selon la norme GSM déjà utilisée dans les radiocommunications cellulaires et selon les normes du système UMTS en préparation. Les fréquences porteuses sont 900, 1800 MHz, et 1960 MHz ; la principale fréquence de répétition des impulsions est 217 Hz, avec une durée de 576  $\mu$ s.

Un système de contrôle de l'exposition a été développé et mis au point à l'INERIS, qui permet de régler la puissance incidente et d'enregistrer la qualité du signal fourni sur chaque antenne en début d'étude, et sur une antenne tout au long de l'étude pour garantir la qualité de l'exposition. De plus, des fantômes de rat en gel à base d'acrylamide ont été fabriqués, et une méthodologie de mesure d'échauffement grâce à une thermométrie non perturbable par les champs radiofréquences permet de contrôler la puissance absorbée et d'évaluer le DAS produit par le système.

Pour rappel, la quantification du niveau d'exposition se fait en mesurant le DAS, représentant la densité de puissance dissipée par unité de masse de tissu. L'efficacité de l'antenne-boucle a ainsi été caractérisée (Lévêque et al, 2004).

Les différentes intensités ont été initialement choisies par rapport à des puissances absorbées dans les tissus superficiels lors de l'utilisation d'un téléphone mobile :

- 6 W/kg : valeur seuil pour laquelle un effet sur la GFAP a été observé après 15 min d'exposition ;
- 2 W/kg : valeur limite d'exposition recommandée par la Commission européenne ;
- 0,5 à 1 W/kg : valeurs auxquelles sont soumis

les utilisateurs de radiotéléphones ; la valeur dans le cerveau est environ moitié moindre. En conséquence, les valeurs utilisées pour notre étude ont été choisies principalement à 1,5 ; 3 ; 4,5 et 6 W/kg. Le modèle animal utilisé est le rat Sprague Dawley, déjà très étudié en neurosciences et dont la cartographie cérébrale est bien identifiée.

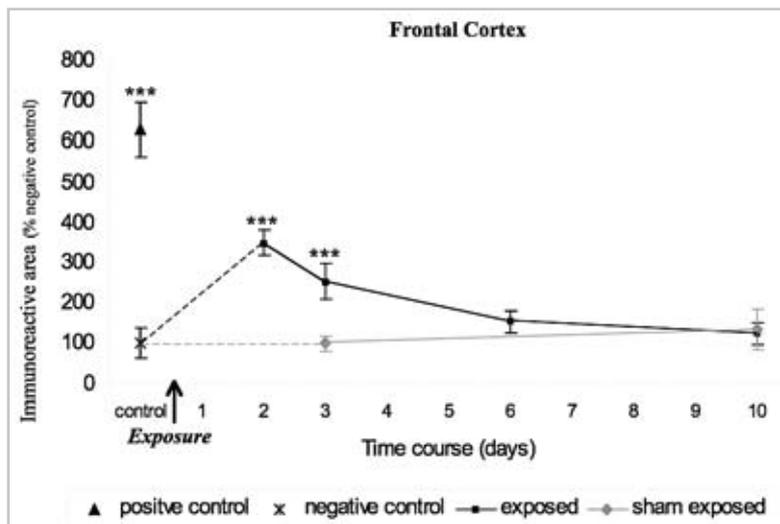
### Marqueurs d'effets

Les marqueurs principaux étudiés sont la protéine c-Fos, indicateur d'activation neuronale (Kaczmarek, L., 2002) et la GFAP, protéine de structure des astrocytes, dont l'hypertrophie ou la prolifération témoigne d'un phénomène inflammatoire de type gliose. Ces marqueurs ont été étudiés par immunohistochimie et analyse d'images.

Les procédures et protocoles permettant d'étudier la neurotoxicité sont bien documentés et décrits par les organismes européens et internationaux (EPA/630/R-95/001F 1998 ; OECD 2003 ; 2004/73/EC 2004).

Parmi les indicateurs de toxicité se trouve la Protéine Acide Glio Fibrillaire (GFAP), une protéine structurale spécifiquement produite par les cellules gliales astrocytaires du SNC. Les cellules astrocytaires jouent divers rôles au sein du cerveau : ce sont des cellules nourricières, contenant dans leur cytoplasme un stock de glycogène ; par ailleurs, elles forment la matrice cérébrale en soutenant les réseaux neuronaux et elles interviendraient dans les échanges synaptiques. Leurs dernières fonctions expliquent plus particulièrement l'intérêt porté à ces cellules dans le cadre d'une étude de toxicité. En effet, ces cellules interviennent dans le système inflammatoire spécifique du cerveau et dans le cas de mort neuronale, elles sont capables de proliférer afin de remplacer les cellules manquantes. Ce phénomène est appelé gliose.

La quantification de la protéine GFAP, du fait de sa sensibilité et de sa rapidité de réaction (Eisenbrandt, Allen et al. 1994; Eng et al., 2000; Norenberg 1994; Ridet, Privat et al. 1997), pourra ainsi donner une idée de la possible atteinte du SNC par neurotoxique. En effet, une augmentation temporaire de la GFAP peut être le signe d'une inflammation (grossissement des cellules astrocytaires) alors qu'une augmentation permanente de la quantité de cette même protéine peut refléter une augmentation du nombre de cellules gliales, signe d'une gliose, pouvant avoir de graves conséquences physiologiques et comportementales selon la zone cérébrale concernée. L'immunohistochimie spécialement dirigée contre la GFAP sur coupe de tissu permet de quantifier la protéine selon une cartographie cérébrale précise.



> Moyenne ( $\pm$  SEM) du pourcentage de GFAP marquée dans le cortex frontal cerveau de rat. Groupe contrôle positif (n = 4 ; LPS 2,5 mg/kg, i.v. injection 1ml/kg) ; groupe contrôle négatif (n = 4 ; animaux cage) ; animaux exposés (6W/kg 15min) 2, 3, 6 ou 10 jours après exposition (n = 9 chaque jour) ; animaux témoins (ou « sham-exposés ») 3 et 10 jours après exposition sham (n = 6 chaque jour). Les valeurs des contrôles positifs, des exposés et des animaux sham sont exprimées en pourcentages du contrôle négatif (\*\*\*) p > 0,001.

### Études paramétriques – effets cumulatifs

Les différents paramètres conditionnant un effet : dose, durée, expositions répétées, etc. ont été explorés. Deux doses ont été principalement étudiées, à deux durées différentes : 1,5 W/kg pendant 45 minutes et 6 W/kg pendant 15 minutes. Des expositions ont été répétées cinq jours par semaine pendant un à six mois.

### Tests comportementaux

Les travaux antérieurs n'ont pas montré d'effets robustes d'expositions aiguës sur des tâches de mémoire spatiale ou de mémoire de rappel. Ces mêmes tests ont à nouveau été réalisés, cette fois-ci après des expositions chroniques (6 mois) ou semi-chroniques (2 mois) (Olton, D. S., 1987).

## RÉSULTATS

### Marqueurs d'effets

Les résultats obtenus à l'INERIS indiquent, comme ceux de Mausset et al. (2004), une augmentation de la GFAP en ce qui concerne le cortex, malgré une amplitude différente (+140 %, p<0,001) mais en différent au niveau du striatum (+250 %, p<0,001) ou de l'hippocampe (+130 %, p<0,05) pour lesquels Mausset n'avait pas trouvé d'effet. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour expliquer ces différences.

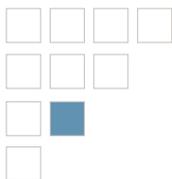
### Études paramétriques – effets cumulatifs

Le c-Fos varie de façon cyclique et n'est pas dose-dépendant ; l'activation ainsi mise en évidence renseigne principalement sur la localisation cérébrale d'un effet, ce qui oriente les tests comportementaux qui pourraient éventuellement être altérés en conséquence. La GFAP est dose et durée-

dépendant ; elle indique un effet transitoire après exposition aiguë. Il n'est pas mis en évidence d'effet cumulatif après exposition répétée (l'amplitude de l'effet n'est pas augmentée), mais l'effet est dans ces conditions persistant, alors qu'il disparaît en quelques jours après une exposition aiguë. Un seuil a pu être déterminé pour une exposition aiguë : 6 W/kg, tandis qu'il existe un effet à 1,5 W/kg après une exposition chronique. Enfin, il a été déterminé qu'il existe un facteur d'échelle du débit d'absorption (DAS) entre le rat et l'homme :

### **DAS homme = 4 x DAS rat**

L'augmentation de la GFAP traduit une réaction inflammatoire et constitue de ce fait un signe d'atteinte sanitaire qu'il faut donc mieux cerner (paramètres d'apparition –seuil–, conditions d'extrapolabilité à l'homme) pour chercher à l'éviter. Il faut cependant noter que dans les études conduites à l'INERIS, il n'a pas été observé de conséquence comportementale ni de pathologie consécutive, ce qui limite fortement l'interprétation du risque réel qui en résulte ; en effet, l'OCDE considère que la toxicité n'est avérée que lorsque plusieurs des 5 approches de neurotoxicité sont corrélées, à savoir parmi les effets anatomopathologiques, fonctionnels (c'est le cas de la GFAP, marqueur biochimique du fonctionnement du système nerveux), électrophysiologiques, comportementaux ou développementaux. Ceci revient à dire que des effets sanitaires pourraient être craints chez l'homme, si les mécanismes biologiques impliqués sont transposables, pour une valeur de DAS de 24 W/kg après une exposition aiguë, et pour 6 W/kg après des expositions répétées de façon chronique. En comparaison, le DAS maximal produit par un téléphone mobile est en moyenne de l'ordre de 0,5 W/kg.



## ■ RÉFÉRENCES

Ammari M., Brillaud E., Gamez C., Lecomte A., Sakly M., Abdelmelek H., de Seze R., 2008. *Effect of a chronic GSM 900 MHz exposure on glia in the rat brain*. Biomedicine & Pharmacotherapy, vol 62/4, pp. 273-281.

Brillaud E., Piotrowski A., de Seze R., 2007. *Effect of an acute 900 MHz GSM exposure on glia in the rat brain: A time-dependent study*. Toxicology, vol. 238, n° 1, pp. 23-33.

Ammari M., 2008b. *GFAP expression in the rat brain after a sub-chronic exposure to a 900 MHz GSM signal*. Toxicology.

Ammari M. *Head-Only sub-chronic exposure to GSM-900 MHz electromagnetic fields does not alter spatial memory in rats* (soumis, 2008c).

Brillaud E., Romanini P., Piotrowski A. and de Seze R. *Effect of a single 900 MHz GSM exposure on the rat brain activity, glia and behaviour*. European Journal of Neurosciences (soumis).

Ammari M. *Effect of a chronic GSM 900 MHz exposure on behaviour in the rat* (soumis, 2008d).

De Seze R. *Mobile phone and stress biomarkers in human volunteers*. Abstract book of the 29<sup>th</sup> Annual meeting of the bioelectromagnetics society, 10-15 June 2007, Kanazawa, Japan, pp. 107-108.

## Tests comportementaux

Les effets d'expositions à un mois sur la mémoire ont montré un effet mineur qui ne s'est pas confirmé lors des études ultérieures de plus longue durée (2 et 6 mois). Les tests utilisés n'ont donc pas permis de mettre en évidence de perturbation comportementale chez le rat associée aux modifications biochimiques obtenues (Ammari et al., 2008c).

La première partie de l'étude a consisté à regarder la durée de l'effet observé sur la GFAP avec une exposition à 900 MHz. L'expression de cette protéine a été mesurée à J2, J3, J6 et J10 après une exposition aiguë unique. Les effets observés à 3 jours avec le rayonnement GSM 900 MHz disparaissent ou ne sont plus significatifs à 10 jours.

Dans une deuxième partie de l'étude, il a été recherché si un signal à une fréquence ou de type différent pouvait avoir des effets différents d'une exposition à 900 MHz. Il n'a pas été trouvé d'effet particulièrement différent d'une exposition à 1800 MHz ou UMTS, que ce soit à J3 ou à J10.

La troisième partie cherchait à mettre en évidence un effet cumulatif. Pour cela, une exposition a été pratiquée cinq jours par semaine pendant deux mois à 900 MHz, à des DAS de 1,5 W/kg et 6 W/kg. Cette partie visait aussi à déterminer le seuil d'un effet après exposition répétée. Après une exposition répétée à 900 MHz, à 1,5 W/kg, il n'y a pas d'effet comme après une exposition aiguë, et à 6 W/kg, l'effet est plus faible qu'après une exposition aiguë. On peut en déduire qu'il y a un seuil de DAS pour un effet après exposition chronique de 1,5 W/kg, et qu'il n'y a pas d'effet cumulatif à 6 W/kg.

Il a enfin été estimé si les effets observés pouvaient constituer un risque pour la santé des utilisateurs de téléphones mobiles. Compte tenu d'un facteur 4 entre le DAS calculé chez le rat et le DAS calculé chez l'homme (cf. rapport ACI 2008), il apparaît que les niveaux de DAS auxquels les utilisateurs sont exposés au niveau du cerveau sont inférieurs à ceux qui produisent une augmentation de la GFAP. Ces études sont rassurantes vis-à-vis des utilisateurs de téléphones portables quant aux dangers encourus au cours d'une communication. Une perspective de ce travail est d'étudier les effets comportementaux après exposition chronique pour voir si les faibles effets biologiques observés présentent une traduction au niveau fonctionnel. Une autre est de vérifier si une exposition chronique ne produit pas un effet persistant à 10 jours et peut-être au-delà.

## CONCLUSIONS

Des dispositifs expérimentaux ont été mis en place pour l'investigation des effets des expositions aux radiofréquences à des niveaux faibles – quoique supérieurs de près d'un ordre de grandeur aux valeurs limites d'exposition recommandées. En cohérence avec d'autres résultats expérimentaux, il n'a pas été observé d'effet sur le comportement. Les effets observables se situent au niveau d'un biomarqueur des cellules gliales, la GFAP, dont la présence trace une inflammation cérébrale. On peut suspecter que cette inflammation soit un précurseur d'effets plus sérieux comme une gliose, bien que la chaîne causale en soit mal établie. C'est dans ce sens, de l'étude des mécanismes biologiques mis en œuvre par ce marqueur, que des travaux expérimentaux futurs sont à envisager.

## ÉTUDE DE BIOMARQUEURS CHEZ L'HOMME

De nombreuses études épidémiologiques s'intéressent aux effets des RF 900 MHz sur l'homme, notamment en termes d'impact sur les cancers, mais les résultats obtenus restent fortement controversés (revue Repacholi, 2001).

Certains utilisateurs de téléphones portables se sont plaints de troubles, dont des maux de tête, une sensation de malaise général, des nausées ou encore des troubles du sommeil. Il semblerait que ces troubles surviennent avec l'augmentation de la durée d'utilisation des téléphones portables (Ofstedal et coll., 2000). Cependant, dans la plupart des cas, l'apparition de ces symptômes serait plutôt d'origine psychosomatique (revue Repacholi, 2001).

Bien que le système endocrinien soit une cible potentielle des RF (Navakatikian, 1994 ; Lu et coll., 1981 ; Lu et coll., 1985), l'exposition chronique aux téléphones portables ne semble pas provoquer de variation significative des taux de différentes hormones, comme la mélatonine, l'hormone de croissance, la prolactine, ou les hormones sexuelles (de Seze et al., 1998 ; Djeridane et al., 2008). L'activité électrique globale du cerveau a également été mesurée chez des sujets exposés aux téléphones portables. De manière générale, l'exposition provoque des modifications du spectre de l'EEG (revue Hossman et Hermann, 2003), que ce soit pendant des tâches de mémorisation (Krause et al., 2000), au cours de discrimination d'un stimulus auditif (Eulitz et al., 1998) ou lors de certaines phases du sommeil (Huber et al., 2000 ; Borbély et al., 1999). En outre, la durée des phases de sommeil « Rapid Eye Movement » (REM) diminue lors d'une exposition nocturne (pendant 8 h) aux

téléphones cellulaires (Mann et Röschke, 1996). Les conséquences d'une exposition aux téléphones cellulaires sur les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage sont particulièrement intéressantes. Il semble qu'une telle exposition (entre 30 min et 1 h) améliore les performances cognitives de sujets soumis à des tests de mémorisation. Cette amélioration se traduit par une augmentation de la vitesse de réaction (Preece et coll., 1999 ; Koivisto, 2000) et/ou une diminution du temps nécessaire pour réaliser des calculs arithmétiques (Koivisto, 2000).

L'exposition aux téléphones cellulaires semble provoquer des modifications de l'activité cérébrale (activité électrique du cerveau, apprentissage). Les mécanismes précis qui sous-tendent les réponses physiologiques des êtres vivants ne peuvent pas être recherchés chez l'homme. Il est donc nécessaire de trouver un bon compromis entre des études réalisées sur des modèles d'exposition *in vitro* et les études épidémiologiques. L'exposition d'animaux *in vivo* constitue un modèle nécessaire pour élucider ces mécanismes.

#### MATÉRIELS ET MÉTHODES

Une étude a dosé différents biomarqueurs (BM) de stress inflammatoire dans le sang, la salive et l'air expiré chez des volontaires exposés pendant une demi-heure à un téléphone mobile. Cette étude a eu lieu en double aveugle, selon un plan d'étude

randomisé en cross-over. Les effets mesurés ont été comparés comme contrôle à un banc UV ou une exposition infra-rouge (demi-dose érythémale minimale).

#### RÉSULTATS

Après une exposition réelle aux champs électromagnétiques de type téléphonie mobile, l'amplitude de variation des taux d'aldéhyde et d'isoprène alvéolaires augmentent significativement par rapport à une exposition simulée. Il convient d'évoquer l'existence d'une corrélation positive entre ces deux BM. Ainsi, les tests statistiques réalisés pour les BM dosés dans l'air expiré ne sont pas indépendants. Par ailleurs, l'exposition aux champs électromagnétiques semble ne pas induire une modulation significative de l'amplitude de variation du taux des autres BM. Toutefois, nous n'avons pas la puissance nécessaire afin de conforter cette conclusion.

Il convient de préciser, en outre, les limites de cette analyse statistique liées : au nombre limité des sujets inclus dans l'étude, à la variabilité intra- et interindividuelle importante des taux pour la plupart des BM, et à la présence de sujets ayant des valeurs « extrêmes ». Une analyse statistique exploratoire est nécessaire pour traiter correctement les données recueillies dans cette étude. Il est aussi souhaitable, compte tenu de la dispersion observée, de réaliser des études avec un plus grand nombre de volontaires.

#### □ □ ■ SUMMARY

The aim of this project is to better evaluate whether radiofrequency electromagnetic fields emitted by mobile phones constitute or not a health risk for users. Two topics have been developed those last years : experimental work on rats to look for biomarkers of activation, inflammation and behaviour ; look at some biomarkers in humans after using a mobile phone.

A head only exposure set-up was used to reproduce the users exposure. Dosimetry has been performed on 250g rat model to determine the influence of different parameters (skin, skull,..). Previously, Brillaud et al. [2007] showed the existence of glial reactivity 2 days after a 15 min GSM 900 MHz acute exposure at a brain averaged SAR = 6 W/kg, but no longer after 10 days. In this work we measured GFAP expression in rats, to evaluate glial evolution up to 10 days after exposure to GSM signal for 45 min at SAR = 1,5 W/Kg and for 15 min/day at SAR = 6 W/Kg in the rat brain areas: prefrontal cortex (Pfcx), cerebellum cortex (CCx), dentate gyrus of hippocampus (DG), lateral globus pallidus of striatum (LGP), and caudate putamen (Cpu). In comparison to sham rats, rats exposed to sub-chronic GSM signal at 1,5 W/kg and 6W/Kg show a GFAP increase in different brain areas after 3 and 10 days. Given morphological differences, brain-averaged SAR in rat is equivalent to 4 times the same SAR in human brain, which prevents from extrapolating the obtained results to human. The c-Fos protein appears useful to identify reactive brain areas and orient towards adequate behavioural tests. However, its variation is limited and does not show a linear dose-response, and hence cannot be used to detect cumulative effects.

Animals were tested for a learning task just after exposure. No effect on learning or spatial memory has been seen, either for acute exposures, neither for chronic or semi-chronic exposures. Studies in volunteers showed an increase in aldehyd and alveolar isoprene, but large inter- and intra-individual variability don't guarantee the robustness of this result. More expert analysis needs to be achieved to look if a study with more volunteers would be worth to perform.