



HAL
open science

Mémoire pour l'obtention de L'Habilitation à Diriger des Recherches Etude des effets cellulaires et moléculaires des champs électromagnétiques

Yann Percherancier

► **To cite this version:**

Yann Percherancier. Mémoire pour l'obtention de L'Habilitation à Diriger des Recherches Etude des effets cellulaires et moléculaires des champs électromagnétiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Bordeaux, 2017. tel-02525164

HAL Id: tel-02525164

<https://hal.science/tel-02525164>

Submitted on 30 Mar 2020

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.

Mémoire pour l'obtention de

L'Habilitation à Diriger des Recherches

**Etude des effets cellulaires et moléculaires des
champs électromagnétiques**

Yann Percherancier

19 Septembre 2017

Equipe BioEM, groupe de Bioélectronique
Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (IMS).
CNRS UMR 5218
Université de Bordeaux

Membres du Jury :

Rapporteurs :

Corinne DEJOURS, Professeur de l'ENSEiRB-MATMECA / Bordeaux INP, Bordeaux.

Natalia PREVARSKAYA, Professeur de l'Université de Lille, Lille.

Lluís MIR, Directeur de Recherches CNRS, Institut Gustave Roussy, Villejuif.

Examineurs :

Stéfano MARULLO, Directeur de Recherches INSERM, Institut Cochin, Paris.

Pierre VACHER, Chargé de Recherches INSERM, Institut Bergonié, Bordeaux.

Membre invité :

Bernard Veyret, Directeur de Recherche honoraire CNRS, Bordeaux.

A ma femme, Karine, ma tendre moitié, avec qui nous avons construit tant de choses,

A nos enfants, Léa, Tess et Lou, qui illuminent nos vies,

A mes parents, qui m'ont permis d'être devant vous aujourd'hui.

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'immense honneur d'accepter de lire et d'évaluer ce travail, malgré des emplois du temps bien chargés.

Nous n'avons jamais fini d'apprendre. Je voulais exprimer ma plus sincère reconnaissance aux différents chercheurs qui ont participé à ma formation et ont su guider mes pas au travers des années et des thématiques de recherche.

Je tiens ici à remercier Françoise Bachelier et Michel Bouvier, qui ont dirigé mes travaux en thèse et en post-doctorat, et qui ont façonné la manière dont je vis la science aujourd'hui. J'ai passé de merveilleuses et passionnantes années à vos côtés.

Je tiens à remercier Mounira Chelbi-Alix qui m'a accueilli dans son équipe pour ma première affectation au CNRS. Je tiens également à remercier Daniel Brethes qui a suivi mon parcours depuis ma licence à l'université de Bordeaux II. Je n'oublierai jamais l'aide que vous m'avez, tous deux, apporté à des moments cruciaux de mon parcours.

Je tiens à remercier tout spécialement Bernard Veyret pour m'avoir accueilli dans l'équipe de bioélectromagnétisme et pour les discussions passionnantes que nous avons, sur la science bien sûr, mais également sur tant d'autres sujets. Souvent, lorsque nous noircissions le tableau en dissertant de nos résultats, j'étais envahi d'un sentiment de plénitude : je mesurais la chance qui m'était donné de travailler avec un chercheur aussi complet, passionné, cultivé et perspicace que l'est Bernard. Je profite également pour saluer la mémoire d'Antoine Priore, sans qui Bernard n'aurait jamais ouvert le laboratoire de bioélectromagnétisme il y a plus de trente ans, et donc grâce à qui toute l'aventure du bioélectromagnétisme a commencé à Bordeaux.

Je tiens ici à exprimer ma gratitude à mes collègues pour le bonheur que j'ai à interagir avec eux chaque jour. Merci donc à Isabelle Lagroye pour le travail formidable qu'elle fait pour animer notre équipe. Merci à Emmanuelle Poque, Annabelle Hurtier, Florence Poulletier de Gannes, Rémy Renom et Renaud Charlet de Sauvage pour le travail que l'on réalise chaque jour dans la bonne humeur. Merci également à Sylvie Renaud, Noëlle Lewis, Sylvain Saïghi, Gilles N'Kaoua, ainsi qu'aux autres membres du groupe de bioélectronique, qui m'ont toujours soutenu depuis mon arrivée à l'IMS. Merci aussi à Philippe Lévêque et Délia Arnaud-Cormos, nos collègues du XLIM à Limoges, ainsi que à Gilles Ruffié et Fabrice Bonnaudin, avec qui j'ai toujours beaucoup de plaisir à interagir et qui représentent l'autre versant du bioélectromagnétisme.

Je tiens également à remercier les membres du groupe de recherche NSYSA du laboratoire ISM, sans qui le présent travail n'aurait pas pu être réalisé. En particulier, je voudrais remercier Stéphane Arbault avec qui j'ai un plaisir immodéré à taper dans la petite balle jaune

et à discuter de science, Bertrand Goudeau avec qui j'ai souvent refait le monde, ainsi que Neso Sojic dont les conseils avisés ont souvent été décisifs.

A vous tous, nous avons un bel avenir ensemble.

Je voudrais profiter de cet espace pour remercier également les membres du pôle administratif de l'IMS qui tous les jours se battent à nos côtés pour faire avancer la recherche : Valérie Abel, notre secrétaire, Simone Dang Van, Nathalie Jouanno, Laurent Courde, Nicole Lun, Valérie Cauhapé, Vanessa Dusson et Christel Meccheri, pour ne citer qu'eux. Merci également aux différentes directions de l'IMS.

Juste avant d'arriver à l'IMS, je rencontrais Guy Thieux qui a joué un rôle important dans ma décision de me consacrer au bioélectromagnétisme et qui m'a mis le "pied à l'étrier". Merci Guy pour ces longues heures passées ensemble à discuter de l'histoire du bioélectromagnétisme.

Je finirai en ayant une pensée pour les étudiants que j'ai eu l'occasion d'encadrer durant toutes ces années, que ce soit pour un stage d'été de deux semaines ou pour le marathon que représente la thèse. Merci donc à Agnès, Sabrina, Sébastien, Lorenza et Jennifer pour avoir survécu à mes méthodes de calcul de molarité. Merci enfin à Ian Ruigrok, qui finit actuellement sa thèse sous ma direction et que j'ai eu également le plaisir d'encadrer durant son master 2. Le travail présenté dans ce manuscrit est en très grande partie le fruit de son labeur, souvent seul dans le noir, à scruter le moindre frémissement d'une courbe de BRET dans le vacarme incessant des générateurs... Merci à toi Ian pour ton enthousiasme. Travailler avec toi a été une source intense de satisfaction.

Table des matières

1	Organisation générale du document.....	3
2	Parcours scientifique.....	4
3	Informations administratives.....	9
4	Liste des publications	13
5	Introduction à la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence.....	16
5.1	Le transfert d'énergie en résonance	17
5.2	Le BRET, une technique en évolution.....	19
6	Etude de la SUMOylation de la protéine PML : activités de recherche sur la période Octobre 2005 à Août 2009.....	23
6.1	Rappel du contexte scientifique	23
6.1.1	<i>Modification des protéines par SUMO.....</i>	<i>23</i>
6.1.2	<i>La SUMOylation de PML est induite par l'Arsenic.....</i>	<i>24</i>
6.2	Etude de la SUMOylation de PML sur cellule vivante grâce au BRET.....	26
7	Effets des champs électromagnétiques sur la matière vivante : activités de recherche depuis Septembre 2009.....	28
7.1	Introduction au bioélectromagnétisme.....	28
7.1.1	<i>Notions sur le rayonnement électromagnétique</i>	<i>28</i>
7.1.2	<i>Spectre électromagnétique et Interaction ondes-matière.....</i>	<i>30</i>
7.1.2.1	Le spectre électromagnétique	30
7.1.2.2	Rayonnements ionisants et non-ionisants.....	31
7.1.2.3	Effets thermiques.....	32
7.1.3	<i>Interaction des champs extrêmement basse fréquence avec la matière vivante... ..</i>	<i>32</i>
7.1.4	<i>Interaction des champs radiofréquence avec la matière vivante</i>	<i>34</i>
7.1.5	<i>Contexte social et économique.</i>	<i>36</i>
7.2	Approches expérimentales.....	38
7.2.1	<i>Effets des champs EBF 50 Hz sur les jonctions GAP</i>	<i>39</i>
7.2.2	<i>Effets des champs RF sur l'activité des canaux TRP thermosensibles.....</i>	<i>48</i>
7.2.2.1	Les canaux TRP.....	48
7.2.2.2	Mesurer l'activité des canaux TRP sous exposition RF à l'aide du BRET : un double défi technique.	50
7.2.2.3	Caractérisation des sondes BRET ciblant les canaux TRP et mise en place de la lecture spectrale des signaux de BRET.....	53
7.2.2.4	Étude de l'effet des radiofréquences sur le canal TRPV1	66

7.2.3	<i>Analyse globale du comportement cellulaire sous exposition RF à l'aide de l'impédancemétrie.</i>	86
7.2.3.1	Introduction à l'impédancemétrie et aux mesures de comportement cellulaire sans marquage.	86
7.2.3.2	Utilisation de l'impédancemétrie en bioélectromagnétisme.	87
7.2.3.3	Résultats expérimentaux	91
8	Conclusions, perspectives et résultats préliminaires.	97
8.1	Recherches en bioélectromagnétisme.	99
8.1.1	<i>Le bioélectromagnétisme à la lumière du BRET.</i>	99
8.1.1.1	Mesure de l'activité de HSF-1 sous exposition RF à l'aide du BRET	100
8.1.1.2	Mesure de l'activité d'autres canaux thermo-TRP sous exposition RF à l'aide du BRET	107
8.1.2	<i>L'impédancemétrie comme outil d'exploration des paramètres des CEM entraînant un effet biologique.</i>	107
8.2	Les projets CanalBRET et BRET BOW.	109
8.2.1	<i>Le projet CanalBRET.</i>	110
8.2.2	<i>Le projet BRET BOW.</i>	111
8.3	Encadrement d'étudiant(e)s.	113
9	Bibliographie.	114

1 Organisation générale du document

Ce manuscrit est une synthèse des activités de recherche que j'ai menées depuis mon entrée au CNRS en octobre 2005, en qualité de chargé de recherche de 2^{ème} classe. Il comporte en premier point un avant-propos qui relate mon parcours scientifique depuis mon entrée en thèse à l'Institut Pasteur en Octobre 1998 jusqu'à mon arrivée en 2009 dans l'équipe de bioélectromagnétisme du laboratoire IMS, à l'Université de Bordeaux. Le manuscrit se poursuit par mon curriculum vitae détaillant, entre autres, mon cursus universitaire, mes activités d'encadrement d'étudiants et d'enseignement, ainsi que la liste de mes publications. Vient ensuite une première partie scientifique exposant plus en détail mes recherches scientifiques depuis mon recrutement au CNRS en Octobre 2009 et ma première affectation à l'institut André Lwoff de Villejuif d'Octobre 2005 à Octobre 2009. La partie scientifique suivante est consacrée au bioélectromagnétisme et aux recherches que je mène depuis octobre 2009 au sein du groupe de bioélectronique au laboratoire IMS. La dernière partie de ce manuscrit expose mes perspectives de recherche pour les années à venir.

2 Parcours scientifique

À l'issue de mon D.E.A., j'ai obtenu une bourse ministérielle et l'opportunité de faire ma thèse à l'institut Pasteur de Paris au sein du laboratoire d'Immunologie Virale dirigée alors par le Pr Virelizier. Sous la direction de Françoise Bachelier, je me suis dans un premier temps intéressé à l'étude des mécanismes d'activation du facteur de transcription NF-KB. L'activation de NF-KB est critique pour l'expression génique du VIH et plus spécifiquement pour le contrôle de l'activité transcriptionnelle du génome pro-viral. Cette activation est finement régulée par le métabolisme cytoplasmique de son inhibiteur IKB α . Nous avons mis en évidence, que la régulation d'IKB α , par phosphorylation et dégradation par le protéasome, peut avoir lieu non seulement dans le cytoplasme mais également dans le compartiment nucléaire (Renard et al., 2000). Ce mécanisme intra-nucléaire permettant la mise en place et surtout la persistance de NF-KB, pourrait prévenir la terminaison précoce de l'activité régulatrice de ce facteur de transcription au cours de stimuli persistants.

J'ai ensuite cherché à déterminer si l'entrée du VIH-1 au sein des lymphocytes T était conditionnée par une distribution particulière de CD4 et CCR5, respectivement les protéines réceptrice et co-réceptrice du VIH, au sein de microdomaines particuliers de la membrane plasmique. Lors de mon arrivée en thèse, le rôle des radeaux lipidiques ou « rafts », microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides, dans l'entrée du VIH était sujet à débat. Du fait de la composition lipidique et protéique de la membrane du virus, il était démontré que le VIH-1 bourgeonnait à partir de ces microdomaines particuliers. Concernant l'entrée virale, un consensus était établi quant à l'enrichissement de CD4 au sein de ces microdomaines mais l'importance de cette localisation particulière de CD4 pour les phases d'entrée du virus était totalement inconnue. L'enrichissement des co-récepteurs CXCR4 et CCR5 ensemble avec CD4 au sein des radeaux lipidiques aurait pu conditionner leur concentration au sein d'un micro-environnement privilégié favorisant les interactions entre les protéines de l'enveloppe virale et les récepteurs cellulaires. J'ai donc mené des recherches visant à déterminer si la distribution de CD4 et/ou CCR5 au sein des rafts présents dans les membranes des lymphocytes T était critique pour l'entrée du VIH-1 dans ces cellules. Plusieurs travaux mettaient en exergue le potentiel d'une modification post-traductionnelle de nature lipidique : la palmitoylation, à favoriser l'association des protéines membranaires avec les radeaux lipidiques. Sur la base de ces observations, j'ai montré que le récepteur CCR5 était palmitoylé sur 3 résidus cystéines présents dans son extrémité carboxy-terminale (Percherancier et al., 2001). La perte de palmitoylation de CCR5, soit par mutation, soit grâce à l'utilisation d'une drogue spécifique, entraînait une perte d'expression membranaire et l'instabilité de ce récepteur du fait de son accumulation et de sa dégradation au sein des lysosomes. Cependant malgré cette modification post-traductionnelle, nous avons pu montrer que CCR5 n'avait pas d'affinité significative pour les radeaux lipidiques à la surface des

lymphocytes T CD4⁺ primaire, cible naturelle du VIH-1. J'ai pu montrer, en revanche, que la palmitoylation de CD4 n'influait pas son expression membranaire mais favorisait effectivement son association avec les microdomaines de type « rafts ». De même, l'association de CD4 avec les « rafts » dépendait étroitement de son interaction avec la protéine p56Lck. La mutation de CD4 sur ses sites de palmitoylation et d'interaction avec p56Lck conduisait à une délocalisation quasi totale de ce récepteur en dehors des radeaux lipidiques. J'ai ainsi pu montrer que, dans une situation où à la fois le récepteur primaire CD4 et le co-récepteur CCR5 étaient tous deux exclus de ces microdomaines lipidiques, l'entrée du VIH-1 n'était pas altérée. D'un autre côté, la déplétion du cholestérol membranaire (lequel, bien que concentré dans les « rafts », se retrouve dans toutes les parties des membranes) affectait de manière importante l'entrée du VIH-1 (Percherancier et al., 2003). Collectivement, ces résultats suggèrent que l'entrée du VIH-1 était dépendante du cholestérol membranaire, à la surface des cellules cibles, mais pas de la localisation des récepteurs au sein des microdomaines lipidiques de type « rafts ». Ceci supposait donc un rôle actif du cholestérol dans l'activité et la conformation des récepteurs du VIH-1 pour les phases d'entrée de ce virus, ce qui a été confirmé par d'autres équipes ensuite (Ablan et al., 2006).

À l'issue des travaux ci-dessus décrits, j'ai soutenu ma thèse en Juillet 2002 et j'ai décidé de partir en stage post-doctoral. Soucieux de parfaire ma connaissance de la biologie des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), dont font partie CCR5 et CXCR4, les deux co-récepteurs principaux du VIH, j'ai effectué un stage post-doctoral de trois ans au sein du laboratoire de pharmacologie moléculaire du Pr Michel Bouvier à l'université de Montréal au Canada. Le laboratoire du Pr Michel Bouvier a été pionnier dans l'élaboration de nombreux concepts concernant la pharmacologie des RCPGs comme notamment la découverte des agonistes inverses, des chaperonnes pharmacologiques ou plus récemment de l'importance de l'oligomérisation pour les RCPGs et du concept de biais de signalisation.

Les récepteurs couplés aux protéines G font partie d'une superfamille de récepteurs composés de sept segments transmembranaires et dont la fonction est de transduire le signal de diverses familles de ligands à l'activation des protéines G hétérotrimériques qui activeront ensuite différents effecteurs. Ces récepteurs sont la cible de plus de 40% des drogues pharmaceutiques actuellement créées ce qui souligne leur importance. Pendant de nombreuses années, il a été assumé que les RCPGs fonctionnaient sous forme monomérique. Au début des années 2000, le concept selon lequel les RCPGs existent non pas sous forme monomérique mais sous forme dimérique voir potentiellement sous forme d'oligomères d'ordre supérieur était en train d'émerger. Par ailleurs, l'importance de l'environnement membranaire dans la biologie et la pharmacologie de ces récepteurs n'avait que peu été étudiée. Partant de ces observations, je résume ci-dessous les axes de recherche sur lesquels je me suis concentré au cours de mon post-doctorat et qui m'ont permis de me former à la pharmacologie des RCPGs.

Dans un premier temps, je me suis penché sur l'importance du contexte membranaire dans la pharmacologie et la régulation des RCPGs. Je me suis intéressé plus particulièrement au rôle fonctionnel du cholestérol sur le récepteur β_2 -Adrénergique (β_2 AR), celui-ci étant largement étudié dans le laboratoire du Pr Bouvier. J'ai pu montrer que l'activité basale du récepteur est finement régulée par la quantité de cholestérol membranaire au sein des cellules HEK. Ce rôle du cholestérol ne semble pas être dû à un effet direct sur la conformation du récepteur mais plutôt à la régulation de la distribution latérale des effecteurs du β_2 AR, la G α s et l'adénylate cyclase (AC) dans le plan de la membrane. En effet, j'ai pu montrer que, comme pour CCR5, le β_2 AR n'a pas d'affinité pour les radeaux lipidiques malgré que ce récepteur soit lui aussi palmitoylé. Cependant, ses effecteurs directs : la protéine G α s et l'AC, ont une forte propension à se distribuer au sein des rafts dont la formation et la stabilité sont intimement liées à la présence du cholestérol membranaire. Par des expériences de déplétion du cholestérol, nous avons pu montrer que le cholestérol, en ordonnant les membranes, provoque la séquestration de l'AC et de la G α s au sein des rafts, rendant ces effecteurs inaccessibles au récepteur β_2 AR et de fait inactifs. Il en découle, dans des conditions basales, une moindre production d'AMPc, mais une plus grande affinité du β_2 AR pour son agoniste, l'isoprotérénol. L'importance du contexte membranaire dans la distribution des effecteurs constitue un mécanisme tout à fait original de la régulation des RCPGs. Ce travail a fait l'objet d'une publication sur laquelle je figure en tant que co-premier auteur (Pontier et al., 2008).

Dans un deuxième axe de recherche durant mon post-doc, j'ai cherché à caractériser l'importance fonctionnelle de l'oligomérisation pour la pharmacologie de CXCR4. Alors que l'état de dimérisation (ou d'oligomérisation au sens large) des RCPGs est maintenant bien établi, l'importance de cette organisation moléculaire sur la fonction de ces récepteurs était encore globalement méconnue au début des années 2000. En particulier il n'était pas bien défini si l'état d'oligomérisation des RCPGs est modifié lors de leur activation par différents ligands. Potentiellement, cela pouvait être d'importance dans le contexte de l'entrée du VIH-1 au sein des lymphocytes T. En effet, l'interaction de la protéine d'enveloppe du VIH-1 avec les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 étant par nature coopérative, l'étude de la régulation de l'état de l'oligomérisation de ces récepteurs lors de leur activation est donc une étape importante pour la compréhension, à la fois, du mécanisme de fusion virale et de l'activation de ces récepteurs par leurs ligands naturels. En collaboration étroite avec l'équipe du Dr Nikolaus Heveker à l'hôpital Ste Justine de Montréal, je me suis donc attaché à explorer cette thématique en prenant CXCR4 comme modèle d'étude. J'ai, au cours de ce travail, tiré profit d'une nouvelle méthode biophysique d'étude des interactions protéine-protéine au sein des cellules vivantes qui a été développée au sein du laboratoire de Michel Bouvier : le Transfert d'Énergie en Résonance de Bioluminescence (le BRET).

Grâce à l'utilisation du BRET, j'ai pu analyser la formation des homodimères de CXCR4-CXCR4 ainsi que la formation des hétérodimères de CXCR4 avec CCR2, un autre chemorécepteur dont la présence d'un mutant sur le résidu 64 était connue pour ralentir la progression du SIDA chez les patients infectés porteurs de cette mutation. J'ai pu montrer que le contact avec les ligands de ces deux récepteurs entraîne non pas un changement dans l'état d'oligomérisation, mais un changement conformationnel au sein des homo- ou des hétérodimères. J'ai également pu montrer que l'inhibition de l'activation de CXCR4 par des peptides hydrophobes dirigés contre les domaines transmembranaires de CXCR4, et connus pour inhiber l'infection par le VIH-1, résulte de l'inhibition des transitions de conformation induite par le ligand au sein du dimère de CXCR4 et non pas de la dissociation du dimère. Pris ensemble, ces résultats suggèrent un modèle d'organisation spontanée des récepteurs aux chimiokines sous forme homo et/ou hétérodimérique, le dimère étant l'unité fonctionnelle qui subit les transitions de conformation même si un seul des deux protomères voit son site de liaison à l'agoniste occupé. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans JBC (Percherancier et al., 2005).

Dans le courant de l'année 2005, j'obtenais mon poste de chargé de recherche 2^{ème} classe au C.N.R.S et j'étais affecté à l'UPR9045¹ dirigée par Michael Tovey pour y travailler dans l'équipe de Mounira Chelbi-Alix à partir du 1^{er} Octobre 2005. Connaissant à l'avance la thématique sur laquelle j'allais travailler dans les années à venir, j'avais déjà planifié de mettre à profit ma maîtrise du BRET pour l'adapter à l'étude de la SUMOylation de PML, l'une des thématiques abordées au sein de l'équipe de Mounira Chelbi-Alix. Je montais alors une collaboration internationale avec le laboratoire du Pr Muriel Aubry à l'université de Montréal, cette équipe étant la première à avoir étudié des interactions entre protéines nucléaires à l'aide du BRET. Les recherches que j'ai mené de 2005 à 2008 sur ce sujet ont fait l'objet d'une publication dans JBC (Percherancier et al., 2009) et sont détaillées dans le chapitre six du présent manuscrit.

Dans le courant de l'année 2008, mes centres d'intérêt scientifique évoluaient considérablement, se tournant résolument vers un sujet atypique : le bioélectromagnétisme, l'étude des effets des champs électromagnétique sur la matière vivante. J'ai commencé à m'intéresser aux champs électromagnétiques lorsque je suis entré comme chercheur post-doctoral dans le laboratoire du Pr Michel Bouvier à l'Université de Montréal. Au cours de mes recherches post-doctorales, la pleine compréhension des techniques de transfert non-radiatif d'énergie m'a amené à m'intéresser à la physique associée et au spectre électromagnétique dont fait partie le visible. Progressivement, j'ai commencé à m'interroger sur les interactions entre les champs électromagnétiques différents du visible et la matière

¹ Unité d'Oncologie Virale, Institut André Lwoff, Villejuif (94).

vivante. Cette question est particulièrement d'actualité aujourd'hui du fait du développement rapide de l'utilisation des champs électromagnétiques dans notre environnement quotidien, en particulier dans le domaine des communications sans fil. A cette époque, mon projet au sein de l'équipe de Mounira Chelbi-Alix était en passe d'être terminé et mon unité d'accueil étant alors en fermeture. Je décidais alors de donner un tournant à ma (encore) jeune carrière et de me consacrer à l'étude du bioélectromagnétisme. Parmi les quelques laboratoires français travaillant dans le domaine, l'équipe de bioélectromagnétisme de Bordeaux animée alors par Bernard Veyret, était internationalement reconnue pour être au front de la recherche dans le domaine depuis plus de vingt ans et m'apparaissait comme le lieu d'accueil idéal pour mes recherches futures. Outre mon attrait pour les thématiques traitées au sein de cette équipe, je ne peux pas éluder mon lien particulier avec la ville de Bordeaux où j'ai étudié en DEUG et en Licence, où j'ai rencontré ma femme et où je me suis marié. Poursuivre ma carrière à Bordeaux dans le domaine du bioélectromagnétisme représentait une sorte de quadrature du cercle où tous les ingrédients étaient réunis pour concilier ma passion de la recherche et une vie de famille équilibrée et épanouie ; une opportunité rare qu'il m'était impossible de ne pas saisir.

Après avoir rencontré Bernard Veyret et son équipe plusieurs fois, il m'apparut que nous avions effectivement de nombreux domaines d'intérêt en commun. J'allais pouvoir mettre à profit mes connaissances concernant la biochimie et la pharmacologie moléculaire dans un cadre totalement nouveau, à l'interface de la biologie et de la physique. Grâce à mes connaissances en biologie moléculaire et en biologie cellulaire, je projetais déjà de mettre en place des outils qui n'existaient pas alors dans l'équipe. Dans le même temps, je savais être amené à discuter quotidiennement avec des scientifiques venant d'horizons très divers, ce qui m'apparaissait extrêmement enrichissant. Rejoindre cette équipe était en réalité en parfaite continuité avec mes activités antérieures, tout en m'ouvrant à un pan de recherche généralement ignoré des biochimistes. Ceci représentait une vraie prise de risque sur le plan scientifique mais constituait un défi extrêmement motivant. C'était pour moi une énorme satisfaction que de pouvoir m'ouvrir à d'autres disciplines scientifiques, à d'autres courants de pensée. J'ai donc déposé une demande de mobilité à l'automne 2008 qui a été acceptée et qui m'a permis de rejoindre l'équipe de bioélectromagnétisme de Bordeaux en Septembre 2009.

3 Informations administratives

État civil : **Yann Percherancier**

Né le 23 Mai 1975 à Grenoble (38)

Marié, 3 enfants

Nationalité : Français

Profession : CR1 CNRS (agent 5009, recrutement CR2 en Octobre 2005)

Adresse : 29 rue des fougères. 33140 Villenave d'Ornon.

Tél. : +33-(0)535400486 ou +33-(0)629951029

Email : yann.percherancier@ims-bordeaux.fr

Titres Universitaire

1998-2002 : **Doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire** (Université Paris VI) réalisé sous la direction scientifique de Françoise Bachelerie au sein de l'Unité d'Immunologie Virale dirigée par Jean-Louis Virelizier (Institut PASTEUR, Paris). Thèse soutenue le 03 Juillet 2002.

Thématique : Étude de déterminants moléculaires impliqués dans l'adressage et la distribution membranaire de CD4 et CCR5 : importance pour l'infection VIH-1.

1997/1998 : **D.E.A.** de Biologie Cellulaire et Moléculaire (Université Paris VI).

1996/1997 : **Maîtrise** de Biochimie option virologie (Université Paris VII).

1995/1996 : **Licence** de Biochimie (Université de Bordeaux II).

1993/1995 : **D.E.U.G.** de Biologie (Université de Bordeaux I).

Post-doc

Octobre 2002 - Septembre 2005 : stage post-doctoral au sein du laboratoire du Pr Michel BOUVIER (université de Montréal, Canada).

Thématique : Importance du cholestérol et de l'oligomérisation dans la biologie et la régulation des récepteurs couplés aux protéines G.

Affectations C.N.R.S.

Depuis le 01-01-2009 : Chargé de recherche dans l'équipe de Isabelle Lagroye au sein de l'UMR 5218 (laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (IMS), université de Bordeaux I, Talence (33)).

Thématique : Effets cellulaires et moléculaires des champs électromagnétiques.

Octobre 2005 - Décembre 2008 : Chargé de recherche dans l'équipe de Mounira Chelbi-Alix au sein de la FRE2937 (Institut André Lwoff, Villejuif (94)).

Thématique : Etude de la SUMOylation de la protéine PML au sein des cellules vivantes grâce à la technique du BRET.

Encadrement scientifique

Doctorat Sciences de la Vie et de la Santé (université de Bordeaux) : Hermanus Ruigrok, 2014-2017.

Etude en temps réel des effets cellulaires et moléculaires des champs radiofréquences et des fréquences intermédiaires.

Stage de 2ème année IUT Mesures physique (Université de Bordeaux) : Guillaume Shahid, 2015. Décomposition de spectres complexes de signaux de BRET en temps réel.

Master 2 Sciences du vivant (université de Bordeaux) : Jennifer Beauvarlet, 2014-2015 (co-direction des travaux avec Pierre Vacher à l'unité VINCO à l'institut Bergonié).

Etude en BRET de l'interaction de CD95 avec ses effecteurs.

Master 2 EPHE : Hermanus Ruigrok, 2013-2014

Etude en temps réel des effets moléculaires des champs radiofréquences sur les canaux TRPV par la technique du BRET.

Master 2 ERASMUS : Lorenza Patrignoni, 2013-2014

Etude de la pharmacologie et de la SUMOylation des protéines AhR et TDO2 à l'aide de la technique du BRET. (ERASMUS entre l'EPHE et l'université de Perrugia (Italie))

Brevets

- Brevet N° EP 15155202.3. Déposé le 16 février 2015. Titre : Novel voltage dependent ion channel fusions and method of use thereof.
- Brevet n°EP 16192290.1 déposé le 4 octobre 2016. Titre : Novel real-time multiplexed, multi-color Bioluminescence Resonance Energy Transfer assay, apparatus, and uses thereof.

Contrats de recherche

Type financement	Montant	Période
<p>AP Recherche IPB</p> <p>RF-Bioeffets : Étude des effets biologiques des signaux des communications sans fil grâce à la méthode du BRET</p>	<p>10 000 € (porteur)</p>	<p>Juin - Décembre 2012</p>
<p>Conseil Régional d'Aquitaine</p> <p>* Demande de co-financement d'une thèse et de matériel :</p> <p>ETeR : Étude en temps réel des effets cellulaires et moléculaires des champs électromagnétiques environnementaux.</p>	<p>73 250 € (matériel + co-financement de bourse de thèse) (porteur)</p>	<p>Oct 2014 - Sept 2017</p>
<p>Programmes européens</p> <p>* GERoNiMO - Generalised EMF Research using Novel Methods – an integrated approach: from research to risk assessment and support to risk management - FP7, Grant agreement no: 603794,</p>	<p>430 751 € (réparti sur 3 équipes UB/CNRS) (responsable tâche 5.3)</p>	<p>Janv 2015 - Déc 2018</p>
<p>Autres</p> <p>* ADEME</p> <p>ETeR : Étude en temps réel des effets cellulaires et moléculaires des champs électromagnétiques environnementaux.</p> <p>* Projet exploratoire ANSES</p> <p>RF-BioCell : Etude en temps réel des effets cellulaires globaux des champs radiofréquences</p>	<p>49 500 € (co-financement bourse de thèse) (porteur)</p> <p>50 000 € (porteur)</p>	<p>Oct 2014 - Sept 2017</p> <p>Janv 2013 - Déc 2013</p>
<p>Programmes Investissements d'Avenir</p> <p>* PEPS INSIS : RadioBRET : Effets biologiques des champs radiofréquence des communications sans fil : approches moléculaire en temps réel / boucle fermée par spectroscopie</p>	<p>15 000 € (porteur)</p>	<p>Mai 2013 - Déc 2013</p>

Activités d'expertise et dissémination de la science

Comité Scientifique

- Action COST BM1309 - European network for innovative uses of EMFs in biomedical applications (EMF-MED). 2014-2018.

Évaluation scientifique de projets de recherche

- ANSES (2014-2015)

Évaluation scientifique pour des journaux scientifiques à comité de lecture

Plus de 15 articles évalués pour :

- Bioelectromagnetics, 2011-
- Médecine Sciences, 2011-
- Cell report, 2017-

Participation à l'organisation de colloques

- Congrès joint URSI commission K – COST BM0704, 26-28 Mai 2010: Congrès international, 120 personnes. Accueil et Responsable informatique.
- 50th Anniversary of Interferon, Hôtel de Ville, Paris, Avril 2007. 150 personnes. Accueil et Responsable informatique.

Formation continue

Février 2011 : Expérimentation animale, spécialité Chirurgie animale

Novembre 2010 : École de Bioélectromagnétisme de l'EBEA (Erice, Italie)

Octobre 2010 : Labview – Niveau de base

Septembre 2010 : Conception de projet pour répondre à un appel d'offre

Octobre 2009 : Expérimentation animale de niveau 1.

4 Liste des publications

* : auteurs ayant contribué à part égale

● Ruigrok, H.J., G. Shahid, B. Goudeau, F. Poullétier de Gannes, E. Poque-Haro, A. Hurtier, I. Lagroye, P. Vacher, S. Arbault, N. Sojic, B. Veyret, **and Y. Percherancier**. Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in three TRPV channels. *Biophys J*. 2017 Jan 10;112(1):87-98.

● Garcia-Fernandez M, **Percherancier Y**, Lagroye I, O Connor R, Veyret B, Arnaud-Cormos D, Leveque P. Dosimetric characteristics of an EMF delivery system based on a real-time impedance measurement device. *IEEE Trans Biomed Eng*. 63(11):2317-2325.

● **Percherancier Y**, Goudeau B, Charlet de Sauvage R, de Gannes FP, Haro E, Hurtier A, Sojic N, Lagroye I, Arbault S, Veyret B. Effects of 50 Hz magnetic fields on gap junctional intercellular communication in NIH3T3 cells. *Bioelectromagnetics*. 2015 Apr;36(4):287-93.

● Armando S, Quoyer J, Lukashova V, Maiga A, **Percherancier Y**, Heveker N, Pin JP, Prézeau L, Bouvier M. The chemokine CXCL4 and CXCL2 receptors form homo- and heterooligomers that can engage their signaling G-protein effectors and β arrestin. *FASEB J*. 2014 Oct;28(10):4509-23.

● Sauvageau E, Rochdi MD, Oueslati M, Hamdan FF, **Percherancier Y**, Simpson JC, Pepperkok R, Bouvier M. CNIH4 Interacts with Newly Synthesized GPCR and Controls Their Export from the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*. 2014 Apr;15(4):383-400.

● Poullétier de Gannes F, Billaudel B, Haro E, Taxile M, Le Montagner L, Hurtier A, Ait Aissa S, Masuda H, **Percherancier Y**, Ruffié G, Dufour P, Veyret B, Lagroye I. Rat fertility and embryo fetal development: influence of exposure to the Wi-Fi signal. *Reprod Toxicol*. 2013 Apr;36:1-5.

● Poullétier de Gannes F, Haro E, Hurtier A, Taxile M, Athane A, Ait-Aissa S, Masuda H, **Percherancier Y**, Ruffie G, Billaudel B, Dufour P, Veyret B, and Lagroye I. Effect of In Utero Wi-Fi Exposure on the Pre- and Postnatal Development of Rats. **Birth Defects Research (Part B)** 95:130–136 (2012)

● Lagroye I, **Percherancier Y**, Juutilainen J, De Gannes FP, Veyret B. ELF magnetic fields: animal studies, mechanisms of action. **Prog Biophys Mol Biol**. 2011 Dec;107(3):369-73. Review.

● **Y. Percherancier***, D. Germain-Desprez*, F. Galisson, X.H. Mascle, L. Dianoux, P. Estephan, M.K. Chelbi-Alix and M. Aubry. Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. **J Biol Chem**. 2009 Jun 12;284(24):16595-608.

- L. Dianoux, J. El Bougrini, F. Galisson, **Y. Percherancier** and M.K. Chelbi-Alix. Les mécanismes de l'action antivirale des interférons : la voie PML. **Virologie**, 2008, 12 (1) : 39-52
- **Y. Percherancier***, S.M. Pontier*, S. Galandrin, A. Breit, C. Galés and Bouvier M. Cholesterol-dependent Separation of the β_2 -Adrenergic Receptor from Its Partners Determines Signaling Efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. **J Biol Chem**. 2008, 283(36):24659-72
- YA. Berchiche, Chow KY, B. Lagane, M. Leduc , **Y. Percherancier**, Fujii N, Tamamura H, Bachelerie F and Heveker N. Direct Assessment of CXCR4 Mutant Conformations Reveals Complex Link between Receptor Structure and G α i Activation. **J.Biol.Chem**. 2007, 282(8):5111-5.
- M. Pampin, Y. Simonin, B. Blondel, **Y. Percherancier** and MK. Chelbi-Alix. Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implications for antiviral defense. **J.Virol**. 2006, 80(17):8582-92.
- Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, **Y. Percherancier**, Audet M, Paris H, Bouvier M. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. **Nat. Struct. Mol. Biol**. 2006 Sep;13(9):778-86.
- F. Hamdan, **Y. Percherancier** and M. Bouvier. Analysis of Receptor-Protein Interactions by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. **Current Protocols in Neuroscience**. 2006, February, Chapter 5: Unit 5.23.
- **Y. Percherancier**, Y. Berchiche, I. Slight , R. Volkmer-Engert, H. Tamamura, N. Fujii, M. Bouvier and N. Heveker. Bioluminescence Resonance Energy Transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. **J. Biol. Chem**. 2005, 280(11):9895-903.
- B. Lagane, S. Ballet, T. Planchenault, K. Balabanian, E. Le Poul, C. Blanpain, **Y. Percherancier**, I. Staropoli, G. Vassart, M. Oppermann, M. Parmentier and F. Bachelerie. Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for CCR5-mediated signaling and receptor endocytosis. **Molecular Pharmacology**. 2005, 67(6) : 1966-76.
- N Sol-Foulon, C Esnault, **Y Percherancier**, F Porrot, P Metais-Cunha, F Bachelerie and O Schwartz. The effects of HIV-1 Nef on CD4 surface expression and viral infectivity in lymphoid cells are independent of rafts. **J. Biol. Chem**. 2004, 279(30):31398-408.
- **Y. Percherancier**, B. Lagane, T. Planchenault, I. Staropoli, R. Altmeyer, J-L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelerie. HIV-1 entry into T-Cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant raft membrane domains. **J. Biol. Chem**, 2003, 278 (5): 3153-61.
- **Y. Percherancier**, T. Planchenault, A. Valenzuela-Fernandez, J-L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelerie. Palmitoylation-dependent control of degradation, life

span, and membrane expression of the CCR5 receptor. **J. Biol. Chem**, 2001, 276 (34): 31936-44.

• **Y. Percherancier***, P. Renard*, M. Kroll, D. Thomas, J-L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelerie. Inducible NF κ B activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear I κ B α . **J. Biol. Chem**, 2000, 275: 15193-9.

Communications ORALES

• **BIOEM2014 conference**, Jun 2014, Cape Town, South Africa.

Short talk : Y. Percherancier, S. Kohler, R. Charlet De Sauvage, G.N'Kaoua, A. Hurtier, E. Haro, F. Poullétier De Gannes, I. Lagroye, P. Lévêque, B. Veyret. Search for tumor-specific frequencies of amplitude-modulated 27 MHz electromagnetic fields in mice with hepatocarcinoma xenografted tumors

• **XIV Conférence Internationale sur le SIDA**, Barcelone (Espagne), Juillet 2002.

Short talk : **Y. Percherancier**, B Lagane, T Planchenault, I Staropoli, R Altmeyer, J-L Virelizier, F Arenzana-Seisdedos, and F Bachelerie. HIV-1 entry into T-Cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant raft membrane domains.

• **Keystone Symposia (C1)**: G-protein Coupled Receptors, Evolving Concept and Drug discovery, Taos (Nouveau Mexique, USA), 17-22 février 2004.

Short talk : **Y. Percherancier**, S Pontier and M Bouvier. Cholesterol Modulation of beta-2 Adrenergic Receptor Characteristics by sequestration of the Adenylyl-Cyclase V/VI in rafts membrane.

Conférence invitée

" La dynamique des interactions moléculaires à la lumière du BRET ", Mercredi 11 décembre 2013, Université de Rennes. Invité par Patrick Legembre (Inserm / UR1 / CRLCC Eugène Marquis)

5 Introduction à la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence.

La technique de BRET (pour « Transfert d'Énergie en Résonance de Bioluminescence », en français) est une technique biophysique qui permet l'étude des interactions protéine-protéine et des changements de conformation des protéines, en temps réel et sur cellule vivante avec une extrême sensibilité (Percherancier et al., 2005; Hamdan et al., 2006). Cette technique s'appuie sur l'utilisation de protéines de fusion ; les protéines dont on veut tester l'interaction étant respectivement fusionnées à un donneur d'énergie bioluminescente comme la Luciférase et à un accepteur d'énergie fluorescent compatible, comme par exemple la YFP (Yellow Fluorescent protein). Après expression des deux protéines de fusion dans les cellules, la mesure du transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur permet de déterminer si les deux protéines candidates interagissent physiquement ou non (Fig. 1). Les protéines d'intérêt n'ont pas besoin d'être sur-exprimées comme lors de manipulation de biochimie classique, et l'on peut travailler avec des cellules qui expriment les partenaires d'interaction à un niveau d'expression proche du niveau endogène. Par ailleurs, la mesure du BRET pourra être quantifiée et donner différentes informations comme, notamment, l'affinité relative du donneur pour l'accepteur ou encore la puissance et l'efficacité d'un agent donné à modifier l'interaction entre deux partenaires.

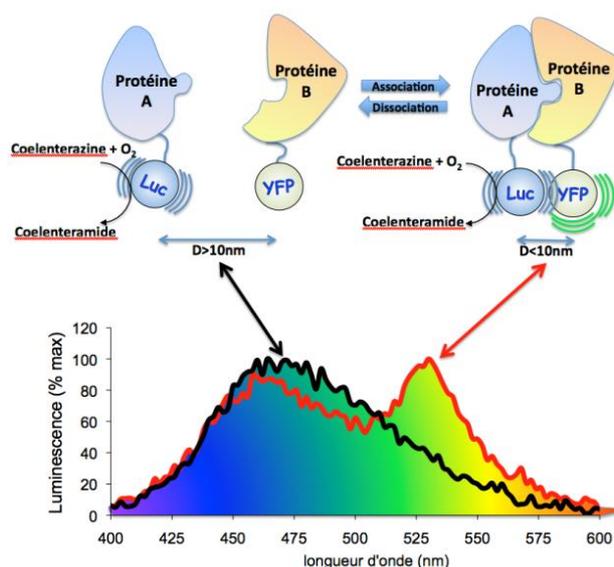


Figure 1 : Représentation schématique d'un test de BRET intermoléculaire entre une protéine A fusionnée à la Luciférase et une protéine B fusionnée à la YFP. Le spectre du signal bioluminescent est indiqué dans le panneau inférieur. Trait noir : spectre de la Luc seule en absence de transfert d'énergie. Trait rouge, l'interaction entre les protéines A et B entraîne un transfert d'énergie de la Luc vers la YFP, ce qui se manifeste par l'apparition d'un pic d'émission à la longueur d'onde d'émission propre de la YFP.

Au cours de mes recherches post-doctorales, j'ai largement utilisé cette technique pour étudier divers mécanismes moléculaires en temps réel et sur cellules vivantes, tels que :

- les changements de conformations induits au sein des dimères de CXCR4 par l'agoniste SDF-1 (Percherancier et al., 2005).

- la distribution latérale du récepteur β 2- Adrénérgique et de ses effecteurs au sein ou à l'extérieur des microdomaines lipidiques de type raft (Pontier et al., 2008).
- la formation d'oligomères de CXCR4 d'ordre supérieur (dimère de dimère) (Armando et al., 2014).
- le criblage à moyen débit d'interactions protéines-protéines sur cellule vivante (Sauvageau et al., 2014).

La maîtrise du BRET ayant conditionné l'essentiel de mes activités depuis mon recrutement au CNRS, je rappelle ci-dessous les fondements théoriques de cette technique que j'ai utilisé dans plusieurs études rapportées dans ce manuscrit.

5.1 Le transfert d'énergie en résonance

En 1948, Théodore Förster décrit pour la première fois la théorie du transfert d'énergie en résonance (RET), qui est défini comme un transfert d'énergie non radiatif, c'est-à-dire sans émission de photons, et qui résulte d'une interaction dipôle – dipôle entre une molécule donneuse d'énergie et une molécule acceptrice (Förster, 1948) (Fig. 2). Cette théorie stipule que, dans des conditions bien définies d'orientation et de proximité des dipôles, la désactivation par transfert d'énergie de la molécule donneuse d'énergie, placée dans un état excité, sur une molécule acceptrice, ne peut se faire qu'entre niveaux iso-énergétiques. Cette propriété implique que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (fig. 2 A et B). Le transfert non radiatif de l'énergie du donneur vers l'accepteur provoque alors le passage à l'état excité de ce dernier, lequel retournera à l'état fondamental en émettant un photon à sa longueur d'émission propre et en fonction de son rendement quantique (fig. 2A).

Förster a pu montrer que l'efficacité de ce transfert d'énergie est inversement proportionnelle à la puissance six de la distance séparant le dipôle donneur du dipôle accepteur d'énergie, ce qui rend le RET sensible à de petites variations de distance (Harris, Daniel C., 2010) (fig. 2C).

Les applications modernes en biologie de la théorie du RET n'ont vu le jour qu'à la fin du 20^{ème} siècle, en particulier du fait de la découverte et de la caractérisation de la Green Fluorescent Protein (GFP), ainsi que de ses améliorations ultérieures par mutagenèse (augmentation de la brillance, de la stabilité, amélioration de la maturation, modification de la couleur, etc.) (Tsien, 1998; Wang et al., 2008). Ceci a valu le prix Nobel de chimie à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien en 2008.

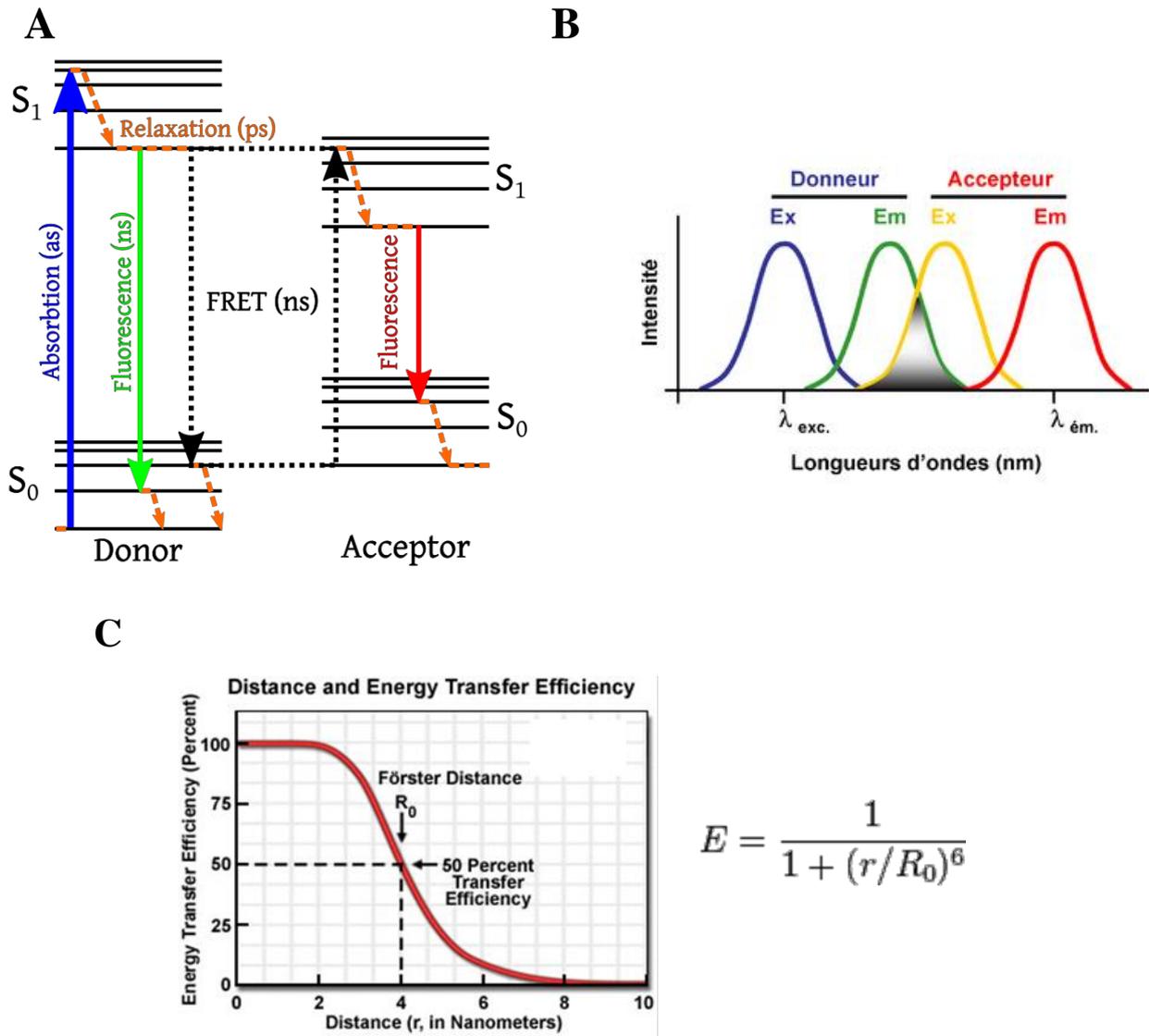


Figure 2 : Transfert d'énergie par résonance. **A.** Diagramme de Jablonski représentant un transfert d'énergie non radiatif entre un donneur et un accepteur d'énergie fluorescent. **B.** Représentation du recouvrement spectral entre le donneur et l'accepteur. **C.** Représentation schématique de l'efficacité de transfert d'énergie en fonction de la distance donneur-accepteur r et équation de l'efficacité du transfert d'énergie E . R_0 est la distance de Förster définie, pour un couple accepteur-donneur donné, comme la distance permettant 50% de l'efficacité maximale du transfert.

L'utilisation de mutants de la GFP possédant des longueurs d'ondes d'émission modifiées en font des outils de choix aussi bien dans l'étude de l'expression de gènes, le suivi de protéines et leur compartimentalisation cellulaire, que dans l'analyse des interactions protéine – protéine par des approches de transfert d'énergie en résonance, tel que le transfert d'énergie en résonance de **F**luorescence aujourd'hui communément dénommé FRET (notons cependant que l'acronyme FRET désigne initialement le transfert d'énergie par résonance de type **F**örster). En effet, grâce à la biologie moléculaire, il est possible de fusionner l'ADNc de

protéines d'intérêt à la séquence codante de variants de la GFP possédant des spectres d'émission et d'excitation compatibles. Dès lors, on distingue deux types de sondes moléculaires permettant de réaliser des expériences de transfert d'énergie (fig. 3) :

- les sondes inter-moléculaires, qui permettent d'étudier l'interaction entre deux protéines candidates fusionnées respectivement à un groupe donneur et à un groupe accepteur fluorescents compatibles. L'interaction des deux protéines d'intérêt va entraîner un rapprochement des groupements donneur et accepteur, fournissant un signal de FRET.

- les sondes intramoléculaires qui permettent d'étudier un domaine protéique dont la conformation est susceptible de changer sous différents stimuli et qui est pris « en sandwich » entre une paire accepteur / donneur compatible. Ces sondes sont fréquemment utilisées pour mesurer l'activité d'une protéine dont la conformation est modifiée à la suite de son activation.

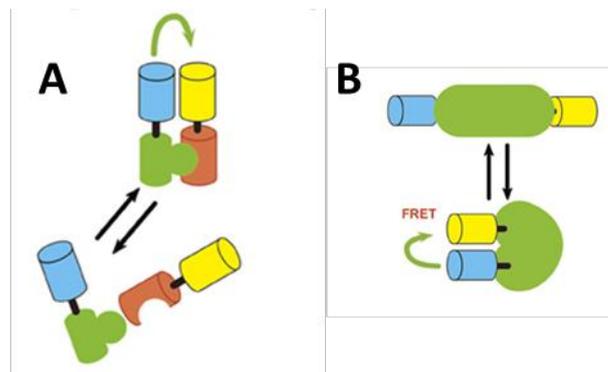


Figure 3 : Représentation schématique de sondes FRET intermoléculaires (A) et intramoléculaire (B). Le groupement donneur d'énergie est schématisé en bleu, l'accepteur en jaune, les protéines d'intérêts étant schématisées en vert et orange.

5.2 Le BRET, une technique en évolution.

Le BRET est une technique très similaire au FRET, dans laquelle le donneur d'énergie est une molécule bioluminescente. De fait, aucune source d'excitation externe n'est requise, ce qui permet d'éviter certains problèmes de photoblanchiment ou d'auto-fluorescence des supports plastiques ou des tissus, que l'on rencontre souvent en FRET. En revanche, l'intensité de lumière émise étant faible par rapport à la fluorescence produite par l'excitation d'un laser, il reste encore difficile de mesurer le signal de BRET au niveau unicellulaire. Quelques études récentes rapportent l'acquisition de signaux de BRET localisés au sein de la cellule à l'aide de la microscopie (Coulon et al., 2008; Goyet et al., 2016). En dehors de ces études encore rares, dans la très grande majorité des cas, en BRET, on mesure les signaux sur des populations de

cellules. De par sa facilité d'usage, le BRET s'avère être technique extrêmement utile en pharmacologie moléculaire (Hamdan et al., 2007; Schann et al., 2013).

Le BRET est un phénomène naturel qui se produit chez certains être vivants, tels la pensée de mer *Renilla reniformis* et la méduse *Aequorea victoria*. Chez ces organismes, l'enzyme luciférase, une protéine bioluminescente, catalyse l'oxydation de son substrat, la coelentérazine, ce qui s'accompagne d'une émission de lumière avec un pic d'émission à 480 nm. Dans ces organismes, la proximité de la GFP permet un transfert d'énergie non radiatif de la luciférase vers la GFP.

Expérimentalement, plusieurs générations de BRET se sont historiquement succédées. Le test de BRET dit de première génération, ou BRET1, utilise la Luciférase de *Renilla reniformis* comme donneur d'énergie en présence Coelenterazine H (ci-après dénommée Renilla Luciferase, ou rLuc), avec un pic d'émission à 480 nm, et la "Yellow-fluorescent protein" (YFP) comme accepteur d'énergie, laquelle est excitée à 512 nm et réémet à 530 nm ((Angers et al., 2000), Fig. 1 et Fig. 4). On mesure le signal de BRET en faisant le rapport entre l'intensité de lumière recueillie au pic d'émission de l'accepteur, sur l'intensité de lumière recueillie au pic d'émission du donneur. À ce signal de BRET brut doit être soustrait le signal obtenu uniquement en présence de la luciférase dans les mêmes conditions expérimentales, pour obtenir le BRET net. Ce test de BRET1 est très lumineux mais souffre d'une faible séparation entre les pics d'émission du donneur et de l'accepteur d'énergie ainsi que d'un recouvrement seulement partiel entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. Le test dit de BRET de deuxième génération, ou BRET2, utilise également la rLuc comme donneur d'énergie mais en présence d'un substrat modifié, la deep-blue coelenterazine (deep Blue C), qui présente une émission à 400 nm, ainsi qu'une GFP modifiée (la GFP10 ou GFP2) possédant un déplacement de Stokes important avec un pic d'absorption à 400 nm et un pic d'émission à 515 nm ((Bertrand et al., 2002), Fig. 4). Le recouvrement quasi parfait entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur, ainsi que la grande séparation entre les pics d'émission respectifs du donneur et de l'accepteur font que ce test est réputé plus sensible que le test de BRET1. Ceci est expliqué par un BRET de base intrinsèquement faible et par le fait que le R_0 du couple rLuc (Deep Blue Coelenterazine) / GFP2, soit la distance permettant 50% de l'efficacité de transfert maximale, est supérieur au R_0 du couple rLuc (Coelenterazine H) / YFP, suggérant que le BRET2 permet de mesurer des transferts d'énergie à plus longue distance que le BRET1 (Dacres et al., 2012). Néanmoins, la Deep Blue Coelenterazine émet une lumière ~300 fois moins brillante et qui diminue en intensité trois fois plus rapidement que la Coelenterazine H (Hamdan et al., 2006), ce qui nécessite de multiples précautions lors de son utilisation.

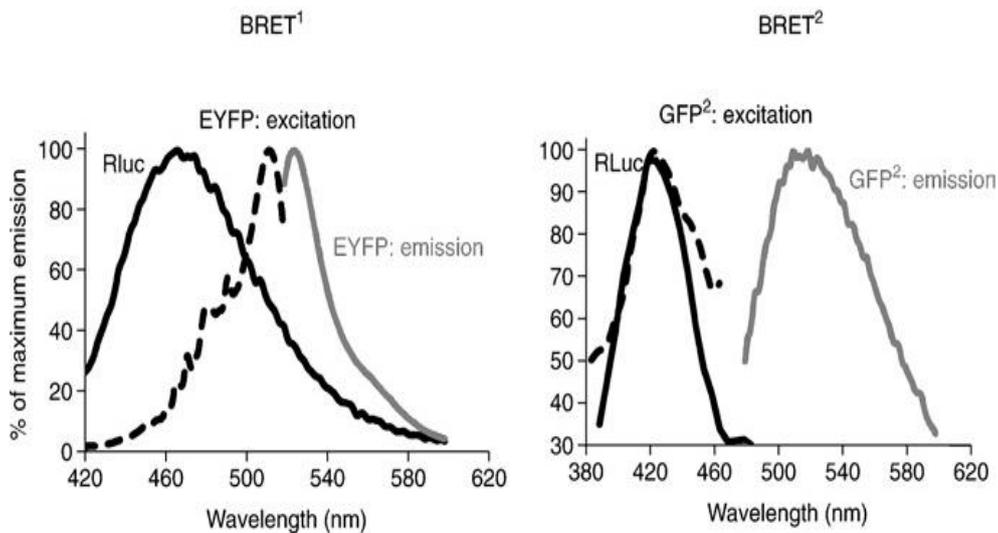


Figure 4 : Spectres d'absorption et d'émission de la Luc et de la YFP en BRET1 et de la Luc et de la GFP2 en BRET2 (d'après (Hamdan et al., 2007)).

Les lumières jaunes et vertes étant fortement absorbées par les tissus, les tests de BRET1 et BRET2 n'étaient pas adaptés à des mesures sur des animaux modèles. Récemment le groupe de Gambhir, aux USA, a mis au point plusieurs tests de BRET novateurs qui permettent le suivi des signaux de BRET dans les tissus d'animaux modèles en réalisant un décalage bathochrome (vers le rouge) de la longueur d'onde d'émission de la Luciférase, l'absorption des photons rouges par les tissus étant minimisée. Les chercheurs du groupe de Gambhir ont en premier réalisé une octuple mutation de la Rénilla Luciférase (A55T, C124A, S130A, K136R, A143M, M185V, M253L and S287L) qui a grandement amélioré la brillance de l'enzyme en particulier du fait d'une plus grande stabilité et d'un meilleur rendement quantique. Ce mutant a été dénommé rLuc8 (Loening et al., 2006). L'enzyme rLuc8 a ensuite été mutée afin de décaler son spectre d'émission vers le rouge (Loening et al., 2007). L'utilisation conjointe de ces différentes Luciférase avec des accepteurs fluorescents compatibles (mOrange ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 548/564 nm), TagRFP ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 562/595 nm)) et TurboFP635 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 588/635 nm) a permis l'avènement de tests BRET ayant un fort potentiel pour des applications *in-vivo* du fait des longueurs d'ondes fortement décalées dans le rouge et présentant une bonne séparation spectrale entre le pic d'émission du donneur et de l'accepteur ((Dragulescu-Andrasi et al., 2011), Fig. 5).

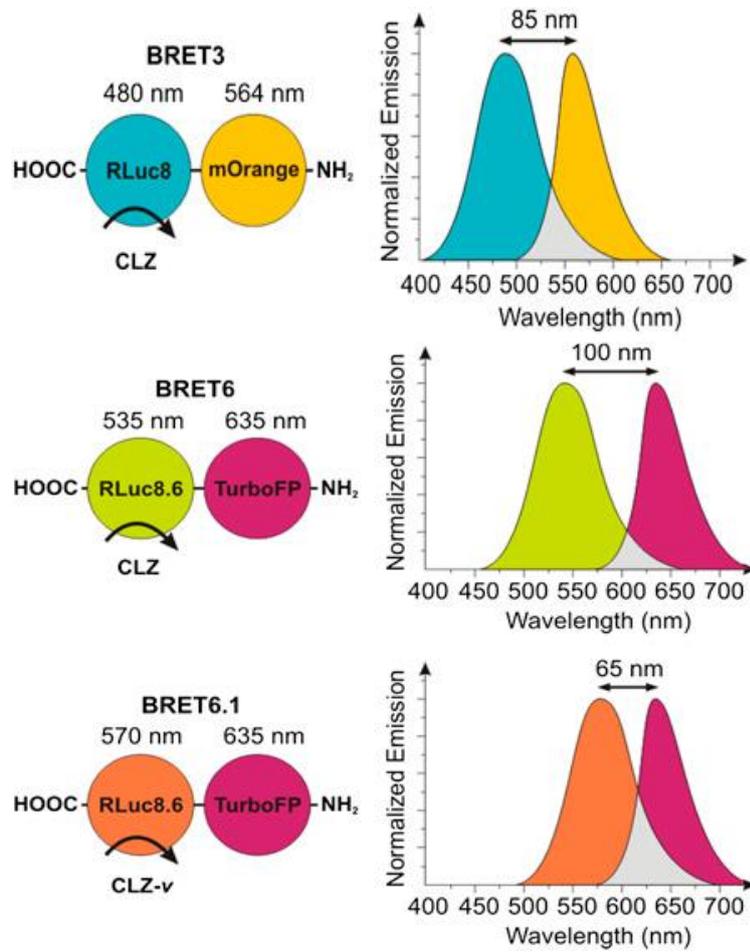


Figure 5 : Différents tests de BRET permettant une mesure au sein de tissus sur animal modèle. Toutes les constructions possèdent une séquence de 18 résidus acides aminés entre les groupements donneur et accepteur. La Luciférase utilise soit la Coelenterazine H (CLZ), soit la coelenterazine synthétique (CLZ-v), qui accroît encore plus le décalage bathochrome du pic d'émission de la rLuc 8.6. (d'après (Dragulescu-Andrasi et al., 2011)).

6 Etude de la SUMOylation de la protéine PML : activités de recherche sur la période Octobre 2005 à Août 2009.

Après avoir obtenu mon poste de chargé de recherche au C.N.R.S., j'étais affecté à l'UPR9045² dirigée par Michael Tovey pour y travailler dans l'équipe de Mounira Chelbi-Alix à partir du 1^{er} Octobre 2005. En collaboration avec l'équipe du Pr Muriel Aubry à l'université de Montréal, j'entamais des recherches visant à mieux caractériser le rôle et la dynamique de la SUMOylation de la protéine PML. Après un bref rappel du contexte scientifique du sujet, j'exposerai l'historique de mes travaux depuis mon entrée au C.N.R.S. en octobre 2005 jusqu'à mon départ effectif de l'équipe de Mounira Chelbi-Alix en Juillet 2009.

6.1 Rappel du contexte scientifique

6.1.1 Modification des protéines par SUMO

L'Ubiquitine est une petite protéine régulatrice qui est ubiquitaire et extrêmement conservée chez les eucaryotes. L'Ubiquitination fait référence à la modification post-traductionnelle d'une protéine donnée par l'attachement covalent d'un ou plusieurs monomères d'Ubiquitine (Glickman and Ciechanover, 2002) sur des résidus Lysine de la protéine cible. Ses fonctions ont été élucidées au début des années 1980 (Hershko et al., 1979; Hershko et al., 1980) et les auteurs de ces travaux ont reçu le prix Nobel de chimie en 2004.

Comme l'Ubiquitination, la SUMOylation est une modification post-traductionnelle qui se caractérise par l'attachement covalent d'une protéine de la famille SUMO sur un ou plusieurs résidus lysines d'une protéine cible (Saitoh et al., 1997). Cependant, alors que l'ubiquitination était alors connue pour principalement conduire les protéines modifiées à la dégradation par le protéasome 26S, la SUMOylation était connue pour être impliquée dans de nombreux processus cellulaires : translocation de protéines au noyau, régulation de l'activité de facteurs de transcription, formation de structures sub-nucléaires, croissance cellulaire, tumorigenèse, ou encore réponse aux agents thérapeutiques. Ainsi, PML, Mdm2, c-Myb, c-Jun, Rb et p53 sont toutes des protéines oncogéniques ou suppresseurs de tumeur qui sont modifiées par SUMO. Cependant, la signification fonctionnelle de la SUMOylation de ces protéines dans le cancer était encore peu étudiée à mon arrivée en 2005.

La modification des protéines par SUMO est un processus réversible (Seeler and Dejean, 2001; Verger et al., 2003). Ce processus est fondamental car l'inactivation du gène codant pour SUMO1 est létale chez la souris. La famille des protéines SUMO comporte à ce jour

² Unité d'Oncologie Virale, Institut André Lwoff, Villejuif (94).

cinq paralogues nommées SUMO 1 à 5, SUMO 4 n'étant exprimée que dans le rein. De manière comparable à l'ubiquitine, l'addition de SUMO sur une cible protéique peut être mono- ou polymérique. La protéine cible doit comporter une séquence de type $(\psi)KXE$ pour être SUMOylée. L'addition de SUMO résulte de trois réactions successives : l'activation de la protéine SUMO (Enzyme 1, E1), sa conjugaison (E2) et sa ligation à la protéine cible (E3). Cette dernière étape est réalisée par des membres de la famille des E3 SUMO-ligases, caractérisées, entre autres, par un domaine de type « RING finger ». Il est à noter que la seule E2 connue à ce jour pour SUMO est la protéine UBC-9. Bien que la SUMOylation soit une modification post-traductionnelle covalente, des protéases spécifiques du groupement SUMO, tel SENP1 ou SUSP1 assurent de manière dynamique la désSUMOylation (Bossis and Melchior, 2006). Dans nombre de cancers, il existe une dérégulation du niveau global de UBC-9 ou bien des enzymes de dé-SUMOylation. Ceci montre l'importance de la régulation de la SUMOylation dans le développement des tumeurs (Baek, 2006; Mikkonen, 2013).

6.1.2 La SUMOylation de PML est induite par l'Arsenic.

Le gène *PML* (Promyelocytic Leukaemia) a été découvert dans la LAP (Leucémie Aiguë Promyélocytaire) (Grignani et al., 2000). Comme toutes les leucémies, la LAP se caractérise par la transformation maligne d'un progéniteur et de son expansion lors de l'hématopoïèse. Au niveau moléculaire, la LAP se caractérise par la translocation chromosomique $t(15 ; 17)(q22 ; q21)$ qui crée une fusion des gènes **PML (promyelocytic leukemia)** et **RAR α** aboutissant à la synthèse de l'oncoprotéine PML/RAR α . Cette protéine chimère se comporte comme un dominant négatif et exerce ses effets transformants en interférant avec la fonction des récepteurs nucléaires, ce qui conduit à un blocage de la différenciation cellulaire. PML/RAR α délocalise PML d'une structure intranucléaire multiprotéique, dénommée « corps nucléaires PML », ce qui aboutit à une dérégulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose (Bobé and Chelbi-Alix, 2008).

Cette maladie est guérie par le traitement combiné de l'arsenic (As_2O_3) et de l'acide rétinoïque en induisant respectivement l'apoptose et la différenciation. Fait intéressant, les deux agents induisent la dégradation de PML/RAR α . C'est l'utilisation récente de l' As_2O_3 comme agent thérapeutique dans la LAP qui a conduit un certain nombre de laboratoires, dont celui de M. Chelbi-Alix, à analyser les effets de l'arsenic sur la protéine PML (Bobé and Chelbi-Alix, 2008).

PML est une phosphoprotéine appartenant à la famille "RBCC" caractérisée par la présence de quatre motifs (RING finger, deux boîtes B, un domaine coiled-coil (Jensen et al., 2001), fig. 6). Du fait d'épissages alternatifs d'un gène unique, il existe 7 isoformes de PML (PML I à VII) ayant toutes le motif "RBCC" mais des extrémités C-terminales différentes.

Un traitement de cellules avec 1 μM d' As_2O_3 induit successivement la phosphorylation de PML via la voie ERK, sa SUMOylation et son transfert du nucléoplasme vers les corps nucléaires. La protéine PML est modifiée de façon covalente par SUMO au niveau des lysines 65, 160 et 490. La modification par SUMO semble contrôler la répartition nucléaire de PML : la forme non modifiée est nucléoplasmique tandis que la forme conjuguée à SUMO est exclusivement associée aux corps nucléaires (CN) PML (Müller et al., 1998; Seeler and Dejean, 2001) (fig. 6). PML est responsable de la formation des CN PML, puisque ces structures n'existent pas dans les cellules invalidées pour le gène de PML (PML^{-/-}).

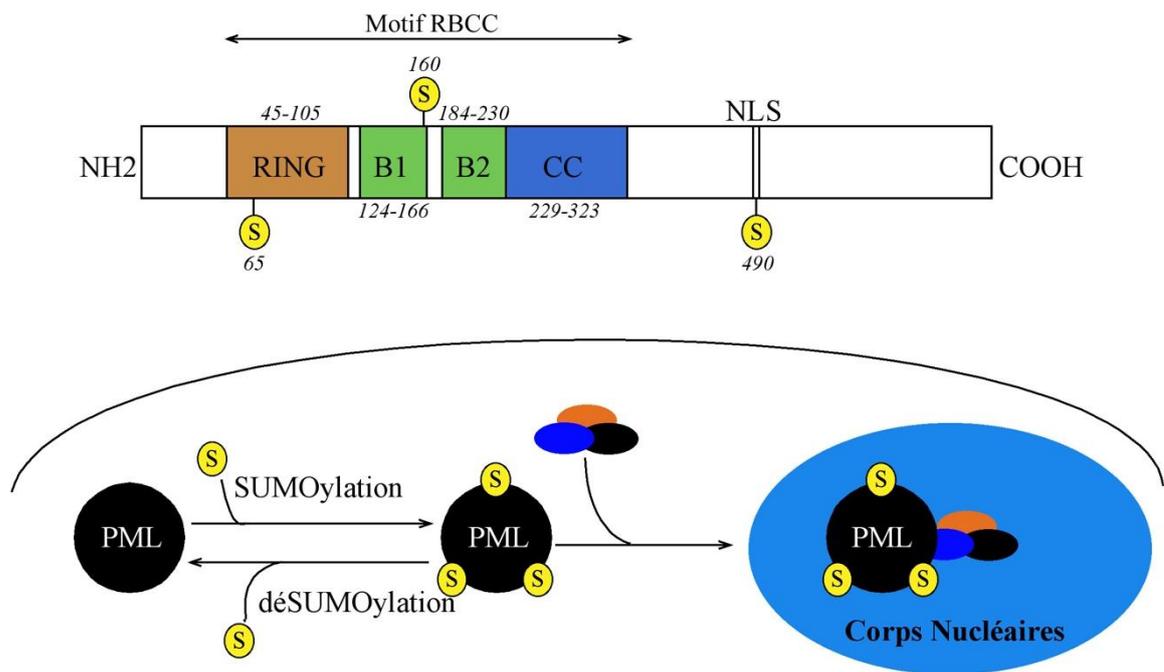


Figure 6 : Structure de PML et formation des Corps Nucléaires. Haut) Représentation schématique de la structure primaire de la protéine PML. Bas) La sumoylation de PML entraîne son transfert du nucléoplasme vers les corps nucléaires PML et favorise son interaction avec d'autres protéines présentes dans les CNs.

Plusieurs protéines ont été identifiées comme faisant partie des CN PML, certaines sont impliquées dans l'apoptose (p53), d'autres dans la transcription (CBP), la réparation de l'ADN (Chk2) ou encore la réponse antivirale (ISG20, Sp100, protéine Mx). PML et les corps nucléaires ont de fait été impliqués dans nombre de processus cellulaires très importants. Au milieu des années 2000, on commençait à peine à comprendre les mécanismes impliqués dans ces effets mais il apparaît clairement que la SUMOylation de PML était un événement fondamental dans l'organogenèse des CN.

6.2 Etude de la SUMOylation de PML sur cellule vivante grâce au BRET

L'étude de la SUMOylation était habituellement réalisée à l'aide de techniques classiques de biochimie cellulaire (CO-IP, purification sur colonne d'affinité, Immunodétection, etc.). Malheureusement ces techniques sont souvent limitées par la faible quantité de protéines SUMOylées au sein des cellules et les techniques de préparation des extraits cellulaires ne permettent pas véritablement d'appréhender la SUMOylation dans un contexte cellulaire.

J'ai voulu appliquer le BRET à l'interaction PML/SUMO car l'établissement d'un tel test sur cellule vivante offrait une opportunité unique d'analyser très rapidement l'état et le rôle de la SUMOylation de PML dans différentes conditions de stress, et notamment en présence d'As₂O₃.

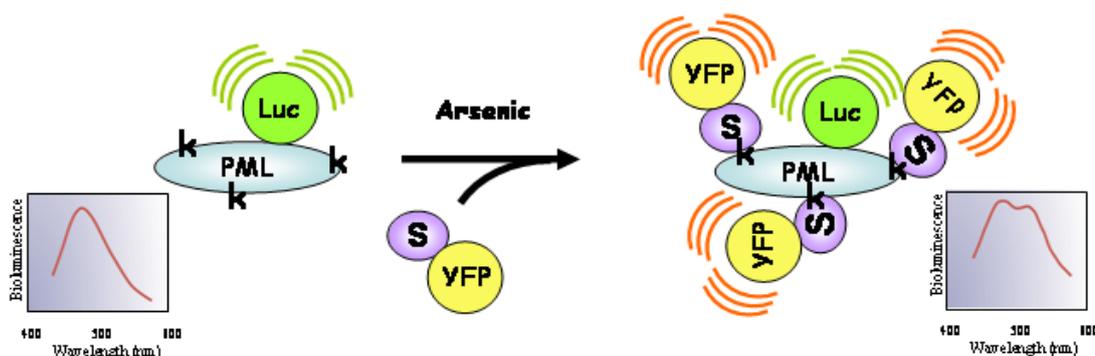


Figure 7 : Utilisation du BRET dans l'analyse de la SUMOylation de PML. Les protéines de fusion PML-Luciférase et YFP-Sumo sont co-exprimées au sein de cellules de mammifères. Après induction de la SUMOylation de PML par l'Arсениc, un signal de BRET apparaît du fait du transfert d'énergie entre la luciférase et la YFP. S : Sumo; Luc: Luciférase ; k : Lysine.

Afin de déterminer si le BRET est utilisable pour étudier la SUMOylation de PML, j'ai dans un premier temps, construit les cDNA codants pour les protéines de fusion entre PML et la Luciférase, ainsi qu'entre la protéine SUMO et YFP. Dès les premiers tests, nous avons pu mesurer un signal positif de BRET entre PML-Luc et YFP-SUMO1, signal qui était de surcroît modulable positivement par l'As₂O₃ (Fig. 7). A partir de ces observations initiales, nous avons, en collaboration étroite avec l'équipe du Pr. Muriel Aubry à l'université de Montréal, mené une étude approfondie dont voici les principaux résultats :

1. Nous avons montré que le BRET peut être une technique très puissante d'analyse de la SUMOylation de PML sur cellules vivantes et en temps réel. Nous avons validé la spécificité du signal grâce à l'aide de mutants, ce qui nous a permis de séparer le signal en analysant toutes ses composantes. Nous avons ainsi pu montrer que le signal de BRET obtenu était composé à la fois de la liaison covalente de SUMO sur les trois lysines de PML qui sont la cible de cette modification, et à la fois de la liaison non-

covalente de SUMO sur PML via le motif SBD (SUMO-Binding Domain) composé des résidus VVVI en position 556.

2. L'As₂O₃ augmente uniquement la liaison covalente de PML à SUMO. Les événements de liaison covalente et non-covalente de PML à SUMO ne sont en aucune manière interdépendants.
3. La puissance de l'As₂O₃ à entraîner la SUMOylation de PML est la même vis-à-vis des trois paralogues SUMO 1, 2 et 3.
4. Les protéines SUMO 1, 2 et 3 ne peuvent aucunement interagir de manière non-covalente avec PML sous leur forme libre. Elles doivent être obligatoirement complexées à une autre protéine (comme RNF4 par exemple) pour interagir avec le SBD de PML.
5. Le motif polysérine existant dans le voisinage direct du SBD régule directement les fonctions du SBD, probablement de par son niveau de phosphorylation.
6. Nous avons enfin approfondi la relation entre la sumoylation, l'ubiquitinylation et la dégradation de PML. Nous montrons que la SUMOylation est indispensable à la dégradation de PML, car de la SUMOylation de PML dépend son interaction avec une Ubiquitine E3 ligase SUMO dépendante nommée RNF4, et donc la dégradation par le protéasome. Nous avons pu également montrer que bien que la protéine PML mutée dans son domaine SBD interagisse toujours avec RNF4, sa capacité à être dégradée par l'As₂O₃ est réduite. Ceci montre l'existence d'étapes supplémentaires dans la dégradation de PML par l'As₂O₃, peut-être indépendantes de RNF4,.

Les résultats ci-dessus résumés ont fait l'objet d'une publication dans J. Biol. Chem (Percherancier et al., 2009):

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 24, PP. 16595–16608, JUNE 12, 2009
© 2009 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

Role of SUMO in RNF4-mediated Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Degradation

SUMOYLATION OF PML AND PHOSPHO-SWITCH CONTROL OF ITS SUMO BINDING DOMAIN DISSECTED IN LIVING CELLS*

Received for publication, February 20, 2009, and in revised form, April 9, 2009. Published, JBC Papers in Press, April 20, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.006387

Yann Percherancier^{†1}, Delphine Germain-Desprez^{§1,2}, Frédéric Galisson[‡], Xavier H. Mascle[§], Laurent Dianoux[‡], Patricia Estephan[§], Mounira K. Chelbi-Alix^{†3}, and Muriel Aubry^{§4}

7 Effets des champs électromagnétiques sur la matière vivante : activités de recherche depuis Septembre 2009.

Les recherches concernant les effets biologiques des champs électromagnétiques (CEM) sur la matière vivante ont commencé dès le début du 20^{ème} siècle avec les recherches de A. d'Arsonval. Depuis les années 50 et jusqu'au début des années 90, les recherches portaient principalement sur les effets potentiels des fréquences des courants domestiques (50/60 Hz). Durant les vingt dernières années, une attention particulière a été portée sur les champs radiofréquences (RF) des communications sans fils. Outre l'aspect fondamental de ces recherches, celles-ci répondent à une demande sociétale forte. En effet, depuis quelques années, on note une préoccupation croissante pour de possibles effets néfastes sur la santé de l'exposition aux champs électromagnétiques radiofréquences, tels que ceux qui sont émis par les appareils de communication sans fil.

Après avoir rappelé brièvement la notion de rayonnement électromagnétique ainsi que les propriétés physiques des champs basses-fréquences et radiofréquences, j'introduirai l'importance des études en bioélectromagnétisme au regard du contexte socio-économique actuel. J'exposerai enfin les approches expérimentales que j'ai mis en œuvre, depuis mon arrivée au laboratoire IMS en 2009, pour déterminer les effets des champs électromagnétiques sur le vivant aux niveaux cellulaire et moléculaire.

7.1 Introduction au bioélectromagnétisme

7.1.1 Notions sur le rayonnement électromagnétique

Les rayonnements électromagnétiques (REM) sont une forme de transport de l'énergie sans support matériel. En 1865, Maxwell formula une grande synthèse de tous les phénomènes électriques et magnétiques, les fameuses "équations de Maxwell". En combinant ces équations, il réussit à montrer qu'une onde électromagnétique plane associe un champ électrique sinusoïdal \vec{E} , exprimé en volts par mètre (V/m), et un champ magnétique \vec{H} , de même période, exprimé en ampères par mètre (A/m). Il est à noter que le champ magnétique est plus souvent caractérisé par la densité de flux magnétique ou induction magnétique \vec{B} (couramment dénommé champ magnétique) exprimée en Teslas (T), que par son intensité \vec{H} , ces deux grandeurs étant liées par la relation $\vec{B} = \mu \vec{H}$ où μ représente la perméabilité magnétique du milieu.

A chaque instant, les champs \vec{E} et \vec{H} sont perpendiculaires et situés dans un même plan. Lorsqu'ils ne rencontrent pas d'obstacles, ils se propagent dans une direction perpendiculaire à ce plan (Fig. 8). Dans le vide, la propagation est rectiligne et se fait à la vitesse de la lumière, soit environ 3×10^8 m/s. Cette propagation s'accompagne d'un flux d'énergie,

proportionnel au produit des amplitudes de \vec{E} et de \vec{H} , qui est exprimé en watts par mètre carré (W/m^2).

Les ondes électromagnétiques se caractérisent par un ensemble de paramètres comprenant la fréquence (f), la longueur d'onde (λ), l'intensité de champ électrique, l'intensité de champ magnétique, la polarisation électrique (P) (direction du champ E), la vitesse de propagation (c) et le vecteur de Poynting (S). La figure 8 illustre la propagation d'une onde électromagnétique dans l'espace. La fréquence est définie par le nombre de cycles complets décrits par le champ électrique ou magnétique en un point donné en une seconde. Elle est exprimée en hertz (Hz). La longueur d'onde est la distance entre deux crêtes ou deux creux consécutifs. La fréquence f , la longueur d'onde λ et la vitesse de propagation (v) sont liées par la formule :

$$v = f\lambda$$

La vitesse de propagation d'une onde électromagnétique dans l'espace est égale à la vitesse de la lumière. Dans un milieu, elle dépend des propriétés électriques du milieu, qui sont définies par sa permittivité (ϵ) et sa perméabilité (μ). La permittivité mesure l'interaction du milieu avec le champ électrique tandis que la perméabilité mesure son interaction avec le champ magnétique. Les substances biologiques ont une permittivité très différente de celle du vide, qui dépend de la longueur d'onde (surtout dans la gamme des radiofréquences) et du type de tissu. Lorsqu'un rayonnement électromagnétique traverse un milieu biologique, sa vitesse de propagation diminue et sa longueur d'onde devient plus courte du fait de l'absorption par les tissus d'une partie de l'énergie électromagnétique. Cependant, la perméabilité des substances biologiques est égale à celle du vide. En d'autres termes, les champs magnétiques nous traversent librement.

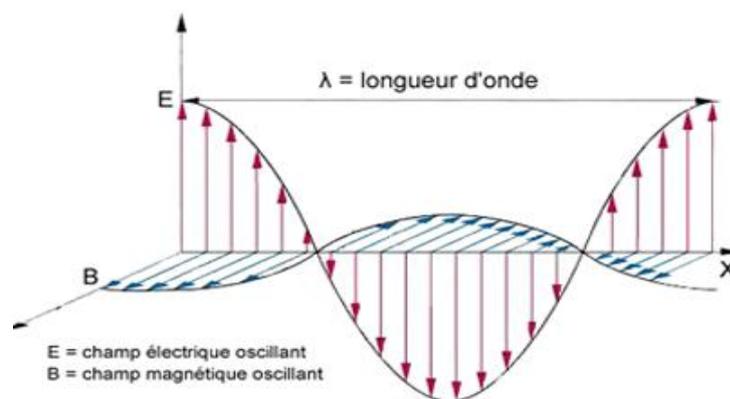


Figure 8 : Schéma d'une onde électromagnétique plane se propageant dans l'axe X. Les composantes électrique (E) et magnétique (B) de l'onde sont représentées dans les axes Y et Z.

Pour une onde plane, le rapport constant de la valeur du champ électrique et de la valeur du champ magnétique est connu sous le nom d'impédance caractéristique (Z):

$$Z = E/H$$

Dans le vide, $Z = 120 \pi \sim 377 \Omega$. Dans les autres cas, Z dépend de la permittivité et de la perméabilité du milieu que l'onde traverse.

Le transfert d'énergie est décrit par le vecteur de Poynting, qui représente la valeur et la direction de la densité de flux électromagnétique :

$$S = E \times H$$

Dans le cas d'une onde de propagation, l'intégrale de S sur une surface représente la puissance instantanée transmise à travers la surface (densité d'énergie). La longueur du vecteur de Poynting est exprimée en watts par mètre carré (W/m^2) (on trouve dans certains documents l'unité mW/cm^2 qui, convertie en unités SI, vaut $10 W/m^2$). Pour une onde plane, elle est liée aux valeurs du champ électrique et du champ magnétique par la formule :

$$S = E^2/377$$

et

$$S = 377 H^2$$

Les conditions d'exposition que l'on rencontre en pratique ne peuvent pas toutes être représentées par des ondes planes. C'est en particulier le cas à proximité des sources de rayonnement RF. Le champ électromagnétique rayonné par une antenne peut être subdivisé en deux régions : le champ proche et le champ lointain, la limite entre les deux étant ordinairement placée à :

$$r = 2a^2/\lambda$$

où a est la plus grande dimension de l'antenne.

En champ proche, l'exposition doit être caractérisée tant par le champ électrique que par le champ magnétique. En champ lointain, un seul des deux champs suffit parce qu'ils sont liés par les équations précédentes incluant E et H . En pratique, le cas du champ proche est souvent réalisé aux fréquences inférieures à 300 MHz.

7.1.2 Spectre électromagnétique et Interaction ondes-matière

7.1.2.1 *Le spectre électromagnétique*

L'ensemble continu des fréquences possibles (théoriquement de 0 Hz à l'infini) constitue le spectre électromagnétique. Le spectre est départagé en bandes de fréquences auxquelles sont associés des noms spécifiques. Comme mis en évidence Fig. 9, les domaines d'application des champs électromagnétiques varient en fonction des bandes de fréquence et concernent aussi bien le domaine industriel que scientifique, médical ou encore celui des télécommunications. De manière générale, les champs électromagnétiques servent soit de support pour le transport d'information soit de vecteur énergétique.

L'interaction entre un rayonnement électromagnétique et la matière peut se traduire par une diffusion sans transfert d'énergie ni changement de fréquence (diffusion élastique) ou par un transfert au matériau de tout ou partie de l'énergie du REM. Dans ce dernier cas, une partie de l'énergie peut être diffusée avec diminution de fréquence liée à la perte d'énergie dans la matière (diffusion inélastique) et une partie est absorbée. La fraction absorbée peut avoir un éventuel effet biologique. Elle peut entraîner une transition énergétique et/ou un effet thermique.

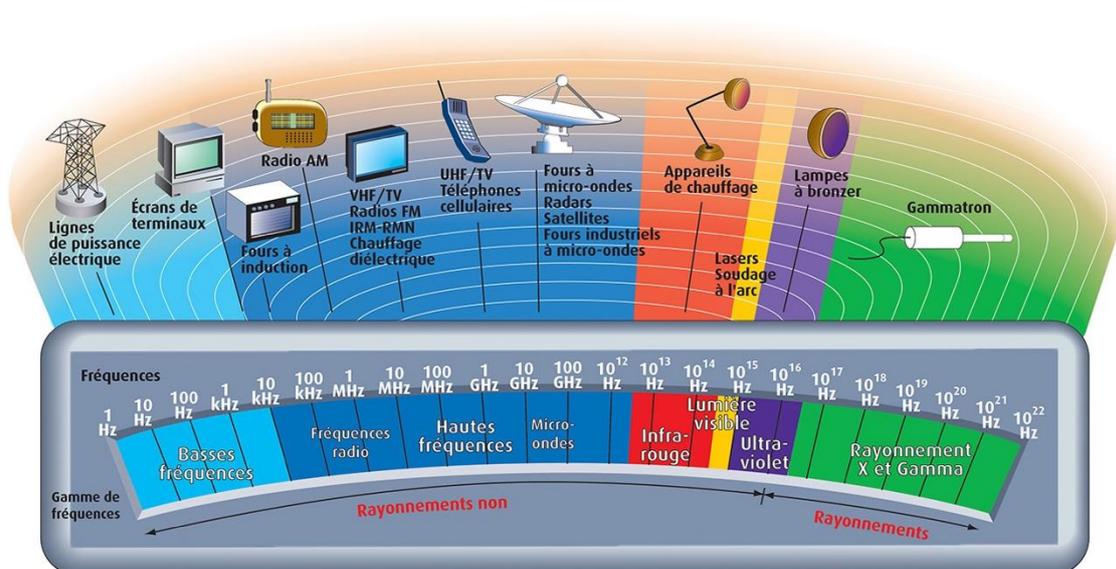


Figure 9 : Spectre électromagnétique : bande de fréquences et applications³.

7.1.2.2 Rayonnements ionisants et non-ionisants

On appelle rayonnement non ionisant tous les rayonnements électromagnétiques dont le mode primaire d'interaction avec la matière est autre que l'ionisation, à savoir tout processus par lequel un atome ou une molécule neutre acquiert une charge positive ou négative. Par convention les rayonnements non ionisants ont une énergie inférieure à 12 eV, soit une longueur d'onde supérieure à 100 nm. Ainsi les rayonnements non-ionisants vont des ELF – rayonnement de fréquence extrêmement basse tels que ceux du réseau de distribution électrique (50 Hz) – aux ultra-violets (UV) moyens. Les rayonnements UV lointains possédant une énergie supérieure à 12 eV, les rayonnements X et γ , sont dits ionisants (Fig. 9).

³ Spectre électromagnétique et émissions de quelques équipements électriques. <http://www.inrs.fr/accueil/risques/phenomene-physique/champ-electromagnetique.html>. INRS (mai 2013).

7.1.2.3 Effets thermiques

Hormis pour les ELF, ces effets peuvent se produire quelle que soit la fréquence du rayonnement électromagnétique incident.

Dans le cas de rayonnements énergétiques, tels les radiofréquences (RF), on interprète les effets thermiques comme le résultat de l'effet Joule dû à l'agitation des charges et des dipôles électriques. L'énergie absorbée est définie par l'absorption spécifique (l'énergie absorbée par unité de masse du matériau considéré, exprimée en joule par kilogramme (J/kg)), et par le débit d'absorption spécifique (DAS, ou Specific absorption rate (SAR) en anglais) qui représente l'absorption spécifique par unité de temps, et qui est exprimée en watts par kilogramme (W/kg).

Pour les fréquences extrêmement basses, les mouvements oscillants des charges de l'organisme, sous l'effet du champ électrique, sont très réduits, ce champ étant atténué très fortement quand il pénètre le corps (la peau faisant office de cage de Faraday). En revanche, le champ magnétique est très peu atténué et génère des courants induits. Ces courants sont quantifiés par l'intensité qui traverse une section donnée, grandeur appelée « densité de courant » et exprimée en ampère par mètre carré (A/m^2)

7.1.3 Interaction des champs extrêmement basse fréquence avec la matière vivante

La notion de champ est utilisée en physique pour traduire l'influence que peut exercer, à distance, un objet sur son environnement. Les champs électriques et magnétiques d'extrêmement basse fréquence (EBF, aussi nommé extremely low frequency (ELF) fields en anglais) se situent entre 1 Hz et 300 Hz et font partie intégrante du spectre électromagnétique. Dans le cas des champs EBF, le champ électrique \vec{E} et le champ magnétique \vec{H} doivent être considérés séparément. Compte tenu, en effet, des très grandes longueurs d'onde associées à ces basses fréquences (environ 6000 km à 50Hz), les mesures sont toujours effectuées dans la zone dite de « champ proche » où \vec{E} et \vec{H} ne sont pas dans un rapport constant comme c'est le cas pour les hautes fréquences. Comparé à ces longueurs d'onde, les systèmes biologiques sont extrêmement petits, si bien que le champ électrique et le champ magnétique interagissent séparément avec eux. À ces fréquences, c'est le champ magnétique qui a donc été le plus étudié.

Alors que les champs électriques ne sont associés qu'à la présence d'une charge électrique, les champs magnétiques sont créés par le mouvement physique d'une charge électrique (courant électrique). Un champ électrique, \vec{E} , exerce une force sur une charge électrique et s'exprime en volt par mètre (V/m). De façon analogue, les champs magnétiques peuvent exercer des forces physiques sur des charges électriques, si ces charges sont en mouvement et/ ou si le champ magnétique est variable dans le temps. Les champs électriques

et magnétiques ont une intensité et une direction (ce sont donc des vecteurs). Tel qu'énoncé précédemment, un champ magnétique peut être spécifié de deux façons : comme densité de flux magnétique, B , exprimée en tesla (T), ou comme force de champ magnétique, H , exprimée en ampère par mètre (A/m). L'exposition à des champs électriques ou magnétiques variables dans le temps génère des champs électriques internes et des courants à travers le corps, ainsi qu'une absorption d'énergie dans les tissus ; l'intensité de ces phénomènes varie selon les mécanismes de couplage et la fréquence. Les champs magnétiques EBF induisent des courants électriques dans le tissu qui circulent en boucles dans des plans orthogonaux à la direction d'incidence du champ. La relation entre un champ magnétique variant dans le temps et le champ électrique induit dans les tissus est exprimée par la loi de Lenz-Faraday. Cette loi indique que la force électromotrice induite dans un bobinage fermé, placé dans un champ magnétique, est proportionnelle à la variation au court du temps du flux du champ magnétique qui traverse le circuit :

$$\frac{\partial B}{\partial t} = -\nabla \times E$$

où $-\nabla \times E$ exprime le rotationnel du champ E .

Un champ électrique interne E_i magnétiquement induit dans les tissus, entrainera l'apparition de courant électrique dont la densité, J , exprimée en Ampères par mètre carré (A/m^2), peut être calculée à partir de la loi d'Ohm : $J = \sigma E_i$; dans laquelle σ représente la conductivité électrique du milieu, en Siemens par mètre (S/m), et E_i le champ électrique interne.

La matière vivante, composée de matériaux diélectriques peu conducteurs et hétérogènes, est essentiellement non magnétique et l'interaction avec les rayonnements électromagnétiques est due au champ électrique ou aux courants électriques induits à l'intérieur de l'organisme cible. L'intensité des champs électriques internes dépend de nombreux facteurs. Les organismes humains et animaux provoquent des perturbations significatives de la distribution spatiale des champs électriques basses fréquences. Aux basses fréquences, le corps est un bon conducteur, et les lignes de champ perturbées à l'extérieur du corps sont pratiquement perpendiculaires à la surface corporelle. Des mouvements de charges à la fréquence du champ externe apparaissent à la surface du corps exposé et génèrent ainsi des courants à l'intérieur du corps. En ce qui concerne les champs magnétiques, la perméabilité des tissus est la même que celle de l'air, et le champ à l'intérieur des tissus est donc identique au champ externe. Les organismes humains et animaux ne perturbent pas beaucoup les champs de ce type ; leur principale interaction avec les champs magnétiques se traduit, suivant la loi de Faraday, par l'induction de champs électriques et de courants associés

à l'intérieur des tissus. Des champs électriques peuvent également être induits par mouvement dans un champ magnétique statique. Conformément à la loi de Lenz-Faraday, à partir d'un certain seuil d'intensité (5 mT), la modification rapide d'un champ magnétique induit localement une dépolarisation (potentiel d'action) de neurones placés dans ce champ. Cette dépolarisation se propage le long des axones, puis de proche en proche par l'intermédiaire des synapses, en s'atténuant avec la distance. Les normes relatives aux niveaux d'expositions environnementaux nous protègent de ce risque qui peut entraîner l'apparition de troubles visuels nommés « magnéto-phosphènes » (IARC, 2002). Signalons enfin que la Stimulation Magnétique Transcrânienne consiste à appliquer une impulsion magnétique sur le cortex cérébral à travers le crâne de façon indolore au moyen d'une bobine. Cette technique médicale est aujourd'hui utilisée dans le diagnostic et dans le traitement de certaines affections psychiatriques et neurologiques (Ziemann, 2017).

7.1.4 Interaction des champs radiofréquence avec la matière vivante

Les radiofréquences (RF) sont des ondes appartenant au spectre électromagnétique et qui s'étendent, en termes de fréquence, d'une centaine de kHz à une dizaine de GHz. Il n'existe pas de sources naturelles de RF. Cette bande de fréquence est utilisée par les téléphones portables, le Wi-Fi, les fours micro-ondes, etc. Une onde RF est, comme toute onde électromagnétique, composée d'un champ électrique et magnétique qui oscillent en phase, perpendiculaire l'un par rapport à l'autre et perpendiculaire à la direction de propagation (fig. 8).

Une onde RF a la capacité de se propager dans la matière, et donc dans notre organisme. Elle peut interagir avec la matière vivante en fonction de sa fréquence et de son intensité. Parmi les effets produits par les radiofréquences sur la matière vivante, on distingue ceux qui sont la conséquence du chauffage diélectrique des tissus (voir ci-dessous), encore appelés effets thermiques, et ceux qui peuvent résulter d'éventuelles autres interactions biophysiques, dites « non-thermiques » ou « spécifique ». À ce jour, seuls les effets thermiques ont été validés et caractérisés sur le plan de la physique.

Quand la matière vivante est exposée à un champ RF, les molécules dipolaires (les molécules dont le barycentre des charges négatives et celui des charges positives ne sont pas confondus) présentes dans la matière s'orientent en direction du champ électrique, et suivent l'oscillation de ce champ. La molécule d'eau est dipolaire du fait que l'atome d'oxygène est plus électronégatif que celui d'hydrogène, et également du fait de la géométrie coudée de la molécule. Notre corps est composé d'eau pour 65% de sa masse, mais cette proportion passe à 98% si l'on considère le nombre de molécules. Dit autrement, 98% des molécules de notre corps sont des molécules d'eau. Ainsi, quand elles sont absorbées par les tissus biologiques,

les ondes RF interagissent principalement avec les molécules d'eau. Plus exactement, les molécules d'eau dans nos tissus présentent une distribution aléatoire de leurs orientations. Mais en présence d'un champ électrique continu les pôles positifs des molécules d'eau s'orientent dans la même direction que ce champ (polarisation de Debye). Dans un champ électrique ondulatoire, les pôles des molécules dipolaires alternent leur alignement avec le sens du champ électrique, et de ce fait sont en rotation autour de l'axe de symétrie de la molécule (fig. 10).

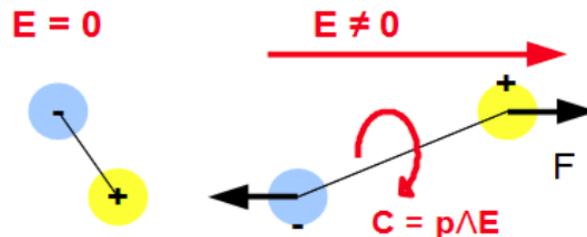


Figure 10 : Polarisation d'orientation (Debye): la présence d'un champ électrique local E a pour effet d'imposer une force F d'orientation des charges avec ce champ, et donc un couple de rotation des charges égal à $C = p \wedge E$, où p est le moment dipolaire de la molécule $p = q AB$, où A et B sont les barycentres des charges « - » et des charges « + » (d'après Frédéric Élie – <http://fred.elie.free.fr>)

Au-delà d'une fréquence de 100 MHz et avec un maximum à 20 GHz, l'eau libre ne peut plus suivre l'oscillation du champ électrique, ce qui provoque un déphasage entre les orientations du champ et les molécules d'eau. Ce phénomène est appelé "relaxation diélectrique" des molécules d'eau. Ce phénomène génère de la chaleur par frottement des molécules d'eau, qui est transmise aux différents constituants de la matière vivante par conduction. Ce phénomène est à la base du fonctionnement du four à micro-ondes.

Lorsque nous sommes exposés à un champ RF à 1 GHz, notre organisme absorbe 50% de l'onde. Les 50% restants sont réfléchis. L'absorption des RF est quantifiée par le débit d'absorption spécifique (DAS) (en anglais, specific absorption rate, SAR) exprimée en W/kg, qui représente la puissance absorbée par unité de masse de tissu, soit au niveau du corps entier, soit localement. Aucune augmentation de température stable n'est observée tant que le corps arrive à dissiper la chaleur par thermorégulation. Un effet thermique avéré, associé à une hyperthermie, est obtenu à partir d'un DAS de 4 W/kg en exposition corps entier et de 100 W/kg en exposition locale. La réglementation autorise un DAS 50 fois inférieur à ces valeurs pour les configurations correspondantes, corps entier ou locale, afin de prévenir tout échauffement excessif des tissus. Le DAS est de 0,3 W/kg environ pour un téléphone GSM en utilisation normale et cent fois plus faible avec un téléphone 3G, soit une valeur bien en dessous des 2 W/kg autorisés.

Tel qu'exposé dans le chapitre suivant, des incertitudes subsistent sur les effets non thermiques qui pourraient résulter d'une exposition de faible intensité en particulier aux champs RF environnementaux. La caractérisation d'éventuels effets non-thermiques des champs RF fait l'objet du travail scientifique présenté ci-après.

7.1.5 Contexte social et économique.

La recherche sur les effets biologiques des champs électromagnétiques (CEM) sur les systèmes vivants a commencé dans les années 1950 et est encore très active à ce jour. Ces recherches ont toujours été suscitées du fait des inquiétudes concernant les effets potentiels sur la santé de l'exposition aux CEM environnementaux, lesquels sont présents de manière ubiquitaire dans notre environnement. À la fin des années 1980 et au début des années 1990, la recherche a porté principalement sur la gamme des extrêmement basses fréquences utilisées dans les réseaux de distribution d'électricité. Au cours des 20 dernières années, l'attention s'est portée principalement sur les CEM utilisées par les communications sans fil.

La conclusion à ce jour est que les mécanismes biophysiques responsables des effets biologiques des CEM sont identifiés et bien caractérisés (comme la stimulation nerveuse induite par les EBF et le chauffage des tissus par les RF). Sur cette base, des recommandations et des normes ont été établies pour protéger la population contre les risques associés (IARC, 2002; IARC, 2013). La communauté scientifique n'a cependant pas encore résolu complètement la question des effets possibles sur la santé des champs électromagnétiques de faible intensité, allant des champs magnétiques statiques (MF) aux fréquences extrêmement basses (MF) et aux fréquences radioélectriques (RF). Soulignons encore que du fait du caractère ubiquitaire des CEM, un risque pour la santé, même faible, résultant d'une exposition aux champs électromagnétiques, pourrait avoir un impact majeur sur la santé publique. Il est donc crucial d'aborder la question de la sécurité, en utilisant tous les outils disponibles pour évaluer les risques potentiels pour la santé de l'exposition aux CEM.

Concernant les champs EBF, plusieurs études épidémiologiques ont renforcé l'hypothèse d'une association entre la leucémie infantile et les CEM émis par les lignes électriques (Ahlbom et al., 2000; Greenland et al., 2000). Ces deux études ont montré un risque constant et statistiquement significatif de leucémie chez les enfants dont l'exposition moyenne était supérieure à 0,3-0,4 μ T. Les auteurs ont conclu qu'il était peu probable d'expliquer un tel résultat par des facteurs confondants, mais qu'un biais était encore possible dans les analyses. Sur la base de ces études concordantes, l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC) a classé les champs magnétiques EBF comme « potentiellement cancérigènes pour les humains » (IARC, 2002), bien que cela ne soit ni

soutenu par des données expérimentales reproductibles et solides, ni compréhensible au regard des mécanismes impliqués. Un risque relatif de 1,7 a été rapporté en Grande-Bretagne chez les enfants résidant à la naissance à moins de 200 m de lignes à haute tension, ce qui correspond à des champs plus faibles que ceux qui étaient pointés par les analyses précédemment mentionnées (Draper et al., 2005). Environ 1 % des cas britanniques pourraient être attribuables à ces expositions. Une étude japonaise basée sur des mesures (Kabuto et al., 2006) et une étude iranienne basée sur des champs calculés (Feizi and Arabi, 2007) ont également fourni des estimations du même ordre de grandeur. Plus récemment, le projet européen ARIMMORA a confirmé la possible relation entre les champs magnétiques EBF et la leucémie infantile chez les humains, mais sans pour autant conclure quand à un mécanisme d'action défini (Schüz et al., 2016).

Concernant les recherches menées sur les effets potentiels des champs RF sur la matière vivante, malgré l'intensité des efforts de recherche sur les effets biologiques et sanitaires potentiels des RF environnementaux, nos connaissances en bioélectromagnétisme n'ont pu suivre l'évolution rapide des technologies. L'essentiel des projets de recherche a ainsi porté sur les signaux de deuxième génération (2G) de type GSM alors que l'UMTS (3G) et la 4G sont déjà largement déployées et que la 5G sera vraisemblablement déployée en 2020. S'y ajoutent le Wi-Fi, le WiMAX, les RFID et d'autres signaux émergents. L'extrapolation des connaissances issues de la 2G aux nouveaux signaux est délicate car les signaux ont des caractéristiques distinctes, en particulier en termes de modulation. De plus, ce concept d'extrapolation est rejeté par certains, notamment les groupes de pression, acteurs de la politique citoyenne en environnement-santé. Rappelons encore ici que la capacité des RF à provoquer un échauffement des tissus est parfaitement caractérisée. Des recommandations et des normes ont été définies afin de protéger les populations des risques associés. Il est bien entendu qu'aucun échauffement n'est provoqué par l'exposition aux dispositifs de communications sans fil, en raison des très faibles niveaux correspondants. Mais au regard du contexte social et économique de ce début de 21^{ème} siècle, il est capital de savoir si l'on peut totalement exclure que des effets non-thermiques des RF de faible niveau existent au niveau moléculaire au sein de la matière vivante. Bien que certains travaux tendent à montrer que les RF à bas niveau provoquent des effets cellulaires, il est également important de rappeler que de nombreuses autres études montrent une absence d'effet (pour revue : (Verschaeve et al., 2010; Verschave, 2012; IARC, 2013)). L'échauffement reste un facteur confondant important dans ces études et semble être responsable de la très grande majorité des effets rapportés dans la littérature. Toutefois, le fait qu'une hypothèse mécanistique plausible ne soit pas encore disponible (Foster and Glaser, 2007; Sheppard et al., 2008; IARC, 2013) et qu'il soit difficile de dégager des conclusions sur la base des résultats expérimentaux disponibles (Vecchia, 2009) cantonne la recherche sur les effets biologiques des RF de faible niveau dans une

impasse et entretient les craintes sociétales sur le sujet. Dans ce contexte, en mai 2011, le Centre International de Recherche sur le Cancer de l'OMS a classé les RF des téléphones portables comme cancérogènes possibles pour l'homme (Groupe 2B) (Baan et al., 2011). En France, la loi Abeille⁴, définitivement adoptée en 2015, est le premier texte de loi mettant en exergue le principe de précaution face au danger potentiel que représente les ondes électromagnétiques.

Il devient donc primordial de poursuivre l'exploration des potentiels mécanismes moléculaires des interactions des CEM, en particulier des RF, émis à des niveaux environnementaux avec une approche expérimentale originale et des systèmes biologiques simples tels que les cellules en culture, comme nous le proposons ci-dessous. Si des résultats positifs étaient acquis, cela conduirait à la caractérisation des effets moléculaires et cellulaires des RF sur le vivant, en particulier à des niveaux d'exposition environnementaux. De tels résultats contribueront sans nul doute à l'évaluation du risque sanitaire des champs radiofréquences et à d'éventuelles applications thérapeutiques.

7.2 Approches expérimentales

La connaissance des effets biologiques potentiels des champs RF et EBF à bas niveau bute actuellement sur deux verrous scientifiques : (i) l'incertitude sur les paramètres biologiquement actifs de ces champs et (ii) le manque de connaissances concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient être affectés ou mis en action par ces champs.

De nombreux articles scientifiques et rapports médicaux indiquent cependant que des champs électromagnétiques, y compris dans la gamme des RF, peuvent entraîner des effets sur divers systèmes biologiques et même présenter des propriétés thérapeutiques (Shupak, 2003). Il est important de souligner que ces champs sont différents de ceux auxquels nous sommes exposés dans notre environnement quotidien. Les champs électromagnétiques ambiants sont sinusoïdaux et de faible niveau (typiquement inférieur à 10 μ T), alors que les champs utilisés par exemple en thérapie sont de formes variées, de plus forte amplitude (généralement aux alentours du mT) et possèdent une variation temporelle élevée (typiquement supérieur à 1 T/s). Les quelques études publiées montrant des effets de ces champs sur les systèmes vivants n'ont malheureusement pas été répliquées de manière indépendante, mais pourraient nous orienter vers de nouvelles hypothèses mécanistiques si elles s'avéraient reproductibles.

La reproduction d'études en bioélectromagnétisme présentant des résultats solides m'apparut, à mon arrivée à l'IMS, comme une activité cruciale et a fait l'objet de mes

⁴ <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000030212642&categorieLien=id>

premières recherches expérimentales dans l'équipe. J'expose ces recherches, qui ont portées sur les effets des champs 50 Hz sur l'activité des jonctions GAP, dans le chapitre 7.2.1.

Un autre constat que j'avais pu faire après avoir analysé la littérature en bioélectromagnétisme était que la grande majorité des approches proposées jusqu'alors pour étudier les effets cellulaires et moléculaires des CEM consistaient en des analyses a posteriori de la matière vivante, à partir d'extraits cellulaires ou tissulaires. Il m'apparut que ce type d'approche pouvait entraîner une vision biaisée des processus biologiques soumis aux CEM, les cellules existant dans des états d'équilibre dynamique métastables par nature et souvent réversibles. Je pensais que seul le recours à des approches permettant une exploration non invasive en temps réel sur cellule vivante sous exposition aux CEM conduirait à se positionner clairement quant à l'existence d'effets biologiques causés par l'exposition aux CEM. Par ailleurs, cela rendait possible la mesure rapide et successive de plusieurs combinaisons de paramètres des champs, au sein d'une seule et même expérience, ce qui n'est pas possible en utilisant des méthodes préparatives.

Au cours des vingt dernières années, la biologie cellulaire a vu émerger de nombreuses nouvelles techniques basées sur l'électrochimie et la spectroscopie, qui permettent d'étudier en temps réel le fonctionnement du vivant à l'échelle cellulaire et moléculaire de manière non-destructrice (Trugnan et al., 2004; Fang, 2011; Neves, 2012). Étonnamment, en 2009, la recherche en bioélectromagnétisme n'avait pas encore bénéficié de ces innovations biotechnologiques. Je décidais donc de réaliser des analyses « temps réel / cellule vivante » afin d'étudier de manière non invasive le comportement de la matière vivante aux niveaux cellulaires et moléculaires au cours de l'exposition aux CEM. Je présente ci-dessous deux approches que j'ai pu mettre en œuvre concernant l'étude des effets des RF environnementaux : une première approche où l'activité de protéines possiblement cibles des effets des RF est analysée en temps réel à l'aide de la technique du BRET (chapitre 7.2.2), et une deuxième approche qui permet d'enregistrer le comportement cellulaire global sous exposition RF sans a priori sur le mécanisme d'interaction potentiel des champs avec la matière vivante (chapitre 7.2.3).

7.2.1 Effets des champs EBF 50 Hz sur les jonctions GAP

Les jonctions communicantes, aussi appelées jonctions gap ou nexus, sont des jonctions intercellulaires mettant en relation le cytoplasme de deux cellules voisines. La communication intercellulaire via les jonctions communicantes joue un rôle dans la propagation rapide de signaux électriques, la synchronisation de l'activité métabolique, la régulation de la croissance cellulaire et le développement d'organismes multicellulaires (Cronier et al., 2009). Un défaut de ces jonctions communicantes est considéré comme une étape cruciale dans les processus

menant à la carcinogenèse, et les promoteurs tumoraux sont connus pour inhiber ces jonctions (Cronier et al., 2009).

En 2009, différents travaux suggéraient que des champs EBF pouvaient moduler l'activité de diverses enzymes (Uckun et al., 1995; Nie and Henderson, 2003; Ravera et al., 2004; Funk et al., 2009), et notamment l'activité de la protéine kinase C (PKC) (Uckun et al., 1995; Tuinstra et al., 1998; Harvey and French, 1999; Hu et al., 2001; Paulraj and Behari, 2004; Manikonda et al., 2007). Les protéines PKC sont impliquées dans le contrôle de la fonction d'autres protéines via la phosphorylation des groupes hydroxyle des résidus sérine et thréonine, jouant, de fait, un rôle important dans plusieurs cascades de transduction du signal. La PKC est connue notamment pour phosphoryler les connexines, ce qui conduit à la régulation négative des jonctions GAP (Lampe and Lau, 2000). Plusieurs études montraient par ailleurs qu'une exposition à des champs 50 Hz sur une durée de 24 heures induisait une régulation négative des jonctions communicantes sur différentes lignées cellulaires, entraînant une dérégulation des connexines via un processus PKC-dépendant (Li et al., 1999; Hu et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002; Zeng et al., 2006). Ces résultats semblaient solidement étayés par des expériences montrant, en accord avec le modèle de Litovitz (Litovitz et al., 1994), que l'addition de bruit magnétique entraînait la disparition de l'effet du 50Hz sur les jonctions communicantes (Zeng et al., 2006). Ces résultats suggéraient que les champs magnétiques 50 Hz pouvaient agir comme promoteurs ou co-promoteurs de cancer mais demandaient à être reproduits de manière indépendante.

Avec l'aide de l'équipe de Stéphane Arbault au sein du groupe Nanosystème analytique (NSYSA) du laboratoire ISM, nous avons cherché à reproduire ces effets des champs 50 Hz sur la dérégulation des jonctions GAP. Je présente ci-dessous le résultat de nos recherches, qui a fait l'objet d'une publication dans la revue *Bioelectromagnetics* en 2015.

Effects of 50 Hz Magnetic Fields on Gap Junctional Intercellular Communication in NIH3T3 Cells

Yann Percherancier,^{1*} Bertrand Goudeau,² Renaud Charlet de Sauvage,¹
 Florence Poulletier de Gannes,¹ Emmanuelle Haro,¹ Annabelle Hurtier,¹
 Neso Sojic,² Isabelle Lagroye,^{1,3} Stéphane Arbault,² and Bernard Veyret^{1,3}

¹IMS Laboratory, University of Bordeaux, CNRS, Talence, France

²Institute of Molecular Sciences, University of Bordeaux, CNRS, Talence, France

³Bioelectromagnetics Laboratory, École Pratique des Hautes Études, Talence, France

The present study focused on gap junctional intercellular communication (GJIC) as a target for biological effects of extremely low-frequency (ELF) magnetic field (MF) exposure. Fluorescence recovery after photobleaching microscopy (FRAP) was used to visualize diffusion of a fluorescent dye between NIH3T3 fibroblasts through gap junctions. The direct effect of 24 h exposure to 50 Hz MF at 0.4 or 1 mT on GJIC function was assessed in one series of experiments. The potential synergism of MF with an inhibitor of GJIC, phorbol ester (TPA), was studied in another series by observing FRAP when NIH3T3 cells were incubated with TPA for 1 h following 24 h exposure to MF. In contrast to other reports of ELF-MF effects on GJIC, under our experimental conditions we observed neither direct inhibition of GJIC nor synergism with TPA-induced inhibition from 50 Hz MF exposures. *Bioelectromagnetics* 36:287–293, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: ELF magnetic fields; fluorescence recovery after photobleaching; gap junction intercellular communication GJIC

INTRODUCTION

Normal cell growth depends on their ability to recognize and communicate with neighboring cells. Gap junctional intercellular communication (GJIC) plays an essential role in regulating cell growth, differentiation, and proliferation [Mesnil et al., 2005]. It operates via channels for exchange of ions and low molecular weight metabolites among adjacent cells without exposure to the extracellular environment. Gap junction pathways are formed on the membranes of opposing cells by a pair of hemichannels each created from six connexin (Cx) subunits. GJIC loss is a key event in the transformation of normal cells into neoplastic ones [Cronier et al., 2009] and it is well known that GJIC can be inhibited by various types of tumor promoters, such as phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), also known as phorbol-12-myristate-13-acetate or PMA [Rivedal et al., 1994]. GJIC disruption has thus been recognized as one non-genotoxic mechanism of carcinogenesis: it may occur at levels of Cx expression and transport, gap junction formation, or gap junction function [Leithe et al., 2006].

Biophysical mechanisms of the interaction of weak magnetic fields (MF) with biological systems, as well as resulting biological transduction mechanisms, have been extensively studied [WHO, 2007]. Several reports focused on GJIC as a potential target of extremely low frequency (ELF) MF, with contradictory results [Schimmelpfeng et al., 1995; Ubeda et al., 1995; Griffin et al., 2000; Yamaguchi et al., 2002; Azanza et al., 2013]. In addition to these studies, those of the Bioelectromagnetics Laboratory of Hangzhou (China) are very interesting. For several years, these authors

Conflict of interest: None.

*Correspondence to: Yann Percherancier, Laboratoire IMS/UMR 5218 CNRS, Université de Bordeaux, Bâtiment A31 351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex, France.
 E-mail: yann.percherancier@ims-bordeaux.fr

Received for review 23 December 2013; Accepted 16 February 2015

DOI: 10.1002/bem.21908
 Published online 3 April 2015 in Wiley Online Library
 (wileyonlinelibrary.com).

have shown inhibitory effects of 50 Hz MF on GJIC, using the same exposure system and cells: Chinese hamster lung (CHL) cells and NIH3T3 mouse fibroblasts [Li et al., 1999; Hu et al., 2001; Zeng et al., 2003, 2006]. These studies showed that 24 h exposure to 50 Hz MF at 0.4 and 0.8 mT not only inhibited GJIC in both CHL and NIH3T3 cells, but also enhanced GJIC suppression by TPA. MF exposure at 0.2 mT alone did not suppress GJIC but enhanced GJIC suppression induced by TPA. Exposure at lower magnetic flux density (0.05 mT) had no effect on GJIC [Li et al., 1999; Hu et al., 2001]. Expression and localization of connexin 43 (Cx43) within the cell compartment was also investigated. Under TPA treatment or MF exposure, Cx43 phosphorylation was enhanced with this protein mostly located in the vicinity of the nucleus, in contrast to its usual location in the plasma membrane [Zeng et al., 2003], while Cx43 gene transcription and protein levels did not change significantly after exposure to 0.8 mT MF [Hu et al., 2001]. Based on these findings, the authors concluded that ELF MF triggered the same signaling pathway as TPA, leading to a decrease in GJIC, with a threshold at 0.4 mT.

To further explore these molecular mechanisms of ELF MF on GJIC, we carried out preliminary experiments to confirm the effects of 50 Hz MF exposure up to 1 mT on GJIC. Experiments were based on fluorescence microscopy, using the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique to analyze the kinetics of the transport of a dye via gap junctions between NIH3T3 cells.

MATERIALS AND METHODS

Exposure System

Using plastic spacers, exposure of NIH3T3 cells was done in Petri dishes inserted at the center of a custom made vertical cylindrical coil (7.6 cm height, 9.2 cm inner diameter, and 12.3 cm outer diameter; 854 turns of enameled copper wiring, 1.2 mm diameter, 14 nested layers with 61 turns per layer) (Fig. 1) that was energized using a 50 Hz sinusoidal current (49–123 mA) produced by an autotransformer (SRV15, Française d'instrumentation, Troyes, France) plugged into the mains. MF was measured directly at the Petri dish location using a Bartington probe (Bartington Instruments, Oxford, England) at low current (12.8 mA_{rms}), to fit the linear range of the MF probe and extrapolated linearly to higher MF strengths up to 1 mT (123 mA_{rms}). Field uniformity of the MF in the plane of cultured cells was assessed using a Matlab code based on the Biot-Savart law and the structure of the coil. The field was found to be constant within

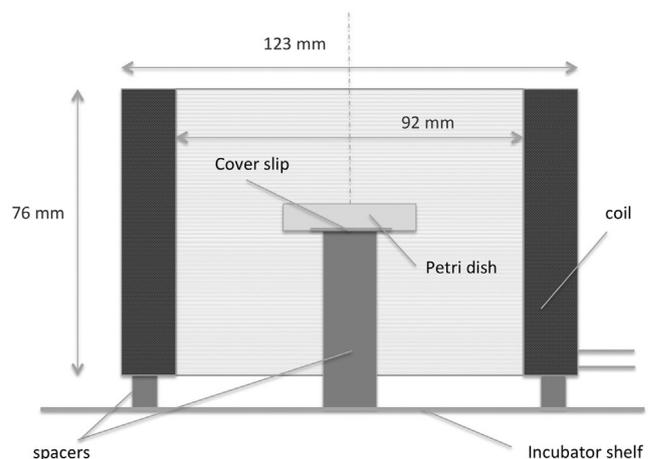


Fig. 1. Cross-section of exposure system in which cells were located on a 22 mm cover slip coaxial with, and at the mid-plane of a multi-turn, multi-layer coil of 92 mm inner diameter.

1.7% in the coil middle plane, from axis to glass coverslip edge. The coil was raised using spacers to allow good ventilation and mechanical isolation between dish and coil.

The 50 Hz background field was less than $2 \mu\text{T}$ inside the incubator. The static MF had $14.1 \mu\text{T}$ horizontal and $12 \mu\text{T}$ vertical components. Cell cultures were kept under normal growth conditions in the coils at incubator temperature of $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (monitored continuously) and 5% CO_2 atmosphere throughout the experiment. Samples were exposed for 24 h. No-field controls were placed inside nonactivated coils in a separate CO_2 incubator at the same time as experimental samples and were maintained under the same environmental conditions. Temperature variation at biological sample location was monitored using a fluoroptic thermometer (Luxtron, Santa Clara, CA; REF 790, 0.1°C resolution) coupled to a Luxtron STF—fast response immersion probe. Temperature measurements were taken at the study onset, successively in absence then in presence of 1 mT MF. The probe was inserted perpendicularly to the dish bottom with the tip of the probe in contact with the cover slip at the bottom of the Petri dish, in the center of the cover slip. During the whole temperature measurement process, the probe was left in place. Temperature measurements were done once per hour for 8 h and once more during the last hour of no-field control or EMF exposure, which lasted 24 h. Temperature was $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (mean \pm SD) throughout the experiment in both no-field control and MF-exposed conditions.

Cell Culture

NIH3T3 mouse fibroblasts (ATCC, Rockville, MD) were grown in Dulbecco minimum essential

medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, F7524; Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and a mixture of penicillin/streptomycin (Sigma–Aldrich, P4333) at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Culture medium conductivity was 1.7 S m⁻¹ at 37°C. We seeded 2 × 10⁵ cells onto 22 mm diameter glass coverslips (Dutscher, Brumath, France), placed in 35 mm diameter Petri dishes (Dutscher) with 5 ml of medium (5 mm depth). Two days after cell seeding, dishes were exposed to the 50 Hz MF field or left unexposed an additional 24 h. In an additional series of runs, cells were incubated in the presence of 20 ng ml⁻¹ TPA (P8139; Sigma–Aldrich) for the last hour of exposure before FRAP acquisition. Cell monolayers were confluent at the end of the final 24 h exposure for both exposed and non-exposed cultures (Fig. 2).

Measuring GJIC

Gap junction-mediated cell–cell communication was measured using the FRAP technique, which provides direct measurement of gap junction permeability and conductance and an estimate of GJIC functionality [Abbaci et al., 2007; Santiquet et al., 2012]. In this assay, fluorescence recovery in a previously bleached cell results from an influx of a dye from neighboring cells via gap junctions. When the bleached cell is connected by open gap-junction

channels to unbleached contiguous cells, fluorescence recovery with an exponential time course is observed.

Calcein-AM (calcein O,O'-diacetate tetrakis(-acetoxymethyl)ester; ref. 17783; Sigma–Aldrich) is a non-fluorescent, electrically neutral, highly lipophilic molecule that can permeate rapidly into cytoplasm through the cell membrane. Once inside the cell, nonspecific endogenous esterases hydrolyze acetoxymethyl groups to produce calcein (MW 622.54), a green fluorescent negatively charged molecule unable to cross the plasma membrane but able to pass from cell to cell via gap junctions.

After 23 h and 45 min of exposure, cells were rinsed twice in 1 ml warm phosphate buffered saline (PBS). Cells were then incubated in 2 ml phenol-free DMEM containing 1 μM calcein-AM and 2% FCS at 37°C to perform cell labeling for an additional 15 min under MF exposure. Cells were then rinsed twice with 2 ml warm phenol red-free DMEM to remove extracellular dye and the coverslip was mounted in a closed imaging “Ludin” chamber (Life Imaging Services GmbH, Bâle, Switzerland) filled with 1 ml pre-warmed DMEM phenol red-free containing 2% FCS.

Cells were then subjected to FRAP analysis using a laser-scanning confocal microscope, mounted on a Leica inverted microscope (Leica TCS-SP5, Heidelberg, Germany) with 40× magnification. Calcein fluorescence was excited at 488 nm by an argon ion laser and captured via a grating at 530 nm with a 30 nm band pass. The chosen measurement areas were in the central two-third area of the coverslip excluding the coverslip edge and center. Field of view diameter was 400 μm. Cells (15–20) were selected for photobleaching in each viewing field and two separate fields were measured on each coverslip. Altogether, 30–40 cells were analyzed for each independent experiment and at least three independent experiments per condition were done as indicated by the number “*n*” of independent experiments in figure legends. Cells selected for photobleaching were connected with at least four other cells and separated from another photobleached cell by at least two rows of unbleached cells. Selected cells were photobleached using an argon laser beam to reduce fluorescence by 50–70% of its original intensity. Bleached cells were then monitored for transfer of fluorescent dye from neighboring cells and examined for fluorescence recovery by scanning at 60 s intervals for a total period of 15 min (including one initial measurement immediately after photobleaching). Non-photobleached cells were monitored as controls for spontaneous photobleaching. Autofocus was adjusted before each fluorescence scan to obtain accurate measurements of the FRAP signal.

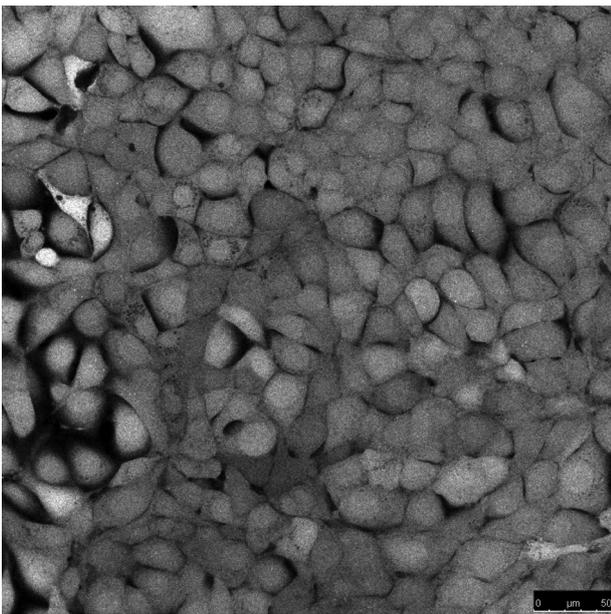


Fig. 2. Picture of a typical field of view of a FRAP experiment with NIH3T3 cells.

Quantification and Statistical Analysis

Fluorescence recovery in bleached cells was expressed using the perturbation/relaxation equation described in Salmon et al. [1984]:

$$F(t) = F_0 + (F_\infty - F_0)(1 - e^{-t/\tau})$$

where t is time in min after photobleaching, $F(t)$ is normalized fluorescence intensity measured at t , F_∞ is asymptotic limit of the fluorescence intensity, F_0 is estimated initial fluorescence intensity after photobleaching, and τ is time constant in min.

Dye transfer rate constant, K (min^{-1}), was calculated as $K = 1/\tau$, and represents effectiveness of dye

transfer between cells. Maximal fluorescent recovery R that represents the network extension between connected cells was calculated as $R = (F_\infty - F_0)/(F_i - F_0)$, where F_i is fluorescence intensity before photobleaching [Abbaci et al., 2007; Santiquet et al., 2012].

For comparisons among more than two groups, the non-parametric Kruskal–Wallis test was used. If positive, the Mann–Whitney test was used to compare each group against no-field or control group. For comparison between two groups, the Mann–Whitney test was used. GraphPad Prism v6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for statistical analysis. Probabilities of $P < 0.05$ were considered statistically significant. All values are

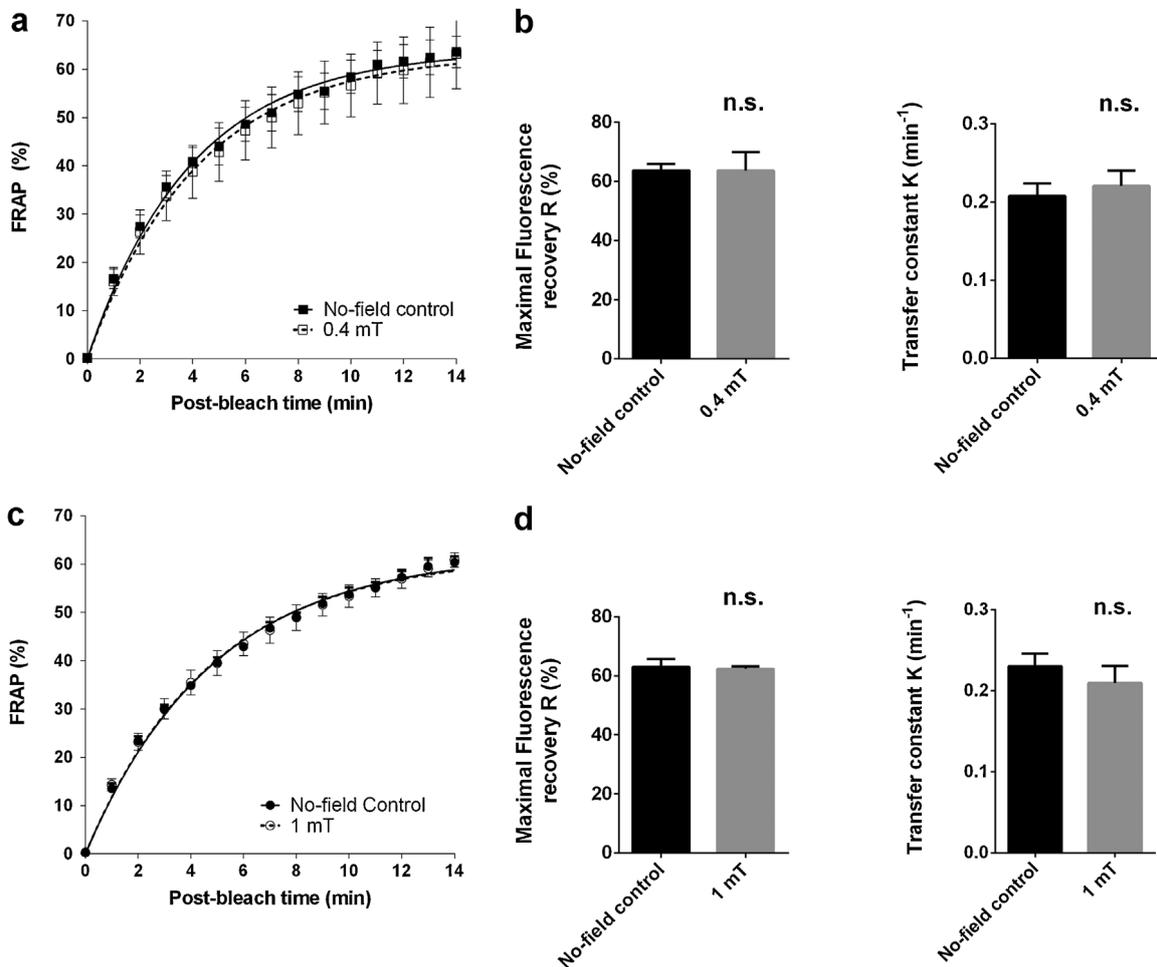


Fig. 3. **a, c**: FRAP analysis of GJIC in NIH3T3 cells, no-field and 50 Hz groups, exposed at flux density of 0.4 mT (a) or 1 mT (c) for 24 h. Each data point represents the average of four independent experiments, with 30–40 cells per condition analyzed in each independent experiment. Curves connect the mean percent recovery at each time point; vertical bars represent the mean \pm SEM. **b, d**: Nonlinear regression of fluorescence data yielded values for maximal fluorescence recovery R and transfer constant K for no-field and 50 Hz groups, exposed at a flux density of 0.4 mT (b) or 1 mT (d) for 24 h. Not significant: no difference with the no-field group (n.s., $P > 0.05$).

presented as mean ± SEM (standard error of the mean).

RESULTS

NIH3T3 cells were initially exposed to 50 Hz MF at 0.4 mT for 24 h and GJIC analyzed using the FRAP technique. Cell fluorescence was recovered under both control and exposed conditions (Fig. 3a). Statistical analysis of dye transfer rate constant and maximal fluorescence recovery data obtained for control and 0.4 mT exposures did not reveal any significant difference between the two groups (Fig. 3b). Another series of experiments was performed at 1 mT to test whether effects occurred at higher MF flux density. Again, there was no difference

in GJIC between MF exposed and control samples of NIH3T3 cells (Fig. 3c,d). In conclusion, 50 Hz MF exposures at up to 1 mT did not alter GJIC functionality in NIH3T3 cells.

We then investigated whether TPA acted in synergy with 50 Hz MF to alter GJIC functionality. As expected, incubation of NIH3T3 cells with a high dose of TPA ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ TPA) induced a major decrease in fluorescence recovery of the TPA-treated group compared to the non-treated group (Fig. 4a). Statistical analysis of results clearly indicated a decrease in both maximal fluorescence recovery (from $63 \pm 2\%$ to $43 \pm 1\%$, $P < 0.01$) and dye transfer rate constant (from 0.22 ± 0.01 to $0.07 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $P < 0.01$) following treatment of NIH3T3 cells with TPA (Fig. 4b,c). Cell incubation with TPA at a concentration of 20 ng ml^{-1}

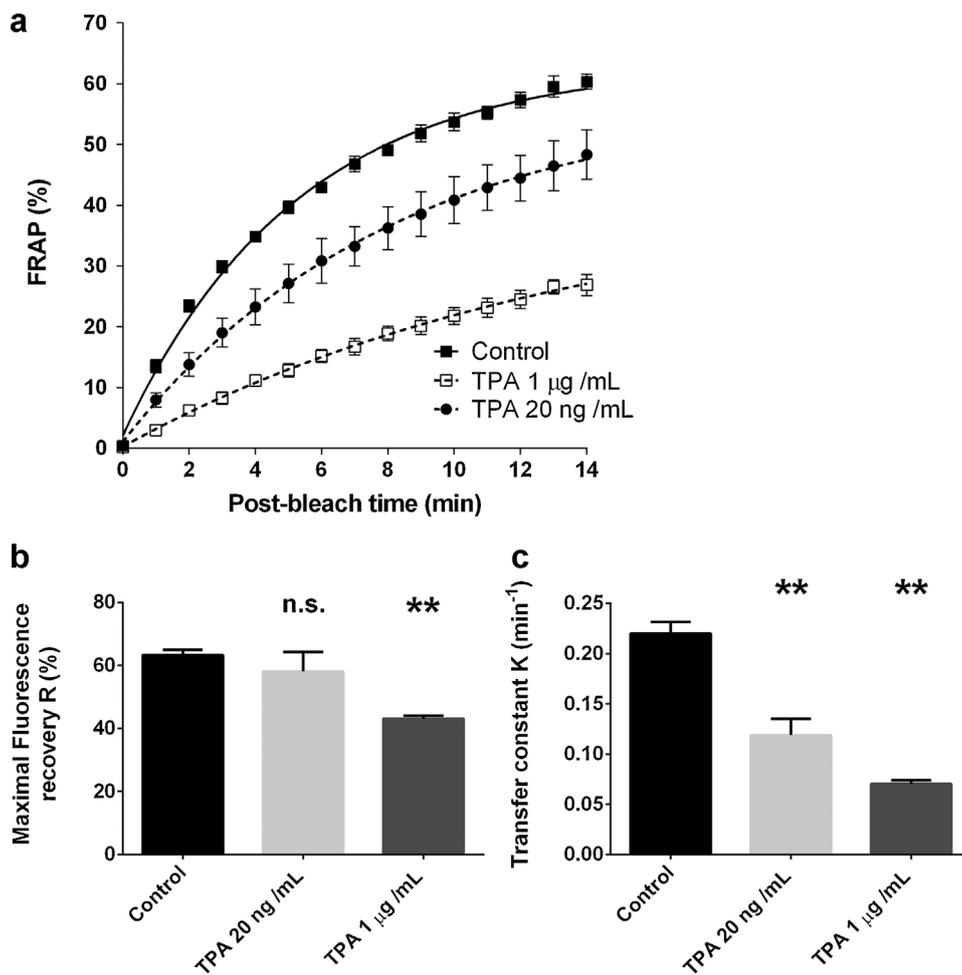


Fig. 4. **a**: FRAP analysis of GJIC in NIH3T3 cells, control or exposed to TPA during the last hour of exposure. Each data point represents the average of three independent experiments, with 30-40 cells per condition analyzed in each experiment. Curves connect the mean percent recovery at each time point; vertical bars represent mean ± SEM. **b**, **c**: Nonlinear regression of fluorescence data yielded values for maximal fluorescence recovery *R* (**b**) and transfer constant *K* (**c**). ** $P < 0.01$ between the no-field control and indicated TPA group; Not significant: no difference with the no-field group (n.s., $P > 0.05$).

for 1 h led to moderate and reproducible inhibition of GJIC in our NIH3T3 cells (Fig. 4a). Statistical analysis showed that this treatment did not alter maximal fluorescence recovery (Fig 4b, $P > 0.1$) while significantly decreasing the dye transfer rate constant to 54% of exposure value (Fig. 4c). This indicates that the same fluorescence recovery was reached at equilibrium under both conditions but took longer in the presence of TPA. This suggests that in cells treated with 20 ng ml⁻¹ TPA for 1 h, the same number of cells is connected by gap junctions but with fewer functional channels [Santiquet et al., 2012]. We, therefore, used this TPA sub-optimal concentration to test the potential synergistic effect of 50 Hz MF and TPA. However, no statistically significant synergistic effect of 50 Hz 1 mT MF with 20 ng ml⁻¹ TPA was observed (Fig. 5, $P > 0.05$).

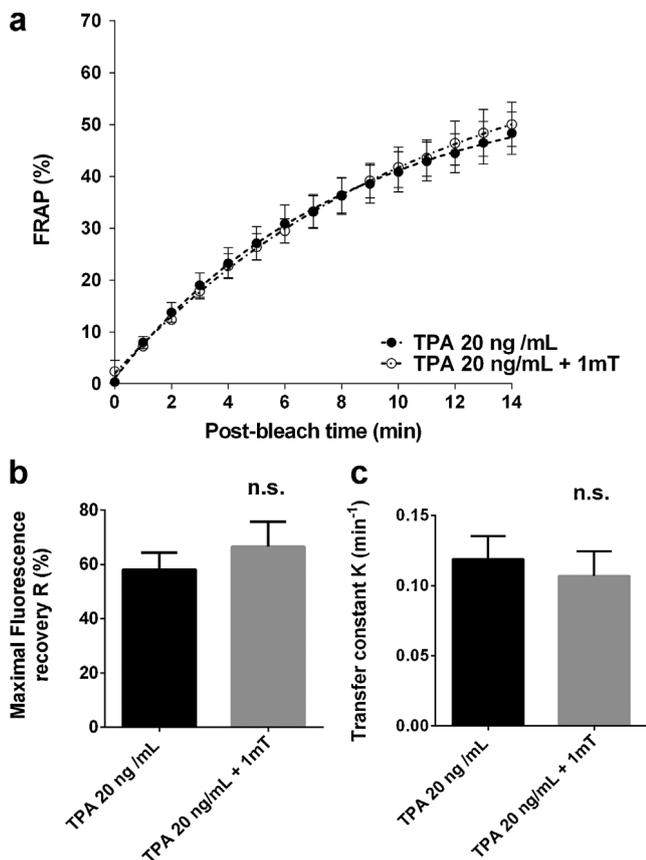


Fig. 5. **a**: FRAP analysis of GJIC in NIH3T3 cells exposed or not to 50 Hz MF at a flux density of 1 mT for 24 h, in the presence of TPA during the last hour of exposure. Each data point represents the average of three independent experiments, with 30–40 cells per condition analyzed in each independent experiment. Curves connect mean percent recovery at each time point; vertical bars represent mean \pm SEM. **b**, **c**: Nonlinear regression of fluorescence data yielded values for maximal fluorescence recovery R (**b**) and transfer constant K (**c**). Not significant: no difference with the no-field group (n.s., $P > 0.05$).

DISCUSSION

Effects of ELF MF on GAP junctions have been studied extensively at the molecular level, with numerous articles published over the past two decades (see Introduction section). Conflicting results have been reported making it difficult to draw any clear conclusion. In this context, the Hangzhou group's findings are very interesting, as these authors studied the effects of 50 Hz MF on GJIC for several years using the same exposure system and cells. Their results led them to speculate that ELF MF may play a role in carcinogenesis, possibly by acting as a cancer-promoting agent [Zeng et al., 2006]. We investigated this phenomenon on cellular level using similar exposure conditions but did not find any effect of 50 Hz MFs on GJIC function under any conditions tested in our laboratory. While we used the same FRAP technique, NIH3T3 cell line, and MF field exposure as Hu et al. [2001] and Zeng et al. [2006], our study was not designed to replicate all details of the apparatus and procedures in these studies and was not conducted in collaboration with those groups.

The challenge is therefore to identify a parameter that could explain differences among results in various studies on effects of ELF MF on GJIC. Exposure system type should not be a critical experimental factor, provided ELF fields are well characterized. It is true that current density varies from one report to another. For example, Marino et al. [2003] measured a decrease in conductance of synovial fibroblast gap junction channels exposed at current densities of 20 mA m⁻². In our work, a 1 mT MF at 50 Hz produced a current density of only 2.6 mA m⁻² at the edge of 22 mm diameter glass coverslips. In studies by Hu et al. [2001] and Zeng et al. [2006], exposure conditions and, thus, current densities were similar to ours (0.8 mT and 30 mm diameter, instead of 1 mT and 22 mm diameter, with $i = \pi\sigma frB$, in A m⁻², where i is current density, σ is conductivity, f is frequency, r is distance between point of interest and axis of coverslip and B is MF).

Nonetheless, although exposure systems are equivalent from one laboratory to the other in terms of generating well-characterized MF, use of different cell types in each laboratory is a major issue. For example, in the study by Marino et al. [2003], only synovial cells exhibited changes in GJIC in response to 60 Hz extracellular currents, while GJIC in neuroblastoma cells was not affected. The authors concluded that effects of 60 Hz currents on channel conductance were not simply nonspecific changes in cell physiology. Results may also depend on physiological parameters of a particular cell line. In the elegant study by

Yamaguchi et al. [2002], the authors presented data suggesting ELF MF affected GJIC in osteoblastic cells, but only when not fully differentiated. As yet undefined biological or biochemical parameters may therefore be critical in eliciting an ELF MF effect on GJIC. It is well known that cell lines are prone to genotypic and phenotypic drift during culture [Osborne et al., 1987]. This is particularly common in the most frequently used cell lines, especially those kept in cell banks for many years, such as the NIH3T3 line. This potential bias was discussed in a previous work that failed to replicate preliminary results from the Blackman group [Griffin et al., 2000]. We acknowledge that genotypic and phenotypic drift may have occurred between our NIH3T3 cell line and the one used in studies by Hu et al. [2001] and Zeng et al. [2006]. Nonetheless, there is no doubt that both cell lines have functional gap junctions, since a FRAP signal was observed by both research groups. Moreover, both cell lines responded to TPA treatment.

In conclusion, we found no evidence of an effect of 50 Hz MF exposures on GJIC in NIH3T3 cells at up to 1 mT. However, we were unable to identify a likely cause of the discrepancy between our study and that of Hu et al. [2001] and Zeng et al. [2006]. We are left to speculate that the different outcomes reflect unknown differences in laboratory materials and procedures or unspecified genetic and physiological factors.

REFERENCES

- Abbaci M, Barberi-Heyob M, Stines JR, Blondel W, Dumas D, Guillemain F, Didelon J. 2007. Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique: A comparative study. *Biotechnol J* 2:50–61.
- Azanza MJ, del Moral A, Calvo AC, Pérez-Bruzón RN, Junquera C. 2013. Synchronization dynamics induced on pairs of neurons under applied weak alternating magnetic fields. *Comp Biochem Physiol A* 166:603–618.
- Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M. 2009. Gap junctions and cancer: New functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 11:323–338.
- Griffin GD, Williams MW, Gailey PC. 2000. Cellular communication in clone 9 cells exposed to magnetic fields. *Radiat Res* 153:690–698.
- Hu GL, Chiang H, Zeng QL, Fu YD. 2001. ELF magnetic field inhibits gap junctional intercellular communication and induces hyperphosphorylation of connexin43 in NIH3T3 cells. *Bioelectromagnetics* 22:568–573.
- Leithe E, Sirmes S, Omori Y, Rivedal E. 2006. Downregulation of gap junctions in cancer cells. *Crit Rev Oncog* 12:225–256.
- Li CM, Chiang H, Fu YD, Shao BJ, Shi JR, Yao GD. 1999. Effects of 50 Hz magnetic fields on gap junctional intercellular communication. *Bioelectromagnetics* 20:290–294.
- Marino AA, Kolomytkin OV, Frilot C. 2003. Extracellular currents alter gap junction intercellular communication in synovial fibroblasts. *Bioelectromagnetics* 24:199–205.
- Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML. 2005. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1719:125–145.
- Osborne CK, Hobbs K, Trent JM. 1987. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 9(2):111–121.
- Rivedal E, Yamasaki H, Sanner T. 1994. Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis* 15:689–694.
- Salmon ED, Leslie RJ, Saxton WM, Karow ML, McIntosh JR. 1984. Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: Analysis using a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. *J Cell Biol* 99:2165–2174.
- Santiquet NW, Develle Y, Laroche A, Robert C, Richard FJ. 2012. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biol Reprod* 87(2):46.
- Schimmelpfeng J, Stein JC, Dertinger H. 1995. Action of 50 Hz magnetic fields on cyclic AMP and intercellular communication in monolayers and spheroids of mammalian cells. *Bioelectromagnetics* 16:381–386.
- Ubeda A, Trillo MA, House DE, Blackman CF. 1995. A 50 Hz magnetic field blocks melatonin-induced enhancement of junctional transfer in normal C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 16:2945–2949.
- WHO. 2007. Extremely low frequency fields: Environmental Health Criteria 238. Geneva, Switzerland: WHO Press, World Health Organization.
- Yamaguchi DT, Huang J, Ma D, Wang PK. 2002. Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields in osteoblast-like models is dependent on cell differentiation. *J Cell Physiol* 190:180–188.
- Zeng QL, Chiang H, Hu GL, Mao GG, Fu YT, Lu DQ. 2003. ELF magnetic fields induce internalization of gap junction protein connexin 43 in Chinese hamster lung cells. *Bioelectromagnetics* 24:134–138.
- Zeng Q, Ke X, Gao X, Fu Y, Lu D, Chiang H, Xu Z. 2006. Noise magnetic fields abolish the gap junction intercellular communication suppression induced by 50 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 27:274–279.

7.2.2 Effets des champs RF sur l'activité des canaux TRP thermosensibles.

7.2.2.1 *Les canaux TRP*

Au cours des vingt dernières années, la plupart des études concernant les effets biologiques induits par les champs RF ont été réalisées à des D.A.S. de faible niveau, c'est-à-dire au-dessous du seuil critique de l'effet thermique (4 Watts / kg). Différents mécanismes physiques ont été proposés qui pouvaient potentiellement servir de base aux effets non thermiques des champs RF, mais aucun n'a été validé. Par exemple, il a été montré initialement que les membranes cellulaires ne peuvent pas démoduler un signal dont la fréquence porteuse dépasse 10 MHz (Pickard and Barsoum, 1981), ce qui a été récemment confirmé à 900 MHz (Davis and Balzano, 2010; Kowalczyk et al., 2010). Dans la gamme des GHz, en dehors de l'échauffement diélectrique des tissus (Sheppard et al., 2008) qui est parfaitement caractérisé, il a seulement été suggéré que les champs RF de faible niveau puissent induire des effets biologiques via des changements localisés de température qui ne pourraient être détectés qu'au niveau moléculaire (Foster and Glaser, 2007; Glaser, 2005). La question des effets biologiques possibles des champs RF pourrait donc être revue en considérant, au niveau moléculaire, la sensibilité à la température des systèmes biologiques.

Chez les mammifères, certains canaux ioniques nommés TRP (qui signifie « potentiel de récepteur transitoire ») présentent, dans les membranes plasmiques des cellules, une sensibilité extrêmement importante à la température (Clapham, 2003; Martinac, 2008; Ferrer-Montiel et al., 2012; Ferrandiz-Huertas et al., 2014). On parle de la famille des « thermo-TRP ». Structurellement, les canaux TRP ressemblent à des canaux potassiques voltage-dépendants, avec quatre sous-unités entourant le pore ionique central. Chaque sous-unité contient six segments transmembranaires (S1-S6) et des extrémités N et C intracellulaires de longueur variable en fonction du canal considéré (Fig. 11). Les canaux Thermo TRP sont des capteurs polymodaux répondant à une large gamme de stimuli physiques et chimiques, tels que la tension transmembranaire, les ligands, l'acidité et donc la température.

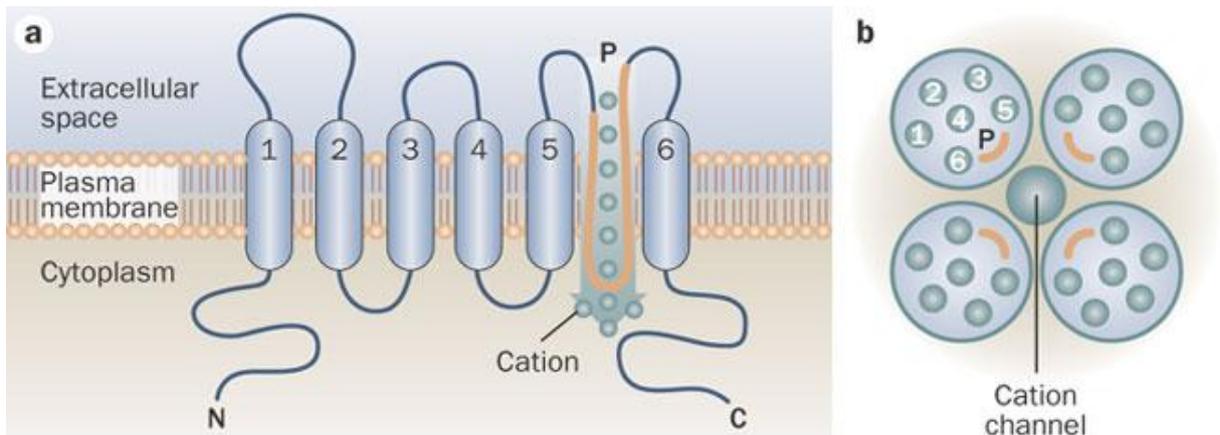


Figure 11 : Structure d'un canal à potentiel transitoire. a) Représentation schématique d'une sous-unité. La boucle (P) entre les domaines 5 et 6 est impliquée dans la formation du pore. Les extrémité N et C-terminales sont cytoplasmiques. b) Représentation schématique de la structure quaternaire d'un canal TRP formé de 4 sous-unités formant le pore au centre de la structure. D'après (Woudenberg-Vrenken et al., 2009).

Ces protéines constituent des canaux cationiques non sélectifs, avec une préférence pour le calcium. Le premier canal TRP a été initialement découvert chez *Drosophila melanogaster*, où il joue un rôle dans la phototransduction impliquant un signal calcique. Il existe aujourd'hui sept groupes dans cette famille : TRPC (canonique), TRPV (vanilloïde), TRPM (melastatine), TRPP (polycystine), TRPML (mucolipine), TRPA (ankyrine) et TRPN (no mechanoreceptor potential C). Ce dernier groupe n'est pas représenté chez les mammifères (Vassort and Fauconnier, 2008). Les protéines TRP jouent un rôle dans diverses fonctions dans l'organisme, comme notamment le contrôle de la circulation sanguine, la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire et son transport, l'orientation neuronale, la prolifération et la différenciation cellulaire (Jara-Oseguera et al., 2010). Tel qu'énoncé précédemment, certains canaux TRP sont sensibles à différentes gammes de température, couvrant ainsi un large spectre de température (Fig. 12). On parle de canaux « thermo-TRP ».

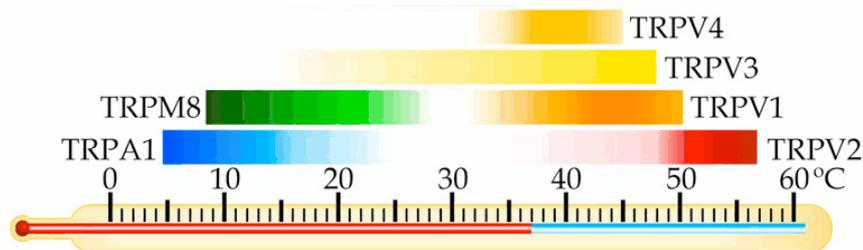


Figure 12 : Représentation schématique des gammes de température entraînant l'activation de différents canaux TRPs (d'après (Ferrandiz-Huertas et al., 2014)).

Les canaux TRPV3 et TRPV4 s'activent à des températures avoisinant 37 °C (Smith et al., 2002), alors que TRPV1 s'ouvre à partir de 42-43 °C (Clapham, 2003), ce qui peut être considéré comme étant du domaine du nociceptif. Le canal TRPV2 ne s'active qu'au-delà de 52 °C. Les protéines TRPM8 et TRPA1, quant à elles, sont activées par le froid (Dhaka et al., 2006). Dans les dernières années, il a pu également être montré que d'autres canaux TRP étaient sensibles à des variations de température (Held et al., 2015; Tan and McNaughton, 2016).

Les canaux Nociceptifs TRP sont principalement exprimés par des sous-groupes distincts de neurones sensoriels du système nerveux périphérique. Plusieurs de ces canaux TRP sont également exprimés dans les neurones du système nerveux central et dans les cellules non neuronales qui communiquent avec les nerfs sensoriels. Les canaux TRPV1 sont exprimés, en particulier, sur des terminaisons nerveuses de fibres sensorielles lentes dans de nombreux tissus comme la peau et le cerveau. Or, ces tissus sont particulièrement exposés aux RF, de par l'utilisation des téléphones portables par exemple.

7.2.2.2 Mesurer l'activité des canaux TRP sous exposition RF à l'aide du BRET : un double défi technique.

Suite à mon arrivée dans l'équipe de bioélectromagnétisme de l'IMS, nous envisagions de monter un dispositif expérimental capable de mesurer en temps réel l'activité des canaux TRPV1, TRPV3 et TRPV4 dans des cellules vivantes sous exposition RF. Le but était de déterminer si seule l'augmentation de température provoquée par l'exposition aux RF était susceptible d'activer ces canaux, ou s'il existait un effet spécifique des radiofréquences conduisant à une modulation de l'activité de ces canaux. Une étude de la bibliographie sur les canaux ioniques possédant une structure similaire aux canaux TRP indiquait que l'ouverture du pore ionique était conditionnée par des changements de conformations devant se produire dans la structure ternaire et / ou quaternaire de ces canaux suite à leur activation. Les changements de conformation au sein des monomères, ou entre les monomères, suite à

l'activation du canal, pouvaient de fait se répercuter sur la distance et/ou l'orientation de groupements donneur et accepteur fusionnés en N- et C-terminale des protéines TRP. Si cela se vérifiait, la mesure de la variation du BRET offrait alors potentiellement un test direct de l'activation des protéines TRP, comme cela a été décrit pour d'autres sondes BRET intramoléculaires (Fig. 13) (Charest et al., 2005; Saito et al., 2010).

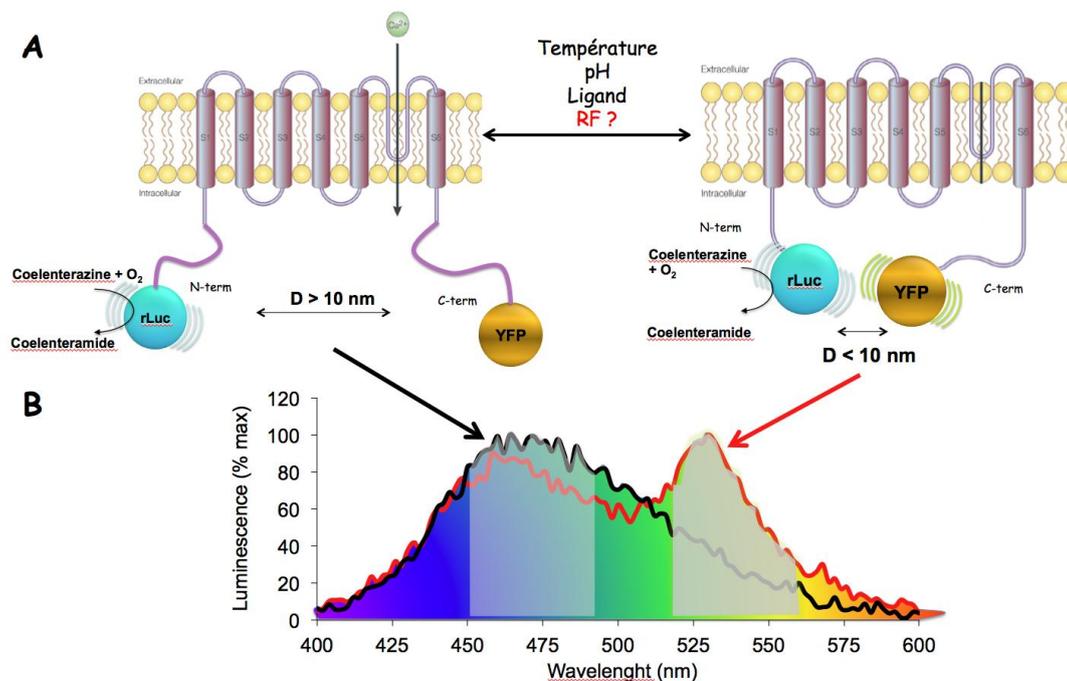


Figure 13 : Exemple d'une sonde BRET intramoléculaire basée sur la structure des canaux TRP. **A.** En fonction de l'état d'activation du canal, la distance séparant les extrémités N et C-terminales pourrait être modifiée. **B.** Exemple d'un spectre obtenu en absence (tracé noir) et en présence (tracé rouge) de BRET. Les parties grisées représentent l'intensité de lumière recueillie au pic d'émission de l'accepteur (à droite) et du donneur (à gauche).

Sachant que les canaux TRPV1, TRPV3 et TRPV4 interagissent également avec la Calmoduline suite à l'ouverture du pore et l'entrée du calcium dans les cellules, nous avons par la suite chercher à mettre en place un deuxième test BRET permettant d'étudier l'activation du canal considéré en mesurant le niveau d'interaction entre la Calmoduline et le canal TRP testé.

L'avènement de tests BRET intra- et intermoléculaire permettant de mesurer l'activité des canaux TRP en temps réel sous exposition RF était prometteur. Cependant, l'utilisation de sondes BRET pour l'analyse de l'activité des protéines en temps réel en bioélectromagnétisme supposait que je puisse lire les signaux de BRET durant l'exposition des cellules. Les appareils commerciaux de lecture des signaux de BRET étant tous des luminomètres réalisant la lecture de plaque au format 96 puits, ces appareils « avalent » les plaques de mesure, lesquelles sont évidemment inaccessibles pour réaliser une exposition à des champs

électromagnétiques avec un dispositif adapté. Avec l'aide des chercheurs du groupe Nano-Système analytique (NSysA), à l'institut des sciences moléculaires (UMR 5255), j'ai pu développer une méthode d'acquisition déportée du signal de BRET grâce à une fibre optique reliée à un spectromètre ultrasensible (Spectra pro 2300i, Acton, disponible au NSysA), qui rendait possible l'exposition des cellules vivantes aux RF durant la mesure des signaux de BRET (Fig. 14). Dans ce dispositif, l'exposition RF des échantillons est assurée grâce à une cellule TEM (transverse électromagnétique) développée par l'équipe de Philippe Lévêque au laboratoire XLIM (université de Limoges). Ce dispositif est dimensionné pour, d'une part présenter une impédance caractéristique de 50 Ohms et, d'autre part, s'adapter aux dimensions des boîtes de Petri, généralement de 35 mm de diamètre. L'atout principal d'une telle structure est de présenter une très large bande de fonctionnement. Cette dernière dépend principalement de la dimension de la structure, mais il est possible, pour des modèles de petites dimensions, d'atteindre des bandes passantes de l'ordre de 5 à 6 GHz. Ce dispositif a été adapté afin de permettre la lecture du signal de BRET à l'aide d'une fibre optique pénétrant la TEM au travers de la plaque supérieur et du septum central.

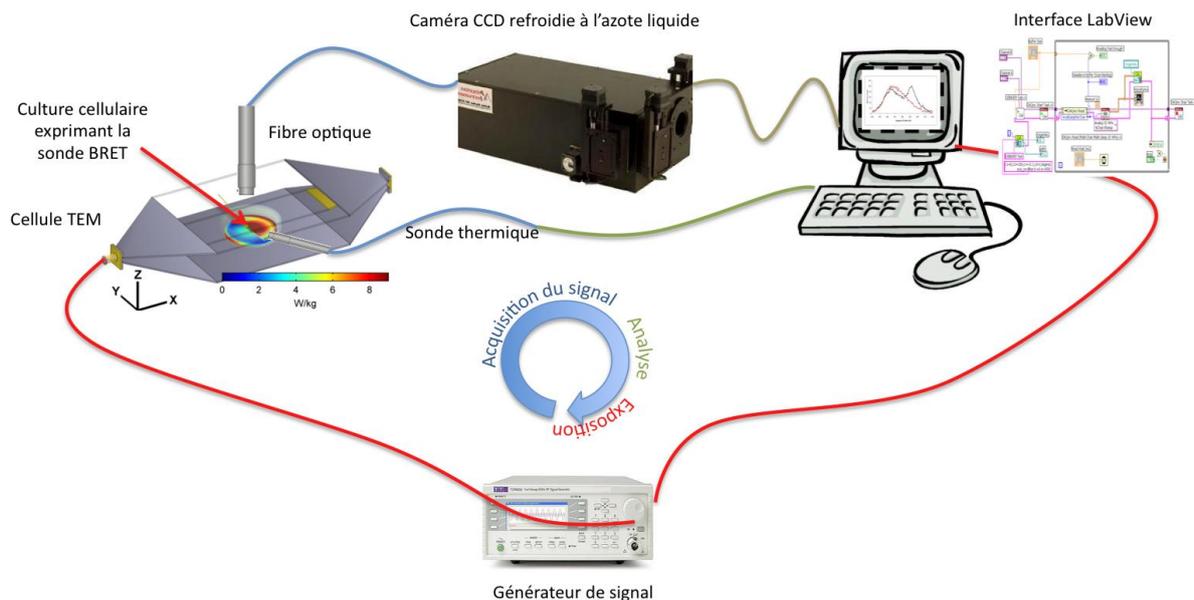


Figure 14 : Représentation schématique du montage de la manipulation fonctionnant en boucle fermée et permettant l'acquisition déportée, à l'aide d'une fibre optique et d'un spectromètre, des signaux de BRET issus d'une population cellulaire en cours d'exposition au sein d'une cellule TEM. Le débit d'absorption spécifique (DAS) est représenté sur une échelle de couleur.

7.2.2.3 Caractérisation des sondes BRET ciblant les canaux TRP et mise en place de la lecture spectrale des signaux de BRET

Afin de réaliser l'étude des effets des RF sur l'activité des canaux TRPV, il nous fallait donc en premier construire et caractériser différentes sondes BRET intra- et intermoléculaires basées sur la structure des canaux TRPV1, TRPV3 et TRPV4. Dans un deuxième temps, il fallait mettre au point la technique d'acquisition des signaux de BRET spectraux à l'aide du dispositif indiqué dans la figure 14. Pour se faire, nous avons dû développer une interface labview complète capable de récupérer les spectres issus du spectromètre et d'en réaliser l'analyse en temps réel. Au-delà de notre thématique de recherche en bioélectromagnétisme, l'utilisation d'un spectromètre basée sur la diffraction des signaux lumineux acquis permettait d'obtenir des spectres de BRET entiers en une fraction de seconde, là où les appareils commerciaux utilisent des filtres et une lecture séquentielle du signal pour le donneur et l'accepteur d'énergie. Il m'apparut immédiatement que le développement d'une acquisition spectrale des signaux de BRET revêtait de multiples avantages qui dépassait largement le cadre du bioélectromagnétisme. En particulier, l'acquisition de spectres de BRET devait rendre possible l'acquisition multiplexée de plusieurs sondes BRET au sein d'un seul et même échantillon.

La caractérisation des sondes de BRET basées sur la structure des canaux TRP ainsi que la mise en place de la mesure multiplexée des spectres de BRET a fait l'objet d'une publication dans la revue *Biophysical Journal* en janvier 2017, que je reproduis dans les pages qui suivent. Les innovations réalisées dans ce travail ont entraîné le dépôt de deux brevets internationaux par la SATT Aquitaine et la publication d'un article dans la lettre de l'innovation du CNRS, également en Janvier 2017.

Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Three TRPV Channels

Hermanus Johannes Ruigrok,^{1,2} Guillaume Shahid,^{1,2} Bertrand Goudeau,^{2,3} Florence Poulletier de Gannes,^{1,2} Emmanuelle Poque-Haro,^{1,2} Annabelle Hurtier,^{1,2} Isabelle Lagroye,^{1,2,4} Pierre Vacher,^{2,5} Stéphane Arbault,^{2,3} Neso Sojic,^{2,3} Bernard Veyret,^{1,2} and Yann Percherancier^{1,2,*}

¹Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5218, Talence, France; ²Université de Bordeaux, Talence, France; ³Institut des Sciences Moléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5255, NSYSA Group, ENSCBP, Pessac, France; ⁴Paris Sciences et Lettres Research University, Paris, France; and ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France

ABSTRACT Multiplexed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays were developed to monitor the activation of several functional transient receptor potential (TRP) channels in live cells and in real time. We probed both TRPV1 intramolecular rearrangements and its interaction with Calmodulin (CaM) under activation by chemical agonists and temperature. Our BRET study also confirmed that: (1) capsaicin and heat promoted distinct transitions, independently coupled to channel gating, and that (2) TRPV1 and Ca²⁺-bound CaM but not Ca²⁺-free CaM were preassociated in resting live cells, while capsaicin activation induced both the formation of more TRPV1/CaM complexes and conformational changes. The BRET assay, based on the interaction with Calmodulin, was successfully extended to TRPV3 and TRPV4 channels. We therefore developed a full-spectral three-color BRET assay for analyzing the specific activation of each of the three TRPV channels in a single sample. Such key improvement in BRET measurement paves the way for the simultaneous monitoring of independent biological pathways in live cells.

INTRODUCTION

Over the last 15 years, resonance energy-transfer approaches have offered new opportunities for real-time probing of the activity of an evergrowing list of proteins in live cells (1). These techniques are based on the nonradiative transfer of energy between an energy donor and a compatible fluorescent energy acceptor. This is a system of choice for monitoring both constitutive and regulated inter- and intramolecular interaction. Among these techniques, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) has become a popular, broadly applicable method, particularly useful in molecular pharmacology, especially concerning G protein-coupled receptors (2).

Being able to study multiple molecular events simultaneously with a single measurement represents a significant step forward in biology and medicine. Spectral imaging, coupled to mathematical processing, is becoming the gold standard for multiplexed imaging of intracellular molecular

events using fluorescent techniques (3,4). Also, systems coupling multispectral fluorescence imaging with microscopy and flow cytometry are now commercially available. However, until now, the BRET technique was limited to a filter-based approach that hindered its further development. Using transient receptor potential (TRP) ion channels as a model, we report here a full-spectral analysis of multiple-color BRET probes.

TRP proteins form a superfamily of ubiquitously expressed, functionally diverse, cation-permeable channels with varying selectivity to several cations. All TRPs are integral proteins containing six transmembrane domains. The N- and C-terminal domains are intracellular and known to be involved in TRP function, regulation, and channel assembly. TRP channels can be activated by several physicochemical means, including the transduction of chemical, temperature, and mechanical stimuli (5). TRP channels function, therefore, as polymodal signal integrators that respond by changing their open probability. They are highly involved in a variety of human physiological processes, including sensory physiology; cardiovascular, gastrointestinal, and urological functions; as well as immunity and development.

Submitted June 16, 2016, and accepted for publication November 21, 2016.

*Correspondence: yann.percherancier@ims-bordeaux.fr

Editor: Henry Colecraft.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.3197>

© 2017 Biophysical Society.



As a result, TRP channel dysfunction has been implicated in many diseases, leading to their emergence as highly promising drug targets (6). Among the TRP channels, six are recognized as thermo-TRPs, expressed in primary somatosensory neurons and activated at specific temperatures. TRPV1–4 transduce elevated temperatures, ranging from moderate (TRPV3 and TRPV4) to noxious heat (TRPV1 and TRPV2), while TRPM8 and TRPA1 are activated by moderate and extreme cold, respectively (7).

In this study, we developed intra- and intermolecular BRET-based biosensors for monitoring the real-time heat and chemical activation of TRPV1 channels in live cells. Using these, to our knowledge, new tools, we confirmed that (1) capsaicin (CAPS) and heat promoted distinct transitions, independently coupled to channel gating, and (2) TRPV1 and Ca²⁺-bound Calmodulin (CaM) but not Ca²⁺-free CaM were preassociated in resting live cells, while CAPS activation induced both the formation of more TRPV1/CaM complexes and conformational changes. We also extended the intermolecular approach to monitor the chemical activation of both TRPV3 and TRPV4. Finally, using spectral decomposition, we demonstrated the simultaneous monitoring of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 ion channel activation in a single assay.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

To generate the BRET constructs, super Yellow Fluorescent Protein (YFP) 2 (8) and Renilla Luciferase II (9) were used to improve the brightness of the assay. They are referred as YFP and Luc for short in the rest of the article. The cDNA of Luc and YFP were first cloned together using a three-piece ligation in the *Bam*HI/*Xho*I site of pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA), yielding two expression vectors pcDNA3.1 YFP-Luc where YFP was cloned in-fusion at the N-terminal of Luc, and pcDNA3.1 Luc-YFP where Luc was cloned in-fusion at the N-terminal of YFP. Both YFP and Luc were amplified by PCR from the pcDNA3-YFP-EPAC-Luc vector (a kind gift of Pr. Michel Bouvier, Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, Canada). Luc was cloned either at the N-terminal of YFP as a *Hind*III-*Eco*RI fragment (primers used: Luc_ *Hind*III_ATG_N-term sense and Luc_no Stop_ *Eco*RI_N-term antisense) or at the COOH-terminal of YFP as an *Eco*RI-*Xho*I fragment (primer used: Luc_ *Eco*RI_ATG_C-term sense and Luc_ *Xho*I_Stop_C-term antisense). In parallel, YFP was cloned either at the N-terminal of Luc as a *Hind*III-*Eco*RI fragment (primers used: YFP_ *Hind*III_ATG_N-term sense and YFP_no Stop_ *Eco*RI_N-term antisense) or at the COOH-terminal of Luc as an *Eco*RI-*Xho*I fragment (primer used: YFP_ *Eco*RI_ATG_C-term sense and YFP_ *Xho*I_Stop_C-term antisense). The sequence joining Luc and YFP sequence encodes VPVNSGGGGG as a linker, and contains an *Age*I restriction site.

The YFP-hTRPV1-Luc expression vector was obtained by subcloning the human TRPV1 cDNA from the pDONR201-hTRPV1 vector (Harvard Medical School PlasmID Repository, clone HsCD00081472) as an *Eco*RI PCR fragment in the *Eco*RI site of the vector pcDNA3.1 YFP-Luc (primer used: hTRPV1_ *Eco*RI_Fus_Sense and hTRPV1_ *Eco*RI_Fus_antisense). The hTRPV1-Luc expression vector was obtained by subcloning the cDNA of hTRPV1 as a *Hind*III-*Eco*RI fragment in place of the YFP in the *Hind*III-*Eco*RI site of the pcDNA3.1 YFP-Luc vector (primer used: hTRPV1_ *Hind*III_ATG_Sense and hTRPV1_ *Eco*RI_Fus_antisense). The Luc-hTRPV3 expression vector was obtained by subcloning the cDNA

of hTRPV3 (Harvard Medical School PlasmID Repository, clone HsCD00341603) as an *Age*I-*Xho*I fragment in place of the YFP in the *Age*I-*Xho*I sites of the pcDNA3.1 Luc-YFP vector (primer used: hTRPV3_ *Age*I_ATG_Sense and hTRPV3_Stop_ *Xho*I_antisense). The hTRPV4-Luc expression vector was obtained by subcloning the cDNA of hTRPV4 (a kind gift of Dr. Aubin Penna, INSERM UMR1085, Group C2M2, Rennes University, France) as a *Bam*HI-*Age*I fragment in place of the YFP in the *Bam*HI-*Age*I site of the pcDNA3.1 YFP-Luc vector (primer used: hTRPV4_ *Bam*HI_ATG_Sense and hTRPV4_ *Age*I_Fus_antisense). In each case, the sequence joining the cDNA of interest and either Luc or YFP sequence encodes VPVNSGGGGG as a linker.

The cDNA of aquamarine (10) was a kind gift of Dr. Fabienne Mérola (Laboratoire de Chimie Physique, CNRS UMR8000, Université Paris-Sud, Orsay, France). The cDNA of mAmetrine (Plasmid No. 54660) and LssmOrange (Plasmid No. 37130) were obtained from AddGene plasmid repository. The cDNA of aquamarine, mAmetrine and LssmOrange were all subcloned as a *Hind*III-*Eco*RI fragment in place of the YFP in the *Hind*III-*Eco*RI site of the pcDNA3.1 YFP-Luc vector (primer used: YFP_ *Hind*III_ATG_N-term sense and YFP_no Stop_ *Eco*RI_N-term antisense) to yield pcDNA3.1 FP-Luc expression vectors (FP being any fluorescent protein between aquamarine, mAmetrine, and LssmOrange). The human Calmodulin (CaM) cDNA was a kind gift of Dr. Peter J. McCormick (School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich, UK). A Ca²⁺-insensitive mutant form of CaM (CaM1234), in which point mutations within all four EF hands eliminate Ca²⁺ binding was a kind gift of Pr. Sharona E. Gordon (University of Washington, Seattle, WA). The YFP-CaM expression vectors were obtained by subcloning the CaM cDNA in place of the Luc at the C-terminus of YFP into the YFP-Luc as an *Eco*RI-*Xho*I fragment (primers used: hCaM_ *Eco*RI-ATG-Sense and hCaM_Stop_ *Xho*_antisense). A similar strategy was used to obtain the FP-CaM expression vector using the pcDNA3.1 FP-Luc expression vector instead of the pcDNA3.1 YFP-Luc.

The sequence of each cDNA construct was confirmed by DNA sequencing.

Primers

YFP and Luc primers

Luc_ *Hind*III_ATG_N-term sense, TGTCTAAGCTTGGATCCGCCA
CATGACCAGCAAGGTGTACGACCCCGAGC
Luc_no Stop_ *Eco*RI_N-term antisense, CACCAGAATTCACCGG
TACCTGCTCGTTCTTCAGCACTCTCTCC
Luc_ *Eco*RI_ATG_C-term sense, GTGTACCGGTGAATTCTGGTGGGA
GGCGGATCTATGACCAGCAAGGTGTACGACCCCGAGC
Luc_ *Xho*I_Stop_C-term antisense, ATCTAGTCTAGACTCGAGCGGT
TACTGCTCGTTCTTCAGCACTCTCTCC
YFP_ *Hind*III_ATG_N-term sense, TGCTAAGCTTGGATCCGCCA
CCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC
YFP_no Stop_ *Eco*RI_N-term antisense, CACCAGAATTCACCGGTA
CCTTGATACAGCTCGTCCATGCCG
YFP_ *Eco*RI_ATG_C-term sense, TGTGTACCGGTGAATTCTGGTG
GAGCGGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
YFP_ *Xho*I_Stop_C-term antisense, ATCTAGTCTAGACTCGAGCGG
TACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

hTRPV1 primers

hTRPV1_ *Eco*RI_Fus_Sense, TGTGTACCGGTGAATTCTGGTGGAG
GCGGATCTATGAAGAAATGGAGCAGCAGACT
hTRPV1_ *Eco*RI_Fus_antisense, CACCAGAATTCACCGGTACCTTC
TCCCCGGAAGCGGCAGGACTC
hTRPV1_ *Hind*III_ATG_Sense, TGCTAAGCTTGGTACCGCaCACC
ATGAAGAAATGGAGCAGCAGACT

hTRPV3 primers

hTRPV3_AgeI_ATG_Sense, TGTCTAAGCTTGGTACCGCCACCAT
GAAAGCCACCCCAAGGAGATGG
hTRPV3_Stop_XhoI_antisense, ATCTAGTCTAGACTCGAGCGGC
TACACCGAGGTTCCGGGAATTCCTCG

hTRPV4 primers

hTRPV4_BamHI_ATG_Sense, TGTCTGGATCCAAGCTTGCCACCA
TGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCCCG
hTRPV4_AgeI_Fus_antisense, CACCAGAATTCACCGGTACGAGCG
GGCGTCATCAGTCTCCACTTGCG

Calmodulin primers

hCaM_EcoRI_ATG_Sense, TGTGTACCGGTGAATTCTGGTGGAGG
CGGATCTATGGCTGACCAGCTGACTGAGGAGC
hCaM_Stop_Xho_antisense, ATCTAGTCTAGACTCGAGCGGTTACT
TTGCAGTCATCATCTGTACAAAAC

Reagents

CAPS and Capsazepine (CPZ) were all from Tocris (Bristol, UK). Difenine and GSK1016790A and BAPTA-AM were from Sigma (Lyon, France). AMG517 was from Medchemexpress (Princeton, NJ). Coelenterazine H and Purple Coelenterazine (Nanolight Technology, Pinetop, AZ) were added to a final concentration of 5 μ M.

Cell culture and transfections

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium—high glucose (Cat. No. D6429; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units mL⁻¹ penicillin and streptomycin. Twenty-four hours before transfection, cells were seeded at a density of 500,000 cells in 6-well dishes. Transient transfections were performed using polyethylenimine (PEI, linear, Mr 25,000; Cat. No. 23966 Polysciences, Warrington, PA) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as explained in Percherancier et al. (11). Usually, 0.1–0.25 μ g of the donor constructions and 1.75–1.9 μ g of the acceptor constructions were transfected for the BRET measurement, except for BRET titration curves, where increasing amounts of YFP-CaM (0.01–2 μ g) were transfected with a fixed amount of TRPV1-Luc (0.1 μ g). The amount of transfected DNA was completed to a total of 2 μ g with pcDNA3.1 empty vector. After overnight incubation, transfected cells were then detached, resuspended in DMEM w/o red phenol (Ref. No. 21063-029; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and replated at a density of 10⁵ cells per well in 96-well white plates with clear bottoms (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France) pretreated with D-polylysine (Sigma-Aldrich) for reading with the Tristar2 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) or onto 12 mm diameter glass coverslips (Knittel Glass, Braunschweig, Germany) treated with poly-L-lysine for the reading with the SpectraPro 2300i spectrometer (Acton Optics, Acton, MA) (see below). Cells were left in culture for 24 h before being processed for the BRET assay.

Filter-based BRET assays

For the pharmacological characterization of the probes, agonists and Coelenterazine H were directly added to the cells and BRET assays were performed using a multidetector TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies) for sequential integration of the signals emitted by the total cell population in each well measured, and detected at 480 \pm 20 nm and 540 \pm 40 nm for the Luc (energy donor) and YFP (energy acceptor) light

emissions, respectively. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the emission intensity measured in the acceptor window (I_{acceptor}) over the emission intensity measured in the donor window (I_{donor}), according to Eq. 1:

$$BRET = \frac{I_{\text{acceptor}}}{I_{\text{donor}}}, \quad (1)$$

Due to the overlapping emission spectra of Luc and YFP, a fraction of the light detected in the YFP filter originates from the Luc emission, resulting in a contaminating signal (12). The Net BRET is defined as the BRET ratio of cells coexpressing Luc and YFP constructs minus the BRET ratio of cells expressing only the Luc construct in the same experiment.

To assess the functionality of the probes based on the TRPV channels, agonists and antagonists were added as described in the text for 3 min at given temperature before the addition of Coelenterazine H and BRET reading. All experiments were performed at 37°C and pH 7.5 unless otherwise indicated.

Spectral BRET assays

Full BRET spectra were acquired using an optical fiber linked to a Spectra Pro 2300i spectrometer (Princeton Instruments, Acton, MA), equipped with a liquid-nitrogen-cooled charge-coupled device camera for recording the full visible spectrum (Acton Optics). The bioluminescent signal was recorded from transfected cells seeded onto a glass coverslip and placed into a white opaque measurement chamber made of Teflon and containing an isotonic solution (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, Glucose 10 mM) adjusted to pH7.5. The temperature of the cell buffer was regulated using an Eppendorf ThermoStat Plus and measured in real time using a fiber-optic temperature measurement Luxtron 812 system (Lumasense Technologies, Santa Clara, CA). All experiments were performed at 37°C unless otherwise indicated.

Using the LabView programming language (National Instruments, Austin, TX), an interface was developed to acquire the bioluminescent spectra and perform real-time spectral decomposition of the BRET signal into its various components. The experimental emission spectra of Luc (with either coelenterazine H or purple coelenterazine as the substrate), YFP, mAmetrine, aquamarine, and Lss-mOrange were first obtained experimentally using a Cary Eclipse Fluorimeter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) (Figs. S1 and S2 in the Supporting Material). Each spectrum was then fitted as a linear combination of Gaussian curves based on

$$y(\lambda) = \sum_{i=1}^n a_i e^{-\frac{(\lambda - \lambda_{max_i})^2}{2\sigma_i^2}}, \quad (2)$$

where λ is the wavelength, a_i values are the peak heights of the Gaussian curves, λ_{max_i} values are the wavelengths of their peaks, and σ_i are the widths at half-maximum.

For each time point, the full BRET spectrum was calculated using Eq. 3 for experiments using Luc (and coelenterazine H) as energy donor and YFP as energy acceptor, or using Eq. 4 for Luc (and purple coelenterazine) as energy donor, and aquamarine, mAmetrine, and Lss-mOrange as energy acceptors,

$$Y = k_{\text{Luc}}Y_{\text{Luc}} + k_{\text{YFP}}Y_{\text{YFP}}, \quad (3)$$

$$Y = k_{\text{Luc}}Y_{\text{Luc}} + k_{\text{aquamarine}}Y_{\text{aquamarine}} + k_{\text{mAmetrine}}Y_{\text{mAmetrine}} + k_{\text{Lss mOrange}}Y_{\text{Lss mOrange}}, \quad (4)$$

and where k_{probe} values are the probe coefficients.

The difference between the experimental spectrum and the linear combination Y of donor and acceptor spectra was minimized, with respect to the k_{probe} coefficients, using a standard iterative algorithm based on a nonlinear

least-square fitting method developed by Levenberg (13). Using this algorithm for each time point, it was straightforward to calculate the actual BRET ratio for each probe by dividing the area under the acceptor spectrum by that of the donor spectrum. This analysis method represents a major advantage over the standard, filter-based method, for calculating the BRET ratio (12), avoiding the contamination of the acceptor signal by the donor emission. The results of the decomposition of the BRET spectra obtained when measuring the bioluminescent signal from a cell population expressing either the YFP-Luc, the aquamarine-Luc, the mAmetrine-Luc, or the Lss-mOrange fusion proteins are given in Fig. S3. All experiments were performed at 37°C unless otherwise indicated.

For experiments under temperature rise, in which the spectral decomposition approach was used along with the SpectraPro 2300i (Princeton Instruments) the area of YFP and Luc emission spectra were corrected for the subtle changes observed between 25 and 50°C (Fig. S2). We calculated that YFP emission diminished linearly by 0.46% per °C within the temperature range comprised between 25 and 50°C, while the shape of the spectra was not modified. The YFP emission spectra area was therefore corrected for the temperature-induced variation from 25 to 50°C, according to

$$A_{T_{\text{corr}}} = A_T + A_T(T - 25) \times \frac{0.46}{100}, \quad (5)$$

where T is any temperature between 25 and 50°C, A_T is the area of the YFP spectra measured at temperature T , and $A_{T_{\text{corr}}}$ is the corrected area of YFP at the temperature T .

We calculated that Luc emission spectra shape was slightly modified on its red part inducing a linear increase of 0.17% per degree of its area within the temperature range comprised between 25 and 50°C (Fig. S2). The Luc emission spectra area was therefore corrected for the temperature-induced variation from 25 to 50°C, according to

$$B_{T_{\text{corr}}} = B_T - B_T(T - 25) \times \frac{0.17}{100}, \quad (6)$$

where T is the temperature between 25 and 50°C, B_T is the area of the Luc spectrum measured at temperature T , and $B_{T_{\text{corr}}}$ is the corrected area of Luc at temperature T .

Under temperature rise, the evolution of luminescence counts clearly indicates that the luciferase enzyme activity is improved when the temperature is raised from 25 to 40°C, and then decrease up to 50°C, but remained above the limit of sensitivity of the spectrometer. (Fig. S4).

Calcium assays

HEK cells were loaded with 0.67 μM FuraPE3-AM (Teflabs, Austin, TX) for 30 min at 37°C in Hank's Balanced Salt Solution. After washing with PBS, fresh Hank's Balanced Salt Solution was added to the cells and calcium measurement was performed at 37°C using a Flexstation II (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Fura2-AM was alternately excited at 340 and 380 nm and emission was read at 510 nm. The 340:380 nm ratio was used to estimate the variations of cytosolic calcium concentration.

Data analysis

Data obtained in BRET and calcium assays were analyzed using the software Prism 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Sigmoidal dose-response curves were fitted using:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{\text{LogEC50} - X}}, \quad (7)$$

where X is the logarithm of agonist concentration and Y is the response; Bottom is the Y value at the bottom plateau; Top is the Y value at the top

plateau; and LogEC50 is the X value when the response is halfway between Bottom and Top .

RESULTS

Validation of the TRPV1 BRET biosensors

Knowing that: 1) fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis revealed that movements within intracellular regions of the TRP-structurally related Kv2.1 channel were part of the gating machinery (14) and 2) TRPV1 contains CaM binding sequences (15,16), we hypothesized that BRET could be used to monitor TRP channel activation in live cells. TRPV1, the most studied channel in the TRP family, was therefore used as our main model for probing channel conformational changes and CaM docking after activation. For this purpose, we developed two proximity-based BRET assays, relying on the energy donor *Renilla reniformis* luciferase (Luc), fused to the C-terminus part of the TRPV1 protein, and the energy acceptor Yellow Fluorescent Protein (YFP), fused to the N-terminus part of either TRPV1-Luc or CaM. In the first case, the TRPV1 protein was sandwiched between the YFP and Luc groups, resulting in an intramolecular BRET probe, referred to below as YFP-TRPV1-Luc (Fig. 1 A), while, in the second case, YFP-CaM docking on TRPV1-Luc (TRPV1-Luc/YFP-CaM) was monitored (Fig. 2 A).

TRP channel activation was evaluated in transfected HEK293T human embryonic-kidney cells. We first assessed whether, after transfection, our TRPV1-fusion proteins remained functional despite the N- and/or C-terminus addition of the YFP or Luc groups. For this purpose, we measured calcium entry in mock-transfected or transfected HEK293T cells with either native TRPV1 or the BRET constructs, YFP-TRPV1-Luc or TRPV1-Luc. After exposure to CAPS, the prototypical TRPV1 agonist, a rapid, maintained increase in cytosolic calcium concentration was observed in cells expressing TRPV1, YFP-TRPV1-Luc, or TRPV1-Luc, but not in mock-transfected cells (Fig. S5). This indicated that the addition of either the YFP and/or Luc groups did not hinder TRPV1 channel opening, in agreement with previous data (17,18). HEK293T cells expressing YFP-TRPV1-Luc (Fig. 1) or TRPV1-Luc/YFP-CaM (Fig. 2) were then processed for BRET analysis. In both cases, the basal BRET, measured in resting condition, increased with first-order kinetics after exposure to CAPS (Figs. 1 B and 2 B).

The increase in basal BRET, measured using the intramolecular TRPV1 BRET probe, probably reflected the changes in the various modes of energy transfer between Luc and YFP inside the TRPV1 tetrameric organization of the channel during channel opening (18–20). However, the increase in basal BRET between TRPV1 and Calmodulin was more elusive, resulting either from a conformational change in a preassembled TRPV1-CaM complex and/or a modification

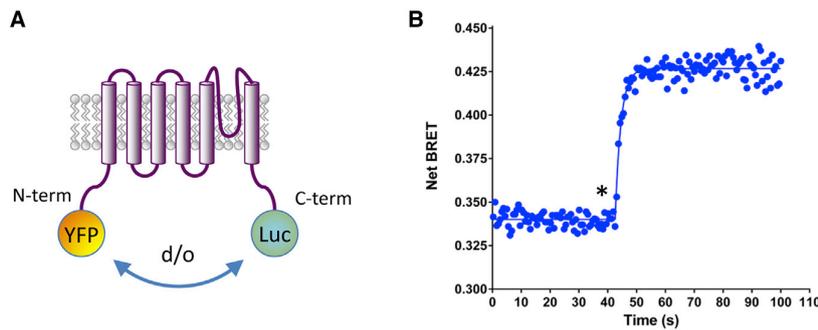


FIGURE 1 Measuring TRPV1 activity using an intramolecular BRET probe. (A) Schematic representation of the YFP-TRPV1-Luc intramolecular BRET probe, where YFP was fused to the N-terminal extremity of TRPV1 while Luc was fused to the C-terminal extremity of TRPV1. After activation of TRPV1, the distance (d) and/or the orientation (o) between Luc and YFP were expected to be modified. (B) Kinetic measurement of the effect of $20 \mu\text{M}$ CAPS on HEK293T cells expressing the YFP-TRPV1-Luc BRET probe. (*Star*) Time of CAPS injection. Data represent one out of five independent experiments. The time-constant (τ) of the BRET increase induced by CAPS is 2.01 ± 0.29 s, $n = 5$. To see this figure in color, go online.

in the association-dissociation equilibrium between these two partners. Interestingly, both chelation of the intracytoplasmic calcium pool using BAPTA-AM or the use of a YFP-tagged Ca^{2+} -insensitive mutant form of CaM (YFP-CaM1234; Rosenbaum et al. (15)) as an acceptor, severely diminished the basal BRET and abolished the CAPS-induced BRET increase. These results indicated that TRPV1 and a pool of calcium-bound CaM were preassociated in resting state and that calcium-bound CaM was essential to observe the CAPS-induced BRET increase in our TRPV1-Luc/YFP-CaM intermolecular BRET assay. To further characterize the interaction between TRPV1 and CaM, we performed BRET titration curves of the TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET pair in the presence and absence of CAPS. As shown in Fig. 2 C, in the absence of CAPS, the BRET ratio increased as a hyperbolic function of the YFP-CaM/TRPV1-Luc ratio, thus indicating a specific protein-protein interaction (11,12,21). The selectivity of the measured signal was further supported by the fact that coexpression of TRPV1-Luc with either YFP-CaM1234 or YFP alone led to a weaker signal that progressed linearly over the same energy acceptor/donor range. Because random

molecular collisions that may give rise to bystander BRET have been shown to increase nearly linearly over a wide range of YFP/Luc (11,12,21), this last result definitely indicated that TRPV1 did not interact with calcium-free CaM. The addition of CAPS dramatically increased the maximal BRET ($BRET_{\text{max}}$) observed and slightly, but significantly, affected the shape of the curve, thus reducing the concentration of YFP-CaM needed to reach 50% of the maximal BRET ratio ($BRET_{50} = 493 \pm 146$ under control conditions but 218 ± 58 with CAPS activation, $p < 0.05$). As $BRET_{50}$ represents the propensity of the BRET partners to interact with one another (i.e., their relative affinity) (11,12,21), our data indicated that the CAPS treatments increased the number of TRPV1/CaM complexes. The increase in the $BRET_{\text{max}}$ also indicated that CAPS activation induced conformational changes within preformed TRPV1/CaM complexes that affected the distance between the energy donor and acceptor and/or their orientation. Again, no BRET changes were observed upon CAPS activation using either TRPV1-Luc/YFP-CaM1234 or TRPV1-Luc/YFP BRET pairs. Finally, ionomycin had no effect on the TRPV1/CaM basal BRET, suggesting that TRPV1 needs

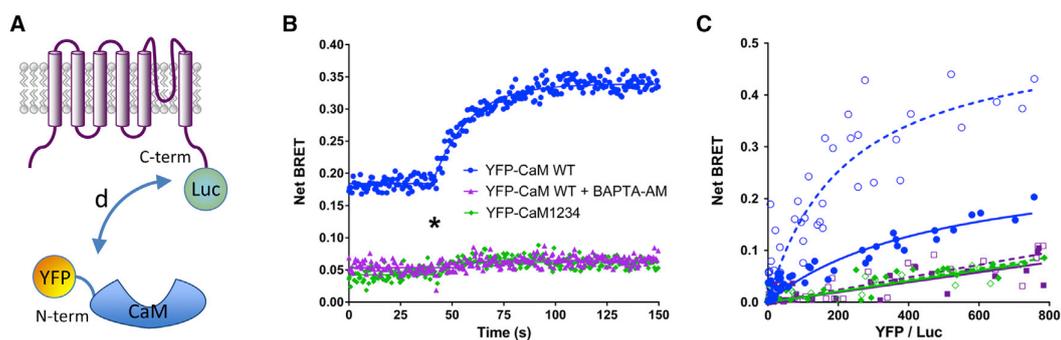


FIGURE 2 Measuring TRPV1 activity using an intermolecular BRET probe. (A) Schematic representation of the intermolecular BRET between TRPV1 and Calmodulin. YFP was fused to the N-terminal of Calmodulin and Luc to the C-terminal of TRPV1. After activation of TRPV1, the distance d between Luc and YFP was expected to be modified. (B) Kinetic measurement of the effect of $20 \mu\text{M}$ CAPS on cells expressing TRPV1-Luc and either YFP-CaM WT or YFP-CaM1234, pretreated or not with $10 \mu\text{M}$ BAPTA-AM for 30 min before activation with CAPS. (*Star*) Time of CAPS injection. Data represent one out of three independent experiments. (C) Titration assays using HEK293T cells transfected with increasing amounts of YFP-CaM WT (circles), YFP-CaM1234 (diamonds), or unfused YFP (square) and a fixed amount of TRPV1-Luc. Transfected cells were activated (*open symbols*) or not (*solid symbols*) with $20 \mu\text{M}$ CAPS before BRET reading. Results represent the data obtained over three independent experiments performed in duplicate. To see this figure in color, go online.

to be activated first to engage more Calcium-bound CaM at a later time (Fig. S6).

We next confirmed that the agonist-induced increase in BRET was dose dependent with half-maximal responses (Fig. 3; Table S1) consistent with those reported in the literature, using patch-clamp or calcium-flux measurements on cells expressing endogenous or overexpressed TRPV1 (22,23). The pharmacological selectivity of the ligand-promoted BRET changes was further demonstrated by the competitive nature of the effects, as both CPZ and AMG517, two well-known TRPV1 competitive antagonists, inhibited the CAPS-induced BRET increase, as illustrated by the shift in CAPS potency to higher values in both intra- and intermolecular BRET tests (Fig. 3; Table S1). Altogether, these data strongly suggested that the agonist-promoted BRET changes in both probe configurations corresponded to an activation of TRPV1 channels in live cells.

Heat activation of TRPV1 monitored by BRET

Another series of experiments assessed the effect of temperature on our BRET probes. BRET was measured in real time while heating the cell culture from 25 to 50°C (Fig. 4, A and B). In cells expressing the TRPV1-Luc/YFP-CaM construct, the basal BRET remained stable between 25 and 37°C. It then increased between 37 and 45°C before reaching a plateau. When the same assay was repeated in a calcium-free buffer or when the cells were preincubated with CPZ, there was no significant change in BRET (Fig. 4 A), indicating that the increase observed was fully related to temperature-dependent channel activation and calcium entry through the channel. In cells expressing YFP-TRPV1-Luc, the BRET remained stable up to 37°C, then decreased dramatically up to 50°C (Fig. 4 B). Preincubation with CPZ before heating completely modified the temperature-dependent behavior of the YFP-TRPV1-Luc probe: the

basal BRET was stable up to 37°C but increased dramatically from 37 to 47°C, before decreasing sharply up to 50°C. Considering that CPZ blocks the opening of the channel over this temperature range (Fig. 4 A and McIntyre et al. (24)), these results indicated that TRPV1 underwent some complex temperature-dependent conformational changes despite the channel remaining in the closed state. In a control experiment, raising the temperature from 25 to 50°C yielded either a weak increase in BRET value in HEK293T cells expressing the YFP-Luc fusion protein (9% increase between 25 and 50°C), or almost no effects in HEK293T cells expressing the CD95-Luc/CD95-YFP BRET probes for the Fas-ligand receptors (Fig. S7). No dramatic drop of the signal was measured, in comparison with the YFP-TRPV1-Luc intramolecular BRET probe. Along with the fact that bioluminescence of Renilla luciferase activity is still measurable when cells are heated (Fig. S4), these results indicate that temperature up to 50°C does not significantly alter the energy transfer between Luc and YFP and further confirm the specificity of the heat response measured with both YFP-TRPV1-Luc and TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probes.

Because it has been proposed that the various TRPV1 activation modes are independently coupled to channel gating (25), we investigated whether heating sensitized TRPV1 to CAPS. Using both probes, a temperature rise from 25 to 42°C resulted in both a leftward shift in CAPS potency and an increase in maximal efficacy (Figs. 4, C and D; Fig. S8). This observation was in agreement with previous studies using the patch-clamp technique (26) and indicated that the temperature response of both YFP-TRPV1-Luc and TRPV1-Luc/YFP-CaM mimicked that of the native TRPV1 channel. Both intra- and intermolecular probes were thus equally well suited to monitoring TRPV1 channel activity. Because TRP channels are known to engage a large network of protein-protein interactions under resting or activated conditions (27), the

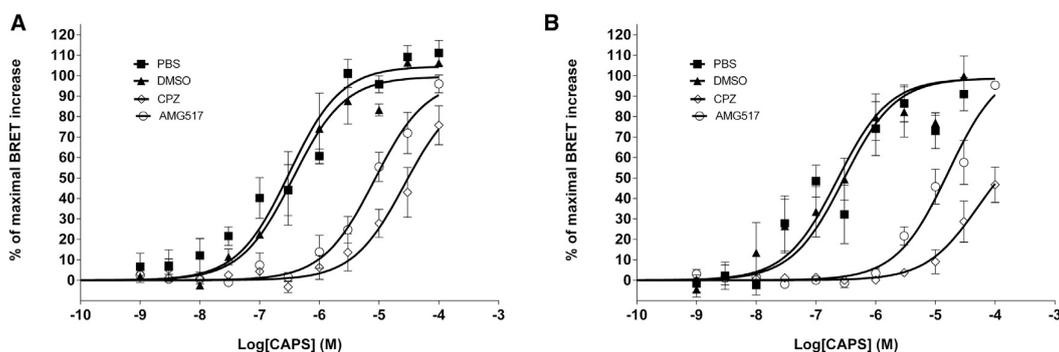


FIGURE 3 Dose-response curves of CAPS-induced BRET changes measured in HEK293T cells expressing the YFP-TRPV1-Luc BRET probe (A) or the TRPV1-Luc/YFP-CaM constructs (B). Before CAPS activation, the cells were preincubated with either PBS, DMSO (vehicle), 1 μ M CPZ, or 1 μ M AMG517. In the presence of CPZ or AMG517, but not in the presence of the vehicle alone, the dose-response curve shifted to higher values and the EC₅₀ was displaced by more than one order of magnitude (see also Table S1). Results represent the mean \pm SE of four independent experiments done in duplicate.

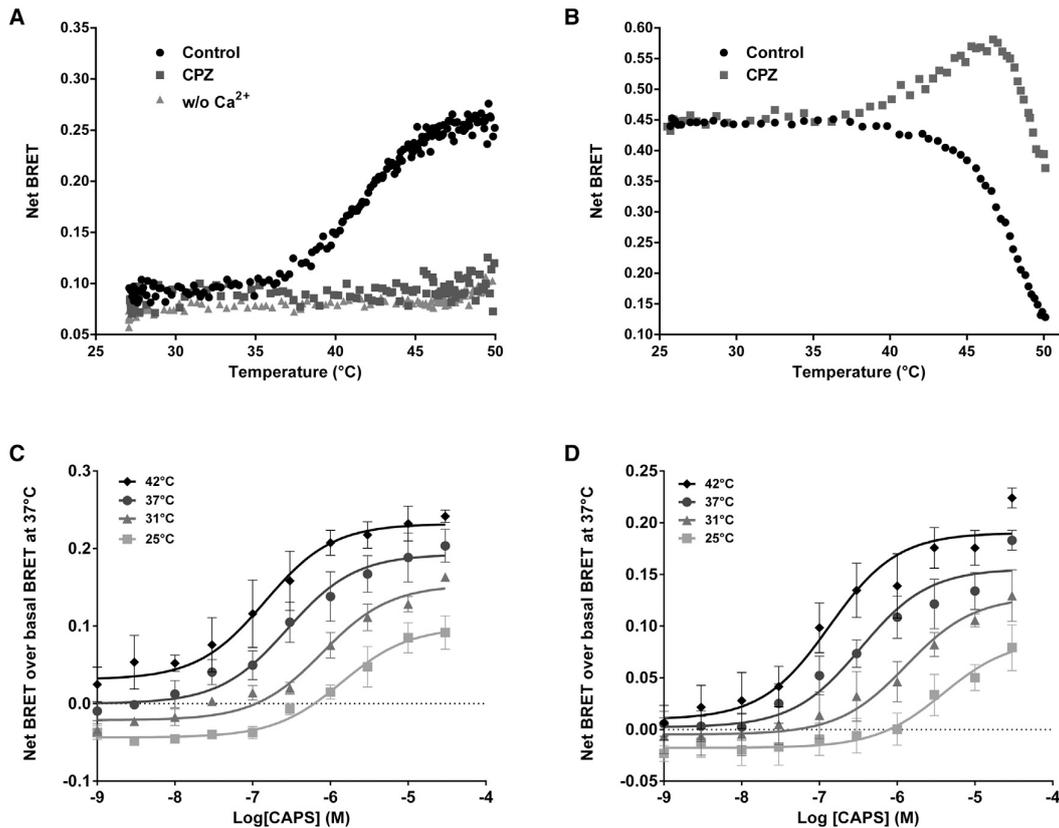


FIGURE 4 Effect of temperature on the pharmacological properties of TRPV1 and its activation, measured by BRET. (A and B) BRET ratios of HEK293T cells expressing either the TRPV1-Luc/YFP-CaM constructs (A) or the YFP-TRPV1-Luc BRET probe (B) were recorded in real time while the cell-culture medium was heated from 25 to 50°C using a Peltier plate. The effects of calcium-free extracellular medium (A) or preincubation of cells with 1 μ M CPZ (A and B), were also tested. BRET ratios were corrected for the minor variation in Luc and YFP emissions due to the temperature increase (see [Materials and Methods](#)). In (A), the fact that the signal remained stable over the whole temperature range under Calcium-depleted conditions and in the presence of CPZ further excluded any bias in BRET measurements due to the denaturation of the Luc or YFP groups. Data represent one out of three independent experiments. (C and D) CAPS dose response curves measured by BRET using HEK293T cells, expressing either the TRPV1-Luc/YFP-CaM constructs (C) or the YFP-TRPV1-Luc BRET probe (D), incubated at 25, 31, 37, or 42°C. Results represent the mean \pm SE of four independent experiments done in duplicate and are expressed as the difference between the net BRET measured in each condition and the basal BRET measured without any agonist at 37°C.

intermolecular-based approach is more promising for studies on CaM-interacting channels or other signaling pathways, while the intramolecular probe is more appropriate for structure-function studies.

Extending the CaM interaction BRET test to TRPV3 and TRPV4 monitoring

The final aim of this work was to monitor the concomitant activation of up to three TRP channels. Consequently, knowing that TRPV3 and TRPV4 also interact with CaM (28), we monitored the activation of TRPV3 and TRPV4 by their specific agonists using the CaM BRET probe approach. As shown in Fig. 5, a dose-dependent increase in BRET between YFP-CaM and Luc-TRPV3 was observed when the transfected cells were challenged with Drofenine, a specific TRPV3 agonist, yielding an

EC_{50} of 206 μ M in agreement with Deering-Rice et al. (29). We found no dose-dependent BRET increase when the same cells were challenged with either the TRPV1-specific agonist CAPS or the TRPV4-specific agonist GSK1016790A. Similarly, a dose-dependent increase in the TRPV4-Luc/YFP-CaM basal BRET was observed when the transfected cells were challenged with GSK1016790A, yielding an EC_{50} of 1.93 nM, also in agreement with Jin et al. (30). As shown for TRPV3, cross activation of TRPV4-Luc/YFP-CaM-expressing cells with either CAPS or Drofenine did not produce any increase in the basal BRET. We also showed that TRPV1-Luc/YFP-CaM interaction was sensitive to CAPS, but not to Drofenine or GSK1016790A (Fig. 5). These results demonstrated the effectiveness and flexibility of the CaM-binding BRET test for monitoring the chemical activation of CaM-interacting TRP channels.

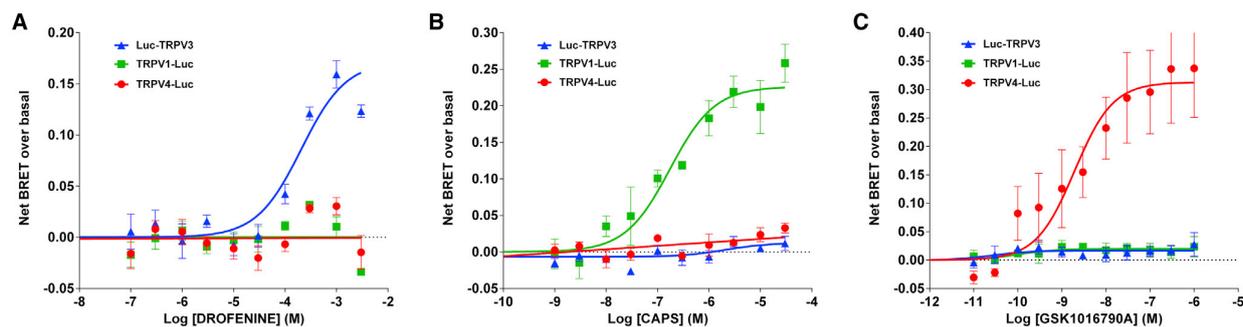


FIGURE 5 Dose-response curve of the effect of Drogenine (A), CAPS (B), and GSK1016790A (C) on HEK293T cells coexpressing YFP-CaM and Luc-TRPV3 (*triangle*), TRPV1-Luc (*square*), or TRPV4-Luc (*circle*). Results are expressed as the difference between the net BRET measured in each condition and the basal BRET measured without any agonist. Basal BRETs of 0.221 ± 0.004 , 0.202 ± 0.003 , and 0.275 ± 0.008 were measured in resting HEK293T cells expressing Luc-TRPV3/YFP-CaM, TRPV1-Luc/YFP-CaM, and TRPV4-Luc/YFP-CaM, respectively. As mentioned for TRPV1, these results potentially indicate that TRPV3 and TRPV4 interacted with CaM under nonactivated conditions. Results represent the mean \pm SE of three independent experiments done in duplicate. To see this figure in color, go online.

Multiplexed BRET monitoring of three TRPV channels using spectral decomposition

We then designed a single test to monitor the activity of several TRP channels simultaneously. The standard filter-based BRET approach constituted a technological barrier to performing a multicolor BRET assay with more than two colors. We therefore extended the BRET full-spectral analysis, already implemented for one acceptor (Fig. 4, A and B; see [Materials and Methods](#)), to analyze three acceptors. For this purpose, a blue-shifted coelenterazine was used to improve acceptor separation, as demonstrated in the BRET2 configuration (31). However, because the advantages associated with the BRET2 system were partly offset by the low quantum yield and rapid decay kinetics of the coelenterazine-400a donor substrate, we used the recently developed methoxy e-Coelenterazine, also known as “purple coelenterazine”, that yields up to 13 times more luminescence, with a maximal emission at 425 nm (32). Moreover, Renilla Luciferase II was used as a donor, as this mutant yields luminescence signals 50 times brighter than those generated by the wild-type (9).

It is known that aquamarine, mAmetrine, and LSSmOrange are all fluorescent proteins, excitable in the 400–430 nm range, with sufficiently different Stoke’s shifts to provide good separation of their emission spectra (10,33–35; Fig. S1). We verified experimentally that the bioluminescence emission spectrum of the Luc enzyme in the presence of purple coelenterazine substrate matched the excitation spectra of aquamarine, mAmetrine, and LSSmOrange (Fig. S1). As previously done for YFP, we modeled the shape of the spectra of aquamarine, mAmetrine, and LSSmOrange and implemented them in our spectral BRET analysis (see [Materials and Methods](#)). The HEK293T cell populations expressing aquamarine-Luc, mAmetrine-Luc, or LSSmOrange-Luc fusion proteins were then mixed in one dish and the multicomponent BRET spectrum was

acquired. Our algorithm fitted a theoretical function to the experimental data obtained, which intrinsically contained the functions of all components (Fig. 6 A). It was then straightforward to calculate the BRET ratio for each probe by dividing the area of the respective acceptor spectrum by that of the donor spectrum. We then mixed together HEK293T cells expressing Luc-TRPV3/aquamarine-CaM, TRPV1-Luc/mAmetrine-CaM and TRPV4-Luc/LSSmOrange-CaM and performed the spectral decomposition of the complex multicolored BRET signal, during agonist activation, in real time. As shown in Fig. 6, B–D, this three-color spectral BRET analysis revealed the selective activation of each TRPV channel in a single well. In each case, agonist stimulation induced a specific increase in its cognate TRPV BRET probe signal. Drogenine injection induced an increase in only the TRPV3-related BRET ratio (Fig. 6 B), while activation with CAPS or GSK1016790A induced a time-dependent increase in only the TRPV1- or TRPV4-related BRET ratio, respectively (Fig. 6, C and D).

DISCUSSION

We report here the characterization of probes for real-time BRET measurement of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 ion-channel activation in live cells. A decomposition of the whole emission spectrum of the BRET signal, instead of the usual selective filter-based approach, provided a reliable method for performing three-color BRET tests. This, to our knowledge, novel approach was used to observe the selective activation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 in a single assay, simultaneously, in real time.

The FRET technique, based on intra- and intermolecular probes, has previously been used to probe conformational changes in various channels in live cells or membranes during activation (36). Alternatively, FRET has also been applied to studying the interactions of some ion channels

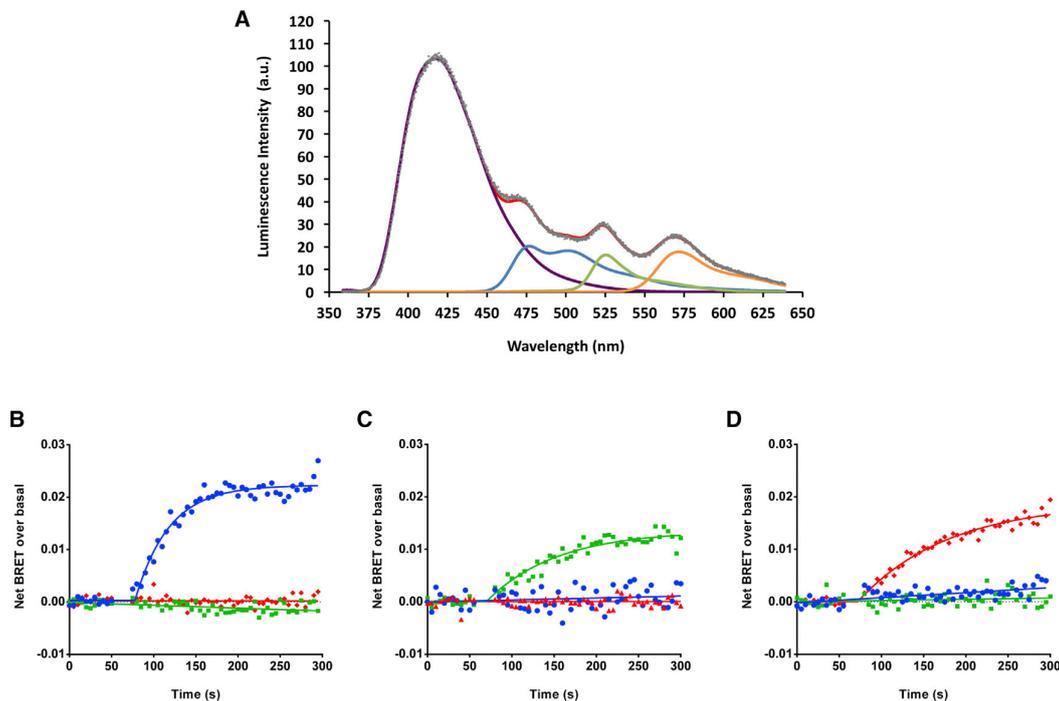


FIGURE 6 Multiplexing measurements of TRPV activity using multicolor BRET. (A) Example of a three-color BRET spectrum and its decomposition, measured in a coculture containing three HEK293T subpopulations transfected with aquamarine-Luc, mAmetrine-Luc, or LSSmOrange-Luc. (Gray dots) Experimental data. (Red line) Best fit to the experimental data. (Purple, blue, green, and orange lines) Spectral components of Luc, aquamarine, mAmetrine, and LSSmOrange, respectively. (B–D) Multicolored BRET produced by Luc and aquamarine, Luc and mAmetrine, and Luc and LSSmOrange were measured in real time in one sample containing a mixed population of cells expressing Luc-TRPV3/aquamarine-CaM (blue line, basal BRET of 0.027 ± 0.002), TRPV1-Luc/mAmetrine-CaM (green line, basal BRET of 0.015 ± 0.001), and TRPV4-Luc/LSSmOrange-CaM (red line, basal BRET of 0.017 ± 0.001) constructs. One mM Difenine (B), 20 μ M CAPS (C), or 100 nM GSK101 (D) were injected 75 s after the beginning of the experiment initiated by the injection of purple coelenterazine into the buffer. Results represent the mean of three independent experiments.

with partners, such as Calmodulin (37–40). These assays offer the advantage of single-cell microscopy imaging that may be combined with voltage-clamp conditions, thus providing a precise control of channel activation while recording the FRET signal. However, eliminating the need for an external light source for donor excitation gives BRET some advantages over FRET: it does not cause photodamage to cells, photobleaching of fluorophores, background autofluorescence, or direct excitation of the acceptor (41). Thanks to these advantages, the BRET technique has been widely implemented for drug screening, especially in the G protein-coupled receptor research field (2). Implementation of high-throughput screening on ion channels, including TRPs, has proved more problematic (42). The gold standard for evaluating the activity of TRPs and other ion channels is patch-clamp electrophysiology. Improvements are rapidly emerging to increase throughput for the direct screening of ion channel targets, including TRP channels, by using automated electrophysiology and planar patch-clamp techniques (43). These approaches remain expensive and require expert handling. Moreover, whereas BRET experiments offer the advantage of using intact cells, the whole-cell recording configuration of the

patch-clamp technique leads to washout of the cytosol by the saline solution in the patch pipette. In addition, mechanical constraints due to pipette positioning on the cell membrane and negative pressure may introduce bias in the measurement of mechanosensitive channel activities, including some TRP channels. For high-throughput screening, indirect readout technologies are often used as an initial screening step, later confirmed by patch-clamp. These techniques usually rely on fluorescent assays to monitor changes in membrane potential or intracytoplasmic calcium concentrations (42,44). Nonetheless, indirect assays of ion channel function often produce false-positive hits, as they monitor endpoints distal from the channel, separated by multiple steps in the signaling pathways. Measuring events proximal to receptor activation reduces the probability of false positives. Therefore, the advent of BRET probes for monitoring the activation of channels in live cells in real time is most valuable.

While steady-state TRPV1 subunit oligomerization had been previously studied using either FRET (18), or a combination of BiMolecular Fluorescence complementation and BRET (20), none of these authors could show any variation of the measured signal after TRPV1 activation. Several

studies succeeded in measuring ion-channel activation using intra- or intermolecular FRET based probes (14,36), but only one research group successfully reported the use of BRET-based biosensors to monitor ion-channel activity, focusing on the Kir3 inwardly rectifying potassium channel in combination with fluorescein arsenical hairpin binder (FIAsH) (45). Adapting the FIAsH/BRET approach to other channels would require extensive studies to determine how to insert the FIAsH sequence into the channel structure to yield optimal variation in the BRET ratio upon channel activation. Moreover, variations in the BRET ratio reported by Robertson et al. (45) were often weak, not exceeding 5–10% of the basal BRET. In sharp contrast, our experiments using TRPV-Luc/YFP-CaM detected significantly larger increases upon activation, ranging from 65 to 115% of the corresponding basal net BRET (Fig. 5). These probes open up, to our knowledge, new prospects for developing simple cell-based assays that provide direct information on channel activity, especially in drug screening.

Our study sheds, to our knowledge, new light on the interaction between CaM and TRPV1. Calmodulin has been identified as a component of the TRPV1 inactivation machinery, although discrepancies remain regarding the Ca^{2+} dependence for TRPV1 interaction, as well as its binding site on TRPV1 (15,16,46,47). Using disruptive biochemical techniques, Lau et al. (47) showed that Ca^{2+} -bound CaM, but not Ca^{2+} -free CaM, interacted with one of the unconventional TRPV1 channel CaM binding sites. In contrast, Rosenbaum et al. (15) reported that the fraction of CaM bound to TRPV1 remained unchanged in the presence or absence of Ca^{2+} . Our TRPV1-Luc/YFP-CaM intermolecular BRET assay demonstrated that TRPV1 and Ca^{2+} -bound CaM were preassociated in resting living cells. Our results also confirmed the observation by Numazaki et al. (16) that more TRPV1-CaM complexes were formed upon CAPS activation. The BRET titration curves clearly indicated that no specific interaction occurred between TRPV1 and Ca^{2+} -free CaM, even after CAPS activation. Finally, our results indicated that conformational changes occurring during CAPS activation of TRPV1 impacted the distance between Luc on TRPV1-Luc and YFP on YFP-CaM proteins and/or their orientation, leading to a higher maximal BRET.

In these experiments, the intramolecular BRET probe was not used to investigate TRPs other than TRPV1, but represented a promising tool for elucidating TRPV1 gating. We observed that, while CAPS treatment induced an increase in the basal BRET of YFP-TRPV1-Luc, heating produced multiple conformational changes (Figs. 1 and 4). In agreement with Yang et al. (48), this indicated that CAPS and heat triggered distinct conformational transitions, both resulting in channel-pore opening.

A voltage-sensitive mechanism was initially proposed to underlie thermosensitive TRP channel gating (49,50). According to this hypothesis, thermal and chemical stimuli

act to increase the intrinsic voltage sensitivity of TRP channels. Nonetheless, an allosteric model in which voltage, temperature, agonists, and inverse agonists are independently coupled, either positively or negatively, has proved to be a more accurate description of many aspects of TRPV1 gating (23,25). We also observed that heat increased CAPS potency and efficacy, using both intra- and intermolecular BRET tests. Altogether, our results are in full agreement with the findings that CAPS and heat promote distinct transitions that are allosterically coupled during channel pore gating (23,25).

The fact that a simple BRET assay was capable of monitoring the chemical activation of three TRPV channels in turn prompted us to measure TRPV1, TRPV3, and TRPV4 activities in a single assay. One of the greatest obstacles to achieving quantitative multiplexed BRET measurements is the overlap among donor and acceptor emission spectra. The usual approach to by-pass this technical barrier, using a two-color BRET assay, is to fine-tune filter sets for sequential measurement of the energy transfer between Luc and two fluorescent acceptors with sufficiently separated emission spectra (33). These authors made a trade-off between the amount of cross-contamination of each acceptor considered, using various filter sets, and the transfer efficiency between Luc and the acceptors. To overcome the limitations of the filter-based strategy, we performed a full spectral decomposition of the BRET signal. Using full-spectral multiplexing, it thus became possible to assess the selective activation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 channels in a single sample. This opens up, to our knowledge, new prospects for evaluating the specific action of particular drugs on different TRPV subtypes within a single experiment.

Full-spectral BRET multiplexing may also be useful for monitoring several molecular events simultaneously or evaluating the kinetics of their engagement. It is known that a single receptor in the G-protein coupled receptor family engages different signaling pathways and that various drugs binding to this membrane protein may differentially influence each of them, leading to a reassessment of the efficacy concept (51). In other words, ligands that are agonists for a given signaling pathway may act as antagonists or even inverse agonists for another pathway via the same receptor. Whether this concept is also applicable to voltage-gated channels, especially TRPs, remains to be determined. The large network of protein-protein interactions in ion-channel pathways offers a rich source of potential drug targets (52). The TRPV1 channel, for example, has been shown to interact with multiple partners, such as Caveolin (53), β -Arrestin-2 (54), AKAP79/150 (55), and PKC β 2 (56), as well as other TRP channels (57). Constructing BRET probes to test the interactions between TRPV1 and each of these partners will greatly contribute to resolving the complex, dynamic interplay between TRPV1 and its interactome, thus offering, to our knowledge, new effective methods for screening

macromolecular complexes in search of new compounds that target protein-channel interfaces. In this context, monitoring multiple signaling pathways via a single multicolored assay protocol represents a highly valuable development.

This report describes an efficient technique for collecting three BRET signals simultaneously from one cell sample. Instead of using a single optical fiber to collect the photons from the sample, it is technically possible to use a bundle of many optical fibers to collect the BRET spectra from multiple samples in real time. This simultaneous recording of the dynamics of three BRET probes in many samples in parallel is likely to provide highly valuable data for drug screening. Channel-specific BRET probes for TRPV1/3/4 will lead to multi-BRET probe readings in a multiwell format, which undoubtedly represents a breakthrough in ion-channel drug screening and drug discovery in general.

SUPPORTING MATERIAL

Eight figures and one table are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(16\)34266-7](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(16)34266-7).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y.P. and B.V. originally conceived the project; H.J.R., Y.P., and B.V. contributed to the conception and designed of the work, and wrote the article; H.J.R. and Y.P. performed the experiments and analyzed the data; G.S. coded the LabView interface for BRET spectra decomposition; F.P.d.G., E.P.-H., and A.H. helped with cell culture, transfection, and molecular biology; I.L. contributed expertise and helped finding financial support and drafting the article; P.V. helped with the calcium assays and drafting the article; and B.G., S.A., and N.S. helped with the spectral BRET signal acquisition. All authors reviewed and approved the article.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), the Conseil Régional de l'Aquitaine, and the European Commission (FP7) (European project GERONIMO, grant agreement No. 603794) for their financial support.

REFERENCES

- Miyawaki, A., and Y. Niino. 2015. Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based probes. *Mol. Cell.* 58:632–643.
- Ayoub, M. A. 2016. Resonance energy transfer-based approaches to study GPCRs. *Methods Cell Biol.* 132:255–292.
- Niehörster, T., A. Löschberger, ..., M. Sauer. 2016. Multi-target spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Methods.* 13:257–262.
- Grecco, H. E., S. Intiaz, and E. Zamir. 2016. Multiplexed imaging of intracellular protein networks. *Cytometry A.* 89:761–775.
- Clapham, D. E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426:517–524.
- Kaneko, Y., and A. Szallasi. 2014. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171:2474–2507.
- Vay, L., C. Gu, and P. A. McNaughton. 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* 165:787–801.
- Kremers, G. J., J. Goedhart, ..., T. W. Gadella, Jr. 2006. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry.* 45:6570–6580.
- Loening, A. M., T. D. Fenn, ..., S. S. Gambhir. 2006. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng. Des. Sel.* 19:391–400.
- Erard, M., A. Fredj, ..., F. Merola. 2013. Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Mol. Biosyst.* 9:258–267.
- Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, ..., N. Heveker. 2005. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* 280:9895–9903.
- Hamdan, F. F., Y. Percherancier, ..., M. Bouvier. 2006. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 5, Unit 5.23.
- Levenberg, K. 1944. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Quart. J. App. Math.* 2:164–168.
- Kobrinisky, E., L. Stevens, ..., N. M. Soldatov. 2006. Molecular rearrangements of the Kv2.1 potassium channel termini associated with voltage gating. *J. Biol. Chem.* 281:19233–19240.
- Rosenbaum, T., A. Gordon-Shaag, ..., S. E. Gordon. 2004. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J. Gen. Physiol.* 123:53–62.
- Numazaki, M., T. Tominaga, ..., M. Tominaga. 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:8002–8006.
- Cheng, W., F. Yang, ..., J. Zheng. 2007. Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *J. Gen. Physiol.* 129:191–207.
- de la Rosa, V., G. E. Rangel-Yescas, ..., L. D. Islas. 2013. Coarse architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel determined by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 288:29506–29517.
- Liao, M., E. Cao, ..., Y. Cheng. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature.* 504:107–112.
- Flynn, R., K. Chapman, ..., C. Altier. 2014. Targeting the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) assembly domain attenuates inflammation-induced hypersensitivity. *J. Biol. Chem.* 289:16675–16687.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, ..., M. Bouvier. 2002. Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 277:44925–44931.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, ..., D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389:816–824.
- Cui, Y., F. Yang, ..., J. Zheng. 2012. Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J. Gen. Physiol.* 139:273–283.
- McIntyre, P., L. M. McLatchie, ..., I. F. James. 2001. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br. J. Pharmacol.* 132:1084–1094.
- Matta, J. A., and G. P. Ahern. 2007. Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J. Physiol.* 585:469–482.
- Vlachová, V., A. Lyfenko, ..., L. Vyklický. 2001. The effects of capsaicin and acidity on currents generated by noxious heat in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 533:717–728.
- Shin, Y. C., S. Y. Shin, ..., J. H. Jeon. 2012. TRIP database 2.0: a manually curated information hub for accessing TRP channel interaction network. *PLoS One.* 7:e47165.

28. Phelps, C. B., R. R. Wang, ..., R. Gaudet. 2010. Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J. Biol. Chem.* 285:731–740.
29. Deering-Rice, C. E., V. K. Mitchell, ..., C. A. Reilly. 2014. Drofenine: a 2-APB analogue with greater selectivity for human TRPV3. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2:e00062.
30. Jin, M., Z. Wu, ..., R. G. O'Neil. 2011. Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One.* 6:e16713.
31. Bertrand, L., S. Parent, ..., L. Ménard. 2002. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs). *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 22:533–541.
32. Zhang, L., F. Xu, ..., W. Min. 2013. Bioluminescence assisted switching and fluorescence imaging (BASFI). *J. Phys. Chem. Lett.* 4:3897–3902.
33. Breton, B., É. Sauvageau, ..., M. Bouvier. 2010. Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys. J.* 99:4037–4046.
34. Shcherbakova, D. M., M. A. Hink, ..., V. V. Verkhusha. 2012. An orange fluorescent protein with a large Stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 134:7913–7923.
35. Takai, A., M. Nakano, ..., T. Nagai. 2015. Expanded palette of nanolanters for real-time multicolor luminescence imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112:4352–4356.
36. Kusch, J., and G. Zifarelli. 2014. Patch-clamp fluorometry: electrophysiology meets fluorescence. *Biophys. J.* 106:1250–1257.
37. Trudeau, M. C., and W. N. Zagotta. 2004. Dynamics of Ca²⁺-calmodulin-dependent inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels measured by patch-clamp fluorometry. *J. Gen. Physiol.* 124:211–223.
38. Derler, I., M. Hofbauer, ..., C. Romanin. 2006. Dynamic but not constitutive association of calmodulin with rat TRPV6 channels enables fine tuning of Ca²⁺-dependent inactivation. *J. Physiol.* 577:31–44.
39. Biswas, S., I. Deschênes, ..., G. F. Tomaselli. 2008. Calmodulin regulation of Nav1.4 current: role of binding to the carboxyl terminus. *J. Gen. Physiol.* 131:197–209.
40. Gonçalves, J. T., and W. Stühmer. 2010. Calmodulin interaction with hEAG1 visualized by FRET microscopy. *PLoS One.* 5:e10873.
41. Pfleger, K. D., and K. A. Eidne. 2006. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods.* 3:165–174.
42. Terstappen, G. C., R. Roncarati, ..., R. Peri. 2010. Screening technologies for ion channel drug discovery. *Future Med. Chem.* 2:715–730.
43. Chambard, J. M., E. Tagat, ..., M. Partiseti. 2014. Transforming TRP channel drug discovery using medium-throughput electrophysiological assays. *J. Biomol. Screen.* 19:468–477.
44. Yu, H. B., M. Li, ..., X. L. Wang. 2016. High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol. Sin.* 37:34–43.
45. Robertson, D. N., R. Sleno, ..., G. Pineyro. 2016. Design and construction of conformational biosensors to monitor ion channel activation: a prototype FAsH/BRET-approach to Kir3 channels. *Methods.* 92:19–35.
46. Lishko, P. V., E. Procko, ..., R. Gaudet. 2007. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron.* 54:905–918.
47. Lau, S. Y., E. Procko, and R. Gaudet. 2012. Distinct properties of Ca²⁺-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *J. Gen. Physiol.* 140:541–555.
48. Yang, F., Y. Cui, ..., J. Zheng. 2010. Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:7083–7088.
49. Voets, T., K. Talavera, ..., B. Nilius. 2005. Sensing with TRP channels. *Nat. Chem. Biol.* 1:85–92.
50. Nilius, B., K. Talavera, ..., T. Voets. 2005. Gating of TRP channels: a voltage connection? *J. Physiol.* 567:35–44.
51. Galandrin, S., G. Oligny-Longpré, and M. Bouvier. 2007. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 28:423–430.
52. Stoilova-McPhie, S., S. Ali, and F. Laezza. 2013. Protein-protein interactions as new targets for ion channel drug discovery. *Austin J. Pharmacol. Ther.* 1(2), pii: 5.
53. Storti, B., C. Di Rienzo, ..., F. Beltram. 2015. Unveiling TRPV1 spatio-temporal organization in live cell membranes. *PLoS One.* 10:e0116900.
54. Por, E. D., S. M. Bierbower, ..., N. A. Jeske. 2012. β -Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. *J. Biol. Chem.* 287:37552–37563.
55. Zhang, X., L. Li, and P. A. McNaughton. 2008. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron.* 59:450–461.
56. Li, L., R. Hasan, and X. Zhang. 2014. The basal thermal sensitivity of the TRPV1 ion channel is determined by PKC β II. *J. Neurosci.* 34:8246–8258.
57. Cheng, W., C. Sun, and J. Zheng. 2010. Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell.* 1:802–810.

7.2.2.4 Étude de l'effet des radiofréquences sur le canal TRPV1

À l'issue de notre travail de caractérisation des sondes BRET TRP, nous décidions d'étudier l'effet de signaux RF environnementaux sur l'activité de TRPV1 en utilisant une porteuse à 1800MHz avec différentes modulations : CW, GSM, UMTS, LTE et Wifi.

Il est vrai que TRPV1 est décrit pour s'activer à partir de 43 °C mais, expérimentalement, il a été montré que le seuil apparent d'activation de TRPV1 peut être déplacé vers des températures plus physiologiques en fonction de l'état de dépolarisation des cellules du pH extracellulaire, de la présence d'agonistes, de cations divalents mais également dans des conditions de surexpression ou d'expression transitoire (Voets et al., 2004; Cao et al., 2014). Ceci est conforme à notre étude précédente où nous montrions que, dans nos conditions expérimentales, TRPV1 présente un seuil d'activation proche de 37 °C. En conséquence, nous avons pu tester l'effet des RF sur TRPV1 dans une gamme de température physiologique.

Ce travail, dont les résultats sont présentés et discutés ci-après, a été soumis à la revue Radiation Research.

TRPV1 activation is not induced by modulated or unmodulated 1800 MHz radiofrequency field exposure in the absence of temperature elevation

Running title: TRPV1 is not sensitive to 1800 MHz RF exposure

Hermanus J. Ruigrok^{1,2}, Delia Arnaud-Cormos³, Annabelle Hurtier^{1,2}, Emmanuelle Poque-Haro^{1,2}, Florence Poulletier de Gannes^{1,2}, Gilles Ruffié^{1,2}, Fabrice Bonnaudin^{1,2}, Isabelle Lagroye^{1,2,5}, Neso Sojic^{2,4}, Stéphane Arbault^{2,4}, Philippe Lévêque³, Bernard Veyret^{1,2} and Yann Percherancier^{1,2,*}

¹Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5218, Talence, France

²Université de Bordeaux, Talence, France

³Univ. Limoges, CNRS, XLIM, UMR 7252, F-87000 Limoges, France

⁴Institut des Sciences Moléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5255, NSYSA Group, ENSCBP, Pessac, France

⁵Paris Sciences et Lettres Research University, Paris, France

*Author correspondance: yann.percherancier@ims-bordeaux.fr

Acknowledgments

We thank the “Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie” (ADEME), the “Conseil Régional d'Aquitaine”, and the European Commission (FP7) (European project GERONIMO, grant agreement No. 603794) for their financial support.

Ruigrok H. J., Arnaud-Cormos D., Hurtier A., Poque-Haro E., Poultier de Gannes F., Lagroye I., Sojic N., Arbault S., Lévêque P., Veyret B. and Percherancier Y. TRPV1 activation is not induced by modulated or unmodulated 1800 MHz radiofrequency field exposure in the absence of temperature elevation. *Radiat. Res.*

The existence of effects of radiofrequency field exposure at environmental levels on living tissues and organisms remains controversial, in particular regarding the potential “nonthermal” effects, produced in the absence of temperature elevation. We thus investigated whether TRPV1, one of the most studied thermosensitive channels, can be activated by the heat produced by radiofrequency fields and by some specific “nonthermal” interaction with the fields. We have recently shown that TRPV1 activation can be assessed in real time on live cells using the Bioluminescence resonance energy transfer technique (Ruigrok et al., 2017). Taking advantage of this innovative assay, we monitored TRPV1 thermal and chemical modes of activation under radiofrequency exposure at 1800 MHz using different signals (CW, GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi, and WiMAX) at Specific Absorption Rates between 8 and 32 W/kg. We showed that, as expected, the heat produced by RF exposure activated TRPV1, but we found no evidence of TRPV1 activation in the absence of temperature elevation under RF exposure. There was no evidence either that, at fixed temperature, radiofrequency exposure altered the maximal efficacy of the agonist Capsaicine to activate TRPV1.

Introduction

Research into the biological and health effects of electromagnetic field (EMF) exposure has been very active in the past two decades, mainly triggered by concerns about potential health effects of power lines and wireless communication systems. While the effects of extremely-low frequency electromagnetic fields (ELF EMF) on the excitation of nerve and muscle cells have been well-characterized, the only known well-characterized effects of radiofrequency fields (RF EMF) on biological systems are caused by dielectric-relaxation heating. In contrast, potential “nonthermal” RF EMF effects refer to bioeffects that are not caused by temperature elevation of living tissue or cell culture medium. The investigation of such mechanisms has been hampered by the absence of robust, reliable and repeatable effects occurring as a consequence of low-level exposures, for which temperature elevation is minimal. Moreover, no plausible mechanistic hypotheses have been given concerning thermal or nonthermal effects of low-level RF EMF exposures (Foster and Repacholi, 2004; Sheppard et al., 2008; SCENIHR 2015), making it difficult to draw conclusions on the basis of available experimental results (Vecchia, 2009). In contrast, there are nonthermal effects known in the static and ELF EMF frequency ranges (SCENIHR 2015)]. The existence of nonthermal biological RF EMF effects to be considered when setting safety limits is therefore of primary importance: guidelines and standards have so far been set to protect from the known health risks associated with the thermal effects of RF EMF exposures.

A new approach was given by Roland Glaser who suggested to study the effects of RF at the molecular level on known biological thermoreceptors (Glaser, 2005). Based on this hypothesis for the detection of nonthermal effects, we have built an experimental setup to assess how thermoreceptors in mammals respond to RF EMF exposure at the molecular level, in terms of both their specific and thermal responses.

A very important class of such thermally sensitive molecules consists of the so-called TRPV-channels (Transient Receptor Potential ion channel Vanilloid), which are found in membranes of various cells including neurons, keratinocytes and aorta endothelial cells (Voets et al., 2004; Wetsel, 2011) (TRP stands for “transient receptor potential,” V indicates the vanilloid sensitive subfamily). Such TRP channels are expected to alter their conformation with a much higher sensitivity than would be possible through a simple Arrhenius mechanism. Caterina et al. achieved a breakthrough in our molecular understanding of thermal and pain sensation by demonstrating that TRPV1 (formerly VR1) channel exhibited activation by capsaicin, the pungent alkaloid of red pepper and by noxious heat, with a

thermal threshold of ≥ 42 °C (Caterina et al., 1997). Importantly, the temperature response threshold of TRPV1 was shown to be shifted to more physiological temperature (32-37 °C) in several experimental conditions including cell depolarisation (Voets et al., 2004), the presence of agonist, divalent cation or low-pH and following transient expression in cell lines (Voets et al., 2004; Cao et al., 2014). In mammals, TRPV3 and TRPV4 are the most important membrane channels that respond to temperature changes in the physiological range (Wetsel, 2011).

We recently used Bioluminescence resonance energy transfer (BRET), a straightforward biophysical technique for studying protein-protein interactions, to monitor TRPV1 activation in real-time and on live cells (Ruigrok et al., 2017). Taking advantage of this innovative method, we herein studied as a model the thermal and chemical modes of TRPV1 activation in real time in live cells under RF EMF exposure to environmental signals at a maximum SAR of 32 W/kg (CW, GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi, and WiMAX).

Results

TRPV1 - Calmodulin BRET probes characterization

The hypothesis that RF may specifically activate TRPV1 channels in live cells, was tested using our recently-developed TRPV1-CaM Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) based assay (Fig. 1A, (Ruigrok et al., 2017)). In that protocol, HEK293T cells were transfected with TRPV1 and CaM constructs fused to Luc, as a bioluminescent energy donor, and YFP, as a compatible energy acceptor, respectively. Following TRPV1 activation by either heat or agonists, an increase in BRET signal was observed. Such BRET increase reflects both the formation of more TRPV1-CaM complexes and a conformational change in these complexes as a consequence of TRPV1 channel activation and gating (Ruigrok et al., 2017). BRET signals are usually assessed using ultra-sensitive microplates luminometers where the bioluminescent signal from the cell sample is measured in a devoted dark chamber. These commercial apparatuses are therefore not suitable for real-time studies under RF exposure since (i) no RF EMF exposure system can be fitted inside the microplate reader, and (ii) no direct temperature measurement of the cell culture medium can be performed. As a consequence, we developed a remote measurement of the BRET signals using an optical fiber coupled to a sensitive spectrometer, making it possible to measure both the BRET signal and the cell-culture medium temperature while exposing the cell culture to RF EMF (Fig. 2 and material and methods).

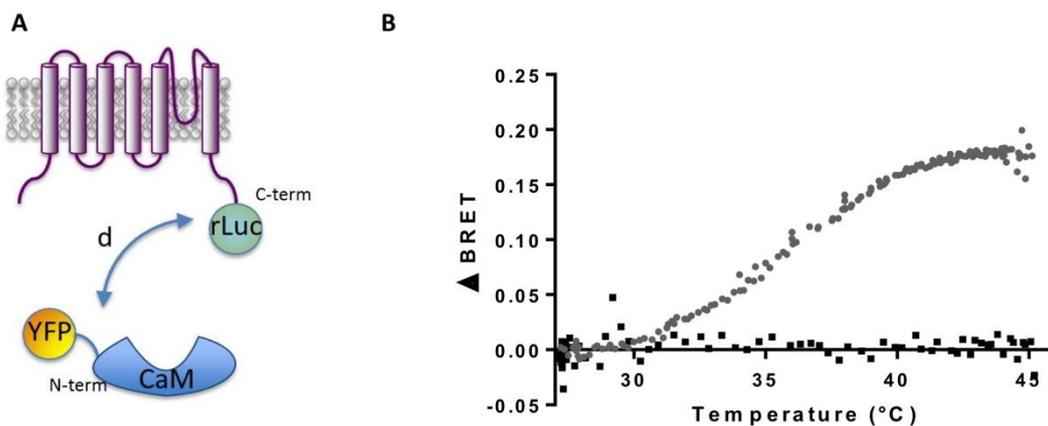


Figure 1. *TRPV1-Luc and YFP-CaM BRET probes construction and characterization.* (A) Construction of the TRPV1-Luc and YFP-CaM BRET probes. cDNA of rLuc and YFP were fused to the C-ter of TRPV1 and the N-ter of CaM respectively. (B) Evolution of the BRET signal as a function of temperature. HEK 293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were heated from 25 to 45 °C using a Peltier apparatus in absence (gray circles) or presence (black squares) of Capsazepine.

We first assessed the effect of temperature elevation on our BRET probes using a Peltier heater. The BRET signal was measured in real time while heating the cell culture from 27 to 45 °C (Fig. 1B). In cells expressing the TRPV1-Luc/YFP-CaM construct, the initial basal BRET signal remained stable between 27 and 31 °C. It then increased linearly with regard to the temperature and reached a plateau at 44 °C. When the same assay was repeated in presence of the TRPV1 inhibitor Capsazepin (CPZ), there was no significant increase in BRET signal, indicating that the BRET increase observed in our test was fully related to temperature-dependent channel activation, as shown previously (Ruigrok et al., 2017).

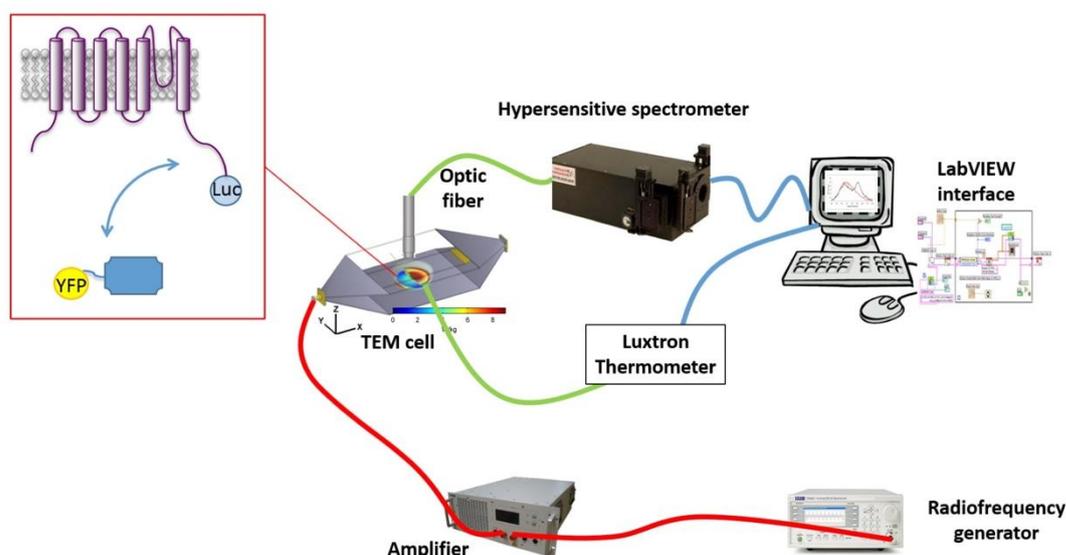


Figure 2. Experimental design used to simultaneously expose cell cultures to RF EMF and acquire the BRET signal.

Effect of RF exposure on TRPV1 activation

HEK293T cells expressing TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probes were exposed to a CW 1800 MHz RF EMF. The temperature of the cell medium and the BRET signal were simultaneously recorded before and during RF EMF exposure. Immediately after the onset of RF exposure, we could observe a progressive increase of the BRET signal indicating that TRPV1 was activated by raising the temperature using an RF EMF source (Fig. 3A). A temperature increase of ca. 5 °C was observed under exposures at a whole volume SAR of around 26 W/kg for 23 min (Fig. 3B). This corresponds to a SAR at the bottom layer of 31 W/kg.

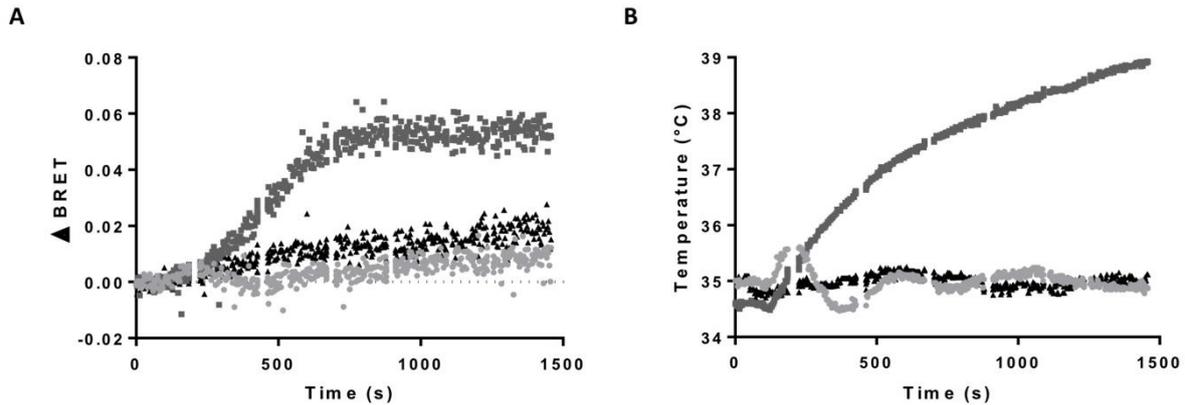


Figure 3. Effects of CW 1800 MHz on TRPV1 activation. HEK 293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were exposed to CW 1800 MHz at 31.1 ± 7.3 W/kg, starting at 120 s, and BRET (A) and temperature (B) were monitored in real-time. **Dark grey squares:** Temperature was allowed to rise under RF exposure up to 40 °C; **Light grey circles:** temperature was stabilized at 35 °C using a Peltier apparatus; **Black triangles:** control without RF exposure at 35 °C.

In such experiments, direct nonthermal TRPV1 activation by RF EMF exposure may have been hidden by RF heating. In order to discriminate a potential nonthermal TRPV1 activation from the thermal activation during RF exposure, the same experiment was performed using the Peltier plate to counteract RF EMF heating in real time. Stabilizing the cell-culture medium at 35 °C under exposure at 26 W/kg dramatically modified the BRET signal that increased only weakly under CW RF EMF exposure (Fig. 3A and B). This evolution of the BRET signal was no different from the no-EMF control condition meaning that the interaction of the TRPV1 with the CaM BRET probes did not vary under RF EMF exposure at stable temperature.

The effects of GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi, and WiMAX signals emitted at levels between 19 and 38 W/kg (see table 2 in material and methods) on TRPV1 activation were also assayed while maintaining the temperature at 35 °C. No differences were found between RF EMF exposed and the no-EMF control conditions (Fig. 4). The experiments using CW, UMTS, and LTE modulations at 1800 MHz were repeated at lower SAR while maintaining the temperature at 35 °C, and again, no difference was observed between RF EMF exposed and the no-EMF control conditions (Sup. Fig. 1).

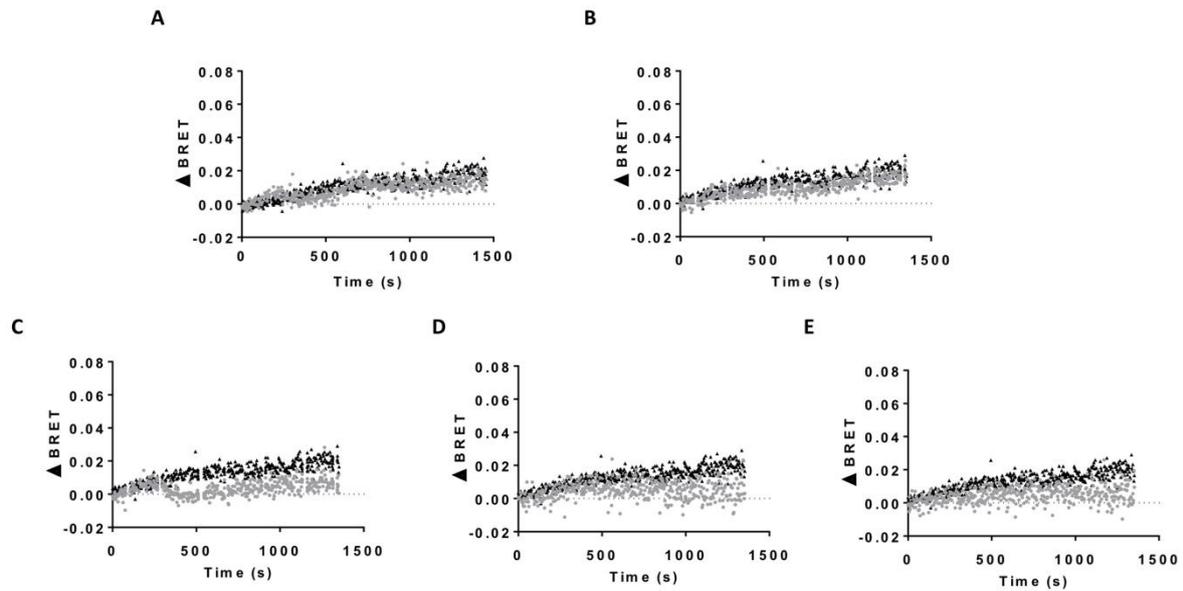


Figure 4. Exposure of cells to high-level of modulated 1800 MHz radiofrequency fields at 35°C. HEK293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were exposed to (A) GSM-modulated 1800 MHz at 38.2 ± 9.0 W/kg, (B) UMTS 1800 MHz at 32.5 ± 7.7 W/kg, (C) LTE 1800 MHz at 31.8 ± 7.4 W/kg, (D) Wi-Fi 1800 MHz at 20.5 ± 4.8 W/kg and (E) WiMAX 1800 MHz at 19.2 ± 4.5 W/kg, starting at 120 s. **Light grey circles:** RF exposed condition. Temperature was stabilized at 35 °C using a Peltier apparatus; **Black triangles:** control without RF exposure at 35 °C.

Effects of Capsaicine and RF co-exposure on TRPV1 activation

Given the polymodal and synergistic modes of activation of TRPV1, the sensitivity of TRPV1 to chemical agonist is acutely tuned by experimental conditions such as temperature, membrane potential, extracellular pH, and intracellular Ca^{2+} concentration (Zheng, 2013). We therefore assessed the potential effect of RF EMF exposure on the chemical mode of TRPV1 activation, using Capsaicin (CAPS), a well-known TRPV1 agonist. We previously confirmed that the agonist-induced increase in our TRPV1/CaM BRET probe signal was dose dependent with potency and efficacy consistent with those reported in the literature (Ruigrok et al., 2017).

HEK293T cells expressing TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probes were next exposed to 1800 MHz RF EMF for 15 min, while maintaining the temperature at 35 °C, before BRET measurement started and CAPS was injected (Fig. 5). As shown in Fig 5A and B, whatever modulation applied, RF EMF exposure did not modify the basal signal recorded before CAPS addition, nor the maximum CAPS efficacy, or the time constant of the CAPS-induced increase in the BRET signal with regards to the no-EMF control condition.

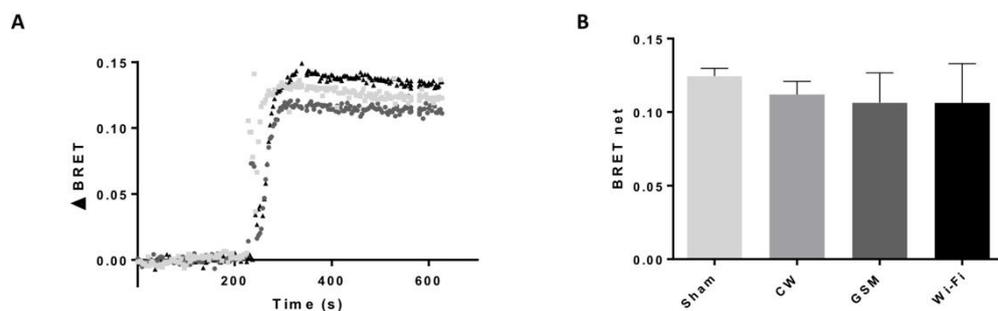


Figure 5. *Co-exposure of cells to 1800 MHz RF and CAPS.* HEK293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were exposed to 1800 MHz CW (A and B), GSM, or Wi-Fi (B), at different SARs for 15 min before coelenterazine H was injected and BRET signal was monitored. Sham was performed without RF exposure. At 200 seconds after Coelenterazine H injection, 30 μ M CAPS was injected to the cells. A. Kinetic of 30 μ M CAPS effect on the TRPV1-Luc / YFP-CaM probes under CW exposure at 15.6 (dark grey) or 62.2 W/kg (black) or without exposure (light grey). Result is representative of 4 independent experiments. B. Maximal BRET response after 30 μ M CAPS treatment under CW at 31.1 ± 7.3 W/kg, GSM at 38.2 ± 9.0 W/kg, or Wi-Fi at 20.5 ± 4.8 W/kg exposure. N=4.

Discussion

Taking advantage of our recently developed TRPV1/CaM-interaction BRET-based test (Ruigrok et al., 2017), we monitored TRPV1 activation in real time in live cells under chemical, heat, or RF EMF exposure at 1800 MHz with several modulations (CW, GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi, and WiMAX) at various SAR levels ranging from 8 to 32 W/kg (see table 2). As expected, TRPV1 was activated under RF EMF exposure, associated with temperature elevation, but specific nonthermal effects of RF may have been hidden. We thus performed experiments with the temperature maintained at 35 °C throughout RF exposure. Under those conditions, there was no activation of TRPV1 (Fig. 3 and 4). Moreover, at constant temperature, we tested the chemical mode of TRPV1 activation using CAPS, and RF EMF exposure did not affect CAPS maximal efficacy (fig. 5).

There have been only two studies by one research group reporting effects of RF EMF exposure that were attributed to TRPV1 processes by the authors (Ghazizadeh and Nazırođlu, 2014; iđ and Nazırođlu, 2015). In the former article, it was shown that one-hour pre-exposure to 2.45 GHz Wi-Fi signals improved CAPS efficacy to activate TRPV1 in neurons from hippocampus and dorsal root ganglion of rats. In the latter study, effects were found in MCF-7 human-breast cancer cells after exposure to GSM RF EMF at 900, 1800, and 2450 MHz. In both cases, TRPV1 activity was not measured in real time but more than one hour after the end of the exposure. In view of the lack of proper dosimetry in these articles, no conclusion can be drawn regarding the validity of the biological results. In sharp contrast, we monitored both temperature and TRPV1 activity in real time in well-shaped adherent cells that were exposed to RF EMF using a proven and reliable exposure system (O'Connor et al., 2010; Kohler et al., 2014).

The aim of our study was to address the pending question about nonthermal effects of RF EMF on biological systems. The hypothesis that we tested was that known thermoreceptors such as TRPVs may be directly responding to RF EMF and not only to the heat produced by exposure. In that context, it was necessary to learn from the recent literature about the nature of the mechanisms of TRPVs activation.

Structural mechanisms underlying activation of the TRPV1 ion channel following capsaicin binding and heating have been described and involve distinct conformational changes (Yang et al., 2015; Chugunov et al., 2016). Molecular dynamics simulations revealed that TRPV1 pore domain with its neighboring loops undergoes large temperature-dependent

conformational transitions in an asymmetric way while CAPS binding onto intracellular domains of TRPV1 distantly affected pore domain gating. None of these mechanisms therefore requires variation of the membrane potential. However it is known that alterations of membrane potential impact the activation by temperature elevation (Zheng, 2013), but RF exposure in the GHz range cannot alter membrane potential as LF exposure does (Sheppard et al., 2008).

We cannot exclude the occurrence of nonthermal RF EMF coupling with other temperature-sensitive channels. There might be a hint of such processes in a recent report suggesting that rats sense a cold thermal stimulus after whole-body chronic exposures to 900 MHz CW RF EMF at 0.1 to 0.3 mW/kg (Pelletier et al., 2013; Pelletier et al., 2014). Since some thermally activated TRP ion channels are known to detect warmth (TRPV3 and TRPV4) and coolness (TRPM8, TRPA1) (Tan and McNaughton, 2016; Vriens et al., 2014), it will be worth investigating the potential interaction of these ionic channels with RF EMF. The BRET technique represents an innovative and easy means to monitor these molecular mechanisms in real time and on live cells under exposure.

In conclusion, we found no evidence of nonthermal effects of RF EMF exposure on the TRPV1 thermoreceptor. The a priori knowledge is that there are no known receptors that are specific to the RF spectrum range, within which there are no electronic resonant absorptions, as opposed to the visual pigment in the visible range, but further research into other TRPs or other families of ionic channels are worth performing to strengthen this conclusion.

Material and methods

Plasmids-

pcDNA3.1-hTRPV1-Luc and pcDNA3.1-YFP-CaM constructions have been described in (Ruigrok et al., 2017).

Reagents-

Capsaicin and Capsazepine were acquired from Tocris (Bristol, UK). Coelenterazine H (Nanolight Technology, Pinetop, AZ, USA) was added to a final concentration of 5 μ M.

Cell culture and transfections-

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and streptomycin. Twenty hours before transfection, cells were seeded at a density of 500,000 cells in 6-well dishes. Transient transfections were performed using 4 μ g PEI for 1 μ g DNA in OptiMEM medium (Invitrogen). Then 0.25 μ g of the donor TRPV1-Luc and 1.75 μ g of the acceptor YFP-CaM were transfected. After overnight incubation, cells were detached and seeded 24 h before BRET assays at a density of 10^6 onto glass coverslips (Knittel Glass, 12 mm diameter) treated with poly-L-lysine (0.1 g/L).

BRET assays-

The BRET assays were performed using an optical fiber coupled to a Spectra Pro 2300i (Acton) spectrometer. The glass coverslips containing the cells were deposited in a Teflon chamber containing a 1.5 ml saline solution (NaCl 0.145 M, KCl 5 mM, KH_2PO_4 4 mM, CaCl_2 1 mM, MgSO_4 1 mM, Glucose 10 mM). Coelenterazine H is added to the cells and full BRET spectra were acquired every 3 s, and analyzed as explained in (Ruigrok et al., 2017). The temperature was either maintained stable throughout the experiment, or raised from 25 to 45 $^\circ\text{C}$, using a Peltier apparatus. Finally, Capsaicin was injected in the culture media at the indicated concentrations and times to activate TRPV1.

RF exposure system-

The Teflon chamber hosting the HEK293T cells was placed on the ground plane inside a transverse electromagnetic (TEM) cell in which the RF signal was propagating (Fig. 2 and Fig. 5) (O'Connor et al., 2010; Tanvir et al., 2016). Several RF EMF signals were delivered to the TEM cell using a vector generator (SMBV100A, Rohde & Schwarz, Munich, Germany) connected to a 10 W power preamplifier in series with a 200 W power amplifier (RF14002600-10, and RFS1800-200, RFPA, Artigues-Près-Bordeaux, France, respectively). The cell culture medium temperature was regulated using a Thermostat Plus microplate Peltier heater (Eppendorf, Hamburg, Germany) placed below the TEM ground plane, and monitored using a fiber optic temperature monitoring system (Luxtron-812, Lumasense Technologies, Santa Clara, USA). Temperatures were recorded in real time along with the BRET data using a custom LabView interface described in (Ruigrok et al., 2017). Numerical and experimental dosimetry of the exposure system was carried out to determine the SAR values.

Numerical dosimetry

The numerical dosimetry was performed using a custom Finite Difference Time Domain (FDTD)-based code solving Maxwell's differential equations in the time domain within a spatially-meshed structure with elementary cells (Leveque et al., 1992; Taflove and Hagness, 1995). The simulated structure is shown in Fig. 6. Due to the large size of the TEM cell and the small dimensions of the Teflon chamber, a non-uniform spatial discretization was used with a finest mesh size of 100 μm . The SAR distribution provided by FDTD simulations illustrated that higher SAR values were localized at the chamber bottom, i.e. at the exposed biological cells level (Fig. 6). The normalized SAR value within the cells layer was 6.2 ± 1.4 W/kg/W (mean \pm SD), and the whole-volume mean SAR was 5.2 ± 1.9 W/kg/W at 1800 MHz (CW signal).

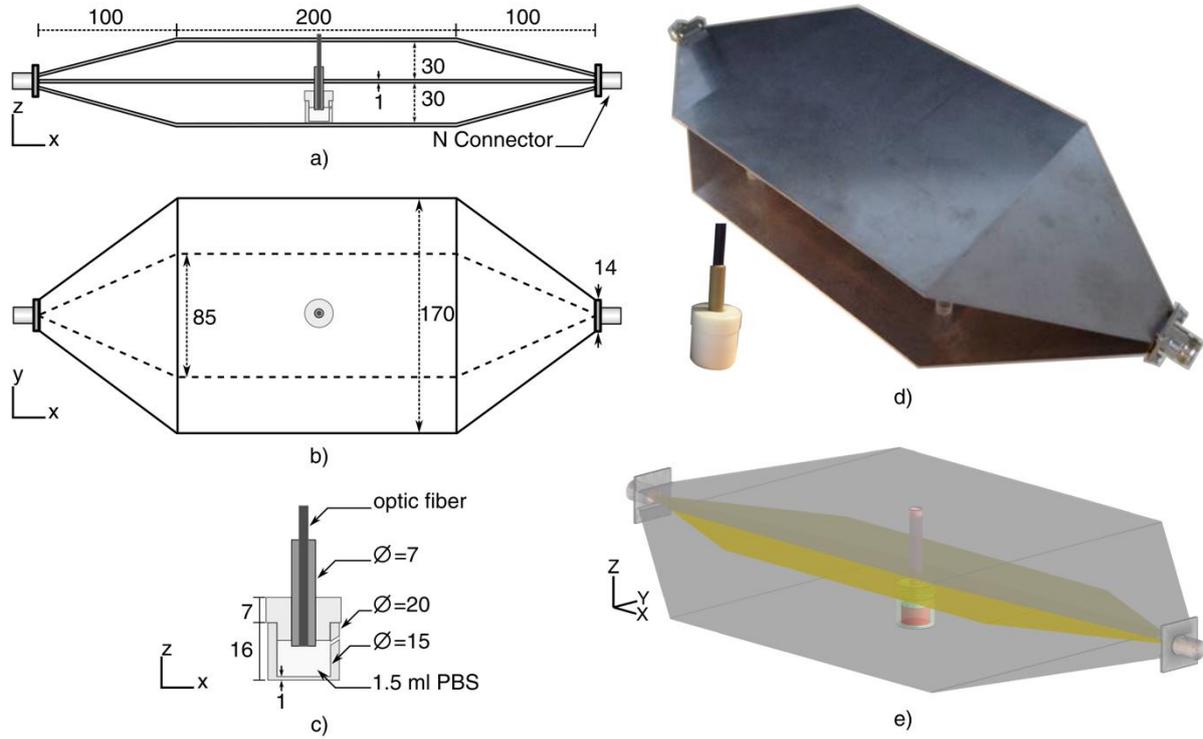


Figure 6. TEM Cell exposure system and the Teflon chamber: a) TEM cell front-view, b) top-view and c), the chamber; d) 3D-view of the TEM Cell and the Teflon chamber with the optic fiber used for BRET measurement; e) numerical model of the Teflon chamber filled with 1.5 ml PBS inserted in the TEM Cell. Dimensions are in mm.

Experimental dosimetry

SAR evaluation was performed using a non-perturbing thermometric method using a Luxtron 812 probe. The TEM cell was equipped with the BRET chamber filled with 1.5 ml saline solution. After the temperature reached the equilibrium state, the vector signal generator connected to the amplifiers delivered a CW power at 1800 MHz. Temperature acquisitions were performed inside the chamber, before and during exposure, with the probe placed at the location of temperature monitoring during BRET measurements. Starting from the RF ON state ($t=t_0$), temperature measurements were measured over a time duration of 150 s. To calculate the SAR, early temperature data points from t_0 were interpolated using a linear regression. The slopes of the straight lines represent the term $\Delta T/\Delta t$ at $t = t_0$ as reported in equation (1):

$$(1) \quad SAR = 4186 c \left. \frac{\Delta T}{\Delta t} \right|_{t_0}$$

where the term c , equal to 0.95, is the specific heat scale factor, 4186 is the sample specific heat expressed in J/(kg K), ΔT is the change in temperature (in K) for time change Δt (in s).

A significant temperature increase is required to allow experimental SAR assessment. Therefore, a CW input power of 5 W was applied giving SAR values of 19.5 ± 2.0 W/kg and 27.5 ± 4.0 W/kg, for two different probe positions. Probe #1 was placed in the corner of the cylinder perpendicular to the longest axis of the TEM cell, and probe #2 was along the cylinder's symmetry axis (Fig. 7). Both probes were used sequentially and were in direct contact with the bottom of the BRET chamber. Normalized SAR values obtained from numerical simulations and experimental measurements are in good agreement (Table 1).

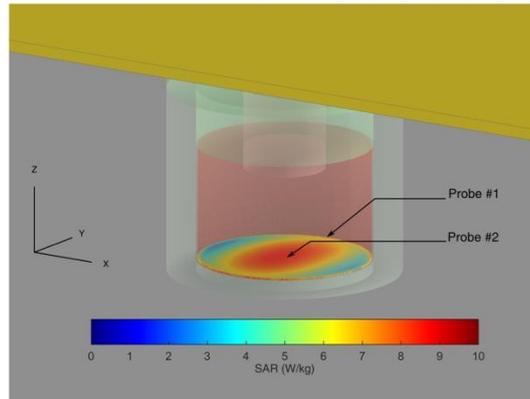


Figure 7. SAR distribution provided by FDTD simulations within the cells layer for 1 W CW input power at 1800 MHz.

TABLE 1: Normalized SAR values obtained from numerical simulations and experimental measurements for 1 W CW input power at 1800 MHz.

SAR (W/kg) for 1 W CW input power at 1800 MHz				
	Volume	Cell layer	Probe #1	Probe #2
Simulated	5.2±1.9	6.2±1.4	4.5±0.6	8.3±0.2
Measured			3.9±0.4	5.5±0.8

RF generator settings

Exposure conditions with different SAR levels between 8 and 32 W/kg were used in the experiments. Based on the SAR levels, settings of the generator were determined for the six signals used. The characteristics of the signals (Table 2) were chosen to be realistic and with a duty factor as large as possible (Signals are available from Rhode & Schwartz: SMBV-K200, Part No. 1415.8531.72). The averaged output power delivered by the signal generator were measured using a power meter and a wideband power sensor (N1912A and N1921A, Agilent, Santa Rosa, CA, USA). The measured values have been reported in Table 2 for the six signals

and for several SAR levels. With a 47.7 dB total gain including the amplification and losses, the TEM cell input powers were 1.25 and 5 W for the CW signal.

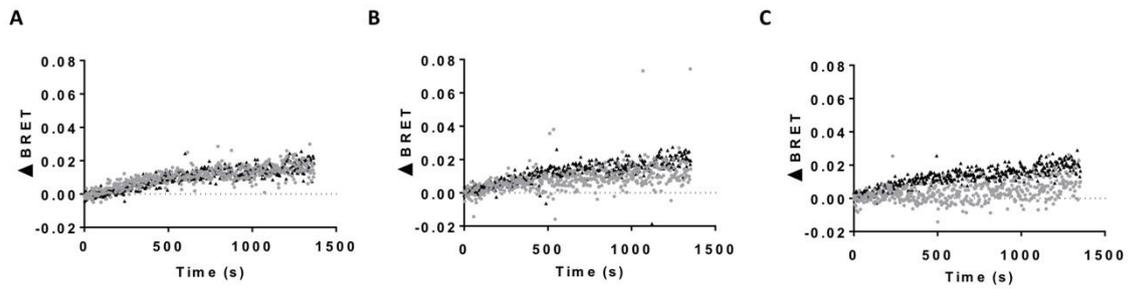
TABLE 2: Settings and measurements of the signal generator output power for the various RF signals and for different SAR levels.

Signal	Generator setting power (dBm)	SAR (W/kg), mean±SD	
	Average power level (dBm)	1.6-ml volume	Bottom layer
CW	-16.7	6.5 ± 2.3	7.8 ± 3.0
	-10.7	26.1 ± 9.3	31.1 ± 7.3
GSM	-0.9	32.1 ± 11.5	38.2 ± 9.0
UMTS	-16.6	6.9 ± 2.5	8.2 ± 1.9
	-10.6	27.4 ± 9.8	32.5 ± 7.7
LTE	-16.9	6.7 ± 2.4	8.0 ± 1.9
	-10.9	26.7 ± 9.6	31.8 ± 7.4
Wi-Fi	-12.9	17.3 ± 6.2	20.5±4.8
WiMAX	-8.9	16.1 ± 5.7	19.2 ± 4.5

Data analysis-

Data were analyzed using the Prism 6.01 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). The Mann-Whitney test was then used to compare each group against the no-EMF control group. Probabilities of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All values are presented as mean ± SEM.

Supplementary Figures:



Supplementary figure 1. *Exposure of cells to lower-levels of 1800 MHz radiofrequency fields at 35 °C.* HEK293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were exposed to (A) CW-modulated 1800 MHz at 7.8 ± 3.0 W/kg, (B) UMTS 1800 MHz at 8.2 ± 1.9 W/kg, and (C) LTE 1800 MHz at 8.0 ± 1.9 W/kg, starting at 120 s. **Light grey circles:** temperature was stabilized at 35 °C using a Peltier apparatus; **Black triangles:** control without RF exposure at 35 °C.

Bibliography

- Cao, X., Ma, L., Yang, F., Wang, K., and Zheng, J. (2014). Divalent cations potentiate TRPV1 channel by lowering the heat activation threshold. *J Gen Physiol* *143*, 75-90.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* *389*, 816-824.
- Chugunov, A.O., Volynsky, P.E., Krylov, N.A., Nolde, D.E., and Efremov, R.G. (2016). Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. *Sci Rep* *6*, 33112.
- Çiğ, B., and Nazıroğlu, M. (2015). Investigation of the effects of distance from sources on apoptosis, oxidative stress and cytosolic calcium accumulation via TRPV1 channels induced by mobile phones and Wi-Fi in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* *1848*, 2756-765.
- Foster, K.R., and Repacholi, M.H. (2004). Biological effects of radiofrequency fields: does modulation matter? *Radiat Res* *162*, 219-225.
- Ghazizadeh, V., and Nazıroğlu, M. (2014). Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis*
- Glaser, r. (2005). Are thermoreceptors responsible for “non-thermal” effects? In Edition *Wissenschaft* (
- Kohler, S., Ticaud, N., Iordache, M.-M., Moisescu, M.G., Savopol, T., Leveque, P., and Arnaud-Cormos, D. (2014). Setup for simultaneous microwave heating and real-time spectrofluorometric measurements in biological systems. *Progress In Electromagnetics Research* *145*, 229-240.
- Leveque, P., Reineix, A., and Jecko, B. (1992). Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas: application of FDTD method. *Electronics letters* *28*, 539-541.
- O'Connor, R.P., Madison, S.D., Leveque, P., Roderick, H.L., and Bootman, M.D. (2010). Exposure to GSM RF fields does not affect calcium homeostasis in human endothelial cells, rat pheochromocytoma cells or rat hippocampal neurons. *PLoS One* *5*, e11828.
- P. vecchia, R. Matthes, J.C. Lin, R.D. Saunders, G. Ziegelberger, and A. (2009). Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz). Swerdlow, eds. (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection).
- Pelletier, A., Delanaud, S., de Seze, R., Bach, V., Libert, J.P., and Loos, N. (2014). Does exposure to a radiofrequency electromagnetic field modify thermal preference in juvenile rats? *PLoS One* *9*, e99007.
- Pelletier, A., Delanaud, S., Décima, P., Thuroczy, G., de Seze, R., Cerri, M., Bach, V., Libert, J.P., and Loos, N. (2013). Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy balance in developing rats. *Environ Sci Pollut Res Int* *20*, 2735-746.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), Potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF), 27 January 2015.

Ruigrok, H.J., Shahid, G., Goudeau, B., Poullétier de Gannes, F., Poque-Haro, E., Hurtier, A., Lagroye, I., Vacher, P., Arbault, S., et al. (2017). Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Three TRPV Channels. *Biophys J* *112*, 87-98.

Sheppard, A.R., Swicord, M.L., and Balzano, Q. (2008). Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. *Health Phys* *95*, 365-396.

Taflove, A., and Hagness, S.C. (1995). *Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time-Domain Method* (Boston: Artech House).

Tan, C.H., and McNaughton, P.A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* *536*, 460-63.

Tanvir, S., Thuróczy, G., Selmaoui, B., Silva Pires Antonietti, V., Sonnet, P., Arnaud-Cormos, D., Lévêque, P., Pulvin, S., and de Seze, R. (2016). Effects of 3G cell phone exposure on the structure and function of the human cytochrome P450 reductase. *Bioelectrochemistry* *111*, 62-69.

Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* *430*, 748-754.

Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* *430*, 748-754.

Vriens, J., Nilius, B., and Voets, T. (2014). Peripheral thermosensation in mammals. *Nature Reviews Neuroscience* *15*, 573-589.

Wetsel, W.C. (2011). Sensing hot and cold with TRP channels. *Int J Hyperthermia* *27*, 388-398.

Yang, F., Xiao, X., Cheng, W., Yang, W., Yu, P., Song, Z., Yarov-Yarovoy, V., and Zheng, J. (2015). Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol* *11*, 518-524.

Zheng, J. (2013). Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol* *3*, 221-242.

7.2.3 Analyse globale du comportement cellulaire sous exposition RF à l'aide de l'impédancemétrie.

7.2.3.1 Introduction à l'impédancemétrie et aux mesures de comportement cellulaire sans marquage.

Bien que de nombreux effets cellulaires différents induits par les RF aient été décrits sur diverses cellules primaires ou en lignées, on ne sait pas si ces différentes réponses sont autant de manifestations possibles des effets de l'exposition ou si celles-ci trouvent leurs origines dans un mécanisme moléculaire unique. Etant donné la complexité du vivant, l'étude des effets des RF à l'aide d'un test unique ne permettrait de voir, au mieux, que l'un des aspects des effets potentiellement complexes des champs sur les cellules. Une approche intégrative, permettant de mesurer le comportement global de la cellule au cours de l'exposition, faciliterait énormément l'identification des paramètres critiques des champs. Récemment, l'avènement des nouvelles techniques d'analyse des cellules sans l'aide de marqueurs a révolutionné les activités de recherches liées au criblage de substances actives. Parmi ces techniques, la mesure de l'impédance cellulaire apparaît comme une approche extrêmement fiable et rapide. L'utilisation de la mesure d'impédance pour mesurer l'activité globale des cellules adhérentes s'appuie sur le fait que l'adhésion des cellules sur un réseau de microélectrodes induit un changement dans l'environnement local à l'interface électrode-milieu de culture, entraînant une augmentation de l'impédance entre les électrodes (Fig. 15). Tout changement dans les propriétés physiologiques des cellules conduit donc à une variation de la mesure d'impédance cellulaire.

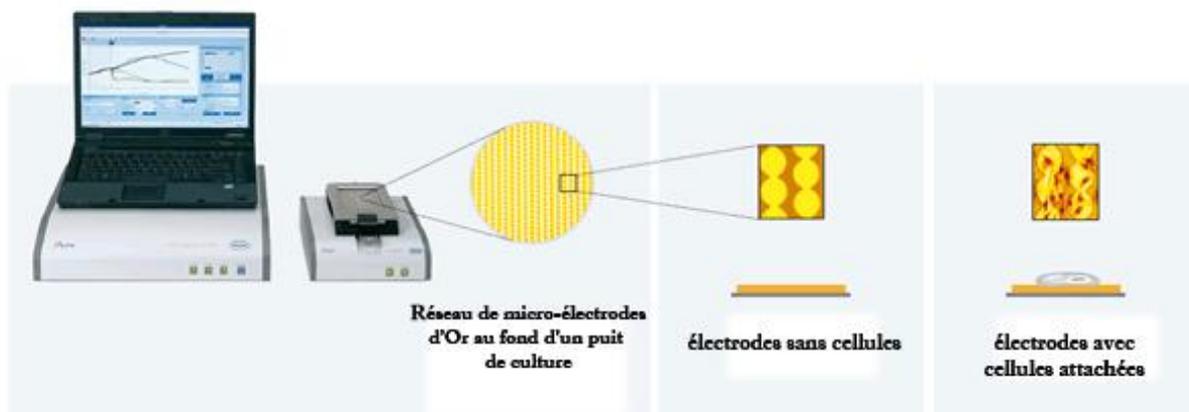


Figure 15 : Représentation schématique du système XCelligence (ACEA) et des cellules sur le réseau de microélectrodes tapissant le fond des puits de mesure.

Récemment, la mesure d'impédance cellulaire a été utilisée avec succès pour étudier les mécanismes d'actions de drogues pharmacologiques et la signalisation au travers des

récepteurs couplés aux protéines G, mais également l'activité cytotoxiques de composés chimiques, l'activité cytotolytique des virus et des bactéries, la prolifération et la différenciation cellulaire ou encore la chimiotaxie⁵. En particulier, on a montré que la mesure d'impédance permettait de caractériser l'activité de composés actifs sur la base de signatures comportementales spécifiques (Stallaert et al., 2012). Cette technique a de fait été adoptée par de nombreuses entreprises de pharmacologie pour cribler des banques de composés potentiellement actifs.

7.2.3.2 Utilisation de l'impédancemétrie en bioélectromagnétisme.

Sur la base du projet exploratoire ANSES RF-BioCell dont j'ai été le porteur en 2013, nous avons proposé d'utiliser la mesure d'impédance pour intégrer l'ensemble des réactions cellulaires potentiellement causées par l'exposition aux différents types de signaux RF et de cribler grâce à cette technique les paramètres des champs efficaces. L'impédancemétrie s'est avéré être une technique de choix pour l'étude du comportement cellulaire sous exposition à des champs électromagnétiques. En effet, bien que d'autres technologies existent qui permettent également une analyse du comportement cellulaire au moyen de mesures optiques (par exemple, le système EPIC de Corning), il s'avérait être extrêmement difficile de réaliser une exposition homogène dans les puits de mesure au format 96-puits sans provoquer d'échauffement du milieu de culture. Une idée ingénieuse était alors d'utiliser les électrodes tapissant le fond des puits des plaques de mesure du XCelligence pour non seulement enregistrer la mesure de l'impédance mais également pour émettre les RF au plus près des cellules avec un débit d'absorption spécifique (DAS) théoriquement important. Différentes étapes ont été nécessaires à l'équipe de Philippe Lévêque, avec qui nous avons collaboré étroitement, pour déterminer la faisabilité de cette stratégie. Elles sont résumées ici :

- Modélisation des électrodes. La difficulté ici est liée à la taille extrêmement petite des électrodes et des grandeurs mises en jeu en regard de la longueur d'onde. Dans une première phase, une partie simplement des électrodes a été modélisée pour analyser les paramètres sensibles lors de la modélisation. Ensuite, une analyse complète sur un puits a été effectuée (Fig. 16A).
- Mesure des paramètres électriques hautes fréquences du dispositif. Une connectique a été réalisée sur une plaque 16 puits à partir d'un câble coaxial connecté à différents puits. Ceci a montré la possibilité d'adaptation en basse fréquence du dispositif (jusqu'à la centaine de MHz) ainsi qu'en haute fréquence (supérieur au GHz). Pour les autres bandes de fréquence, il a été

⁵ <https://aceabio.com/real-time-cell-analysis-applications/>

montré la possibilité d'adaptation avec l'emploi d'un adaptateur double ou triple stub placé avant le connecteur à proximité de la plaque.

- Modélisation de l'exposition des cellules. La dosimétrie numérique montre qu'en utilisant les électrodes tapissant le fond des puits pour exposer les cellules, les champs sont concentrés au voisinage des électrodes, c'est-à-dire au niveau des cellules. Ceci permet d'avoir des niveaux élevés d'exposition avec un rendement parmi les meilleurs des dispositifs utilisés aujourd'hui, soit 2000 W/Kg par watt incident (Fig. 16 B-D). De plus, des premières mesures de température dans les puits montrent que du fait de la concentration de l'exposition au niveau des cellules, l'exposition RF est réalisée sans provoquer d'élévation de température significative dans le milieu de culture cellulaire (Fig. 16E).

La conclusion de cette étude est que l'utilisation des électrodes de mesure du système XCelligence permet une exposition très homogène des cellules avec un rendement excellent (Fig. 16), ce qui permet d'envisager des expérimentations avec des puissances incidentes faibles (de l'ordre de quelques mW à quelques dizaines de mW).

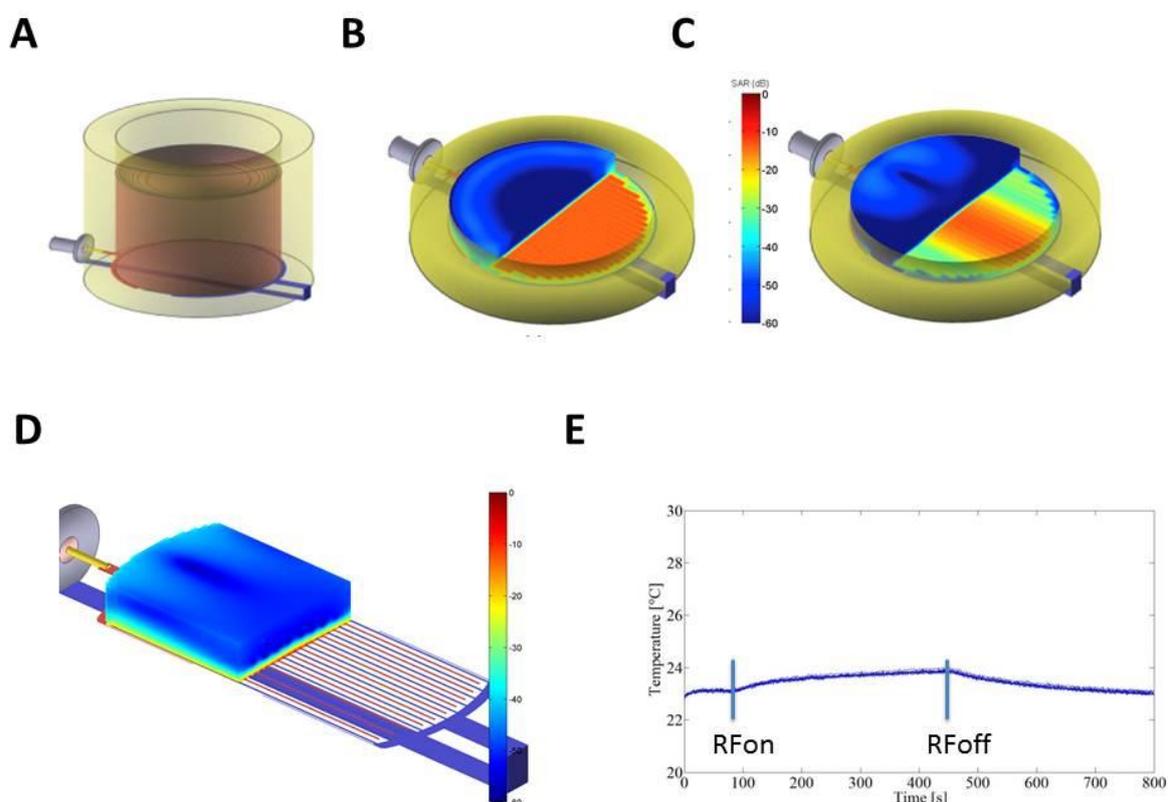


Figure 16 : Dispositif développé et caractérisé à partir de la plaque 16 puits de l'appareil d'impédance-métrie xCELLigence. A) modélisation de la structure en considérant un seul puits ; B et C) distribution spatiale de DAS à 13.56 MHz (B), et à 1800 MHz (C) dans le plan des cellules et dans le milieu de culture. D) Coupe

transversale de la distribution du DAS à 1800 Mhz dans une épaisseur de 1mm au-dessus des électrodes. Le DAS est illustré par une échelle des couleurs en db en B, C et D. E) Mesure de température dans le plan des cellules à l'aide de la rhodamine B suite à une exposition 1800 MHz CW à 200 W/Kg.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue IEEE Trans. Biomed. Engineering en 2016 :



Grâce à notre participation au projet européen GERONIMO ainsi qu'à l'obtention d'un co-financement régional, nous avons pu acheter un système XCelligence qui contient trois plateformes indépendantes (système DP), chacune pouvant accueillir une plaque 16 puits au moyen de connecteurs en or. L'équipe de recherche de Philippe Lévêque a pu transformer ce système commercial en branchant un circuit électrique parallèle qui relie le générateur de signaux RF à ces connecteurs en or sans provoquer d'interférence sur la mesure d'impédance, et sans provoquer aucun problème de compatibilité électromagnétique avec le fonctionnement du XCelligence. Ce dispositif, nommé XCellRF, permet l'utilisation des plaques commerciales pour réaliser des mesures d'impédance tout en exposant les cellules aux RF (Fig. 17).



Figure 17 : Vue de face et de côté du système XCelligence modifié afin de permettre de délivrer des CEM aux différentes plateformes de mesure.

L'énorme avantage de ce système est qu'il rend possible la mesure en temps réel de plusieurs conditions expérimentales simultanément tout en réalisant l'exposition des cellules. Différentes configurations peuvent être envisagées (Fig. 18). En utilisant le schéma expérimental de la figure 18.B, il est par exemple possible de mesurer en duplicata l'effet de 5 niveaux de D.A.S. (dont le sham) sur deux types cellulaires différents avec ou sans co-exposition avec un chimique, soit vingt conditions testées en simultanément.

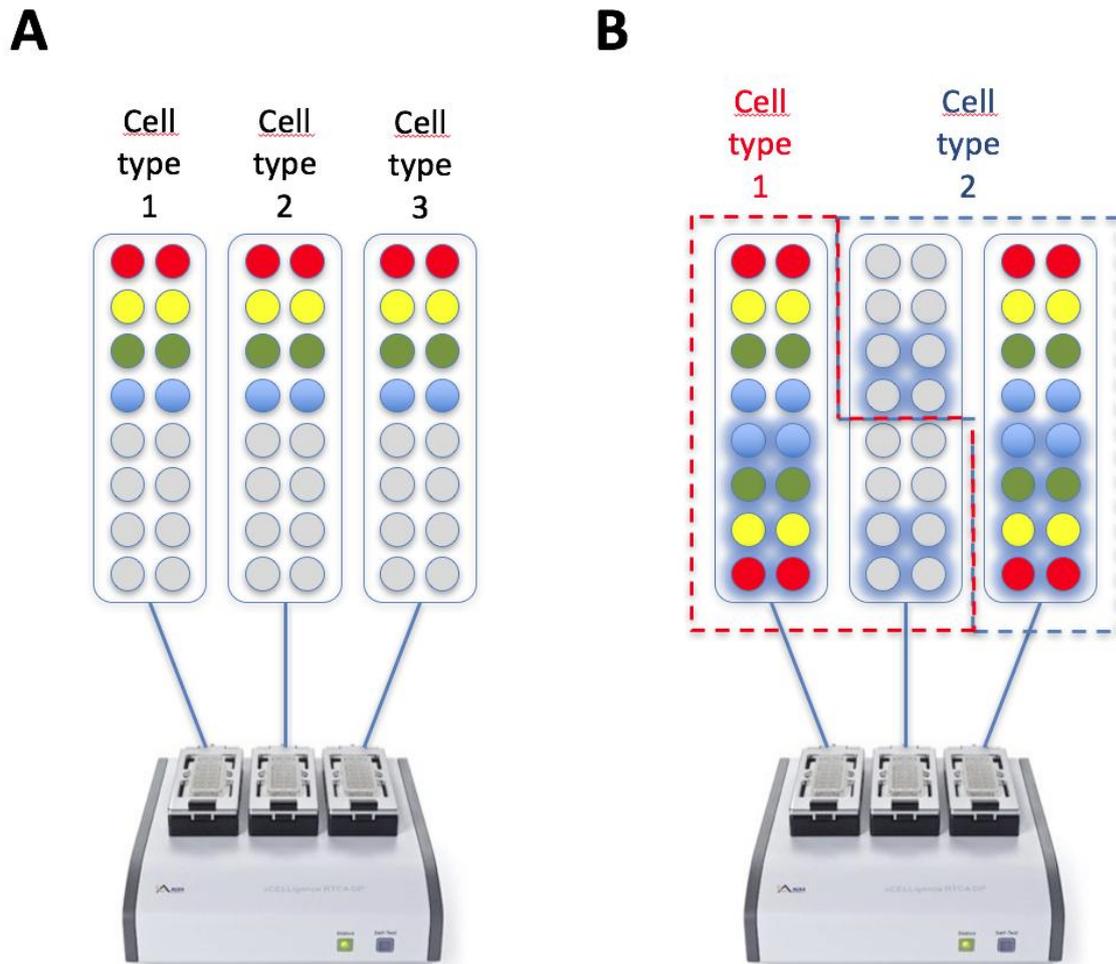


Figure 18 : Exemples de schéma expérimental permettant la mesure de l'impédance sur trois types cellulaires en parallèle sans activation par un chimique (A) ou de deux types cellulaires en parallèle avec co-activation par un chimique (B). Gris : sham, Rouge: D.A.S. max., Jaune: 47% du D.A.S. max, Vert: 31% du D.A.S. max, Bleu: 21% du D.A.S. max. Les puits ayant un éclat bleu sont ceux qui reçoivent un traitement à l'aide d'un chimique.

7.2.3.3 Résultats expérimentaux

Tel qu'énoncé précédemment, l'impédance du flux d'électrons entre les électrodes interdigitées au fond des puits est modifiée par la présence des cellules adhérentes. La variation au cours du temps de l'impédance est mesurée en utilisant un paramètre sans unité appelé indice cellulaire (Cell index, CI), défini selon la formule suivante :

$$CI = \frac{z_t - z_0}{z_n}$$

où z_t est l'impédance mesurée au temps t ; z_0 est l'impédance mesurée en l'absence des cellules et z_n est l'impédance nominale.

Classiquement, on observe une augmentation rapide de l'indice cellulaire durant les premières heures suivant le dépôt des cellules dans les puits. Ceci est provoqué par le dépôt progressif des cellules sur le tapis d'électrodes puis de leur déploiement. Une fois les cellules adhérentes, si le nombre initial de cellules est faible et qu'il y a des espaces vides sur le fond du puits, les cellules proliféreront en entraînant une augmentation graduelle mais régulière de l'indice cellulaire jusqu'à obtenir un plateau qui correspondra au moment où les cellules seront confluentes (Fig. 19).

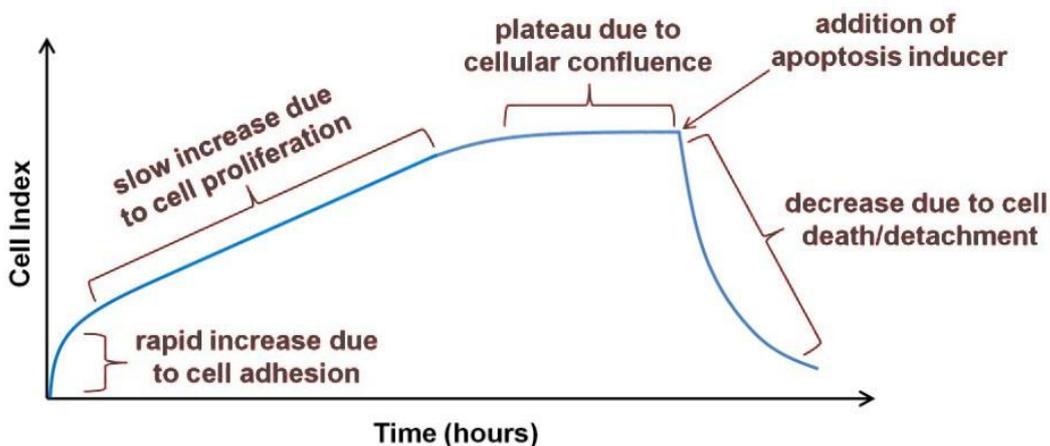


Figure 19 : Tracé modèle de l'évolution de l'indice cellulaire suite au dépôt des cellules dans les puits de mesure. L'ajout d'un inducteur de l'apoptose sur les cellules confluentes entraîne la mort cellulaire et la chute de l'indice cellulaire (d'après <https://aceabio.com/product/rtca-dp/>).

Si à un moment donné, un chimique est ajouté, il est susceptible d'entraîner une modification rapide de l'indice cellulaire. Par exemple, un inducteur de l'apoptose va entraîner une perte de l'indice cellulaire qui correspondra à la mort cellulaire (Fig. 19). Mais des signatures plus spécifiques avec des variations rapides en montée ou en descente peuvent être observées pour différents activateurs chimiques, représentant autant de « signatures » du comportement cellulaire dans le temps⁶.

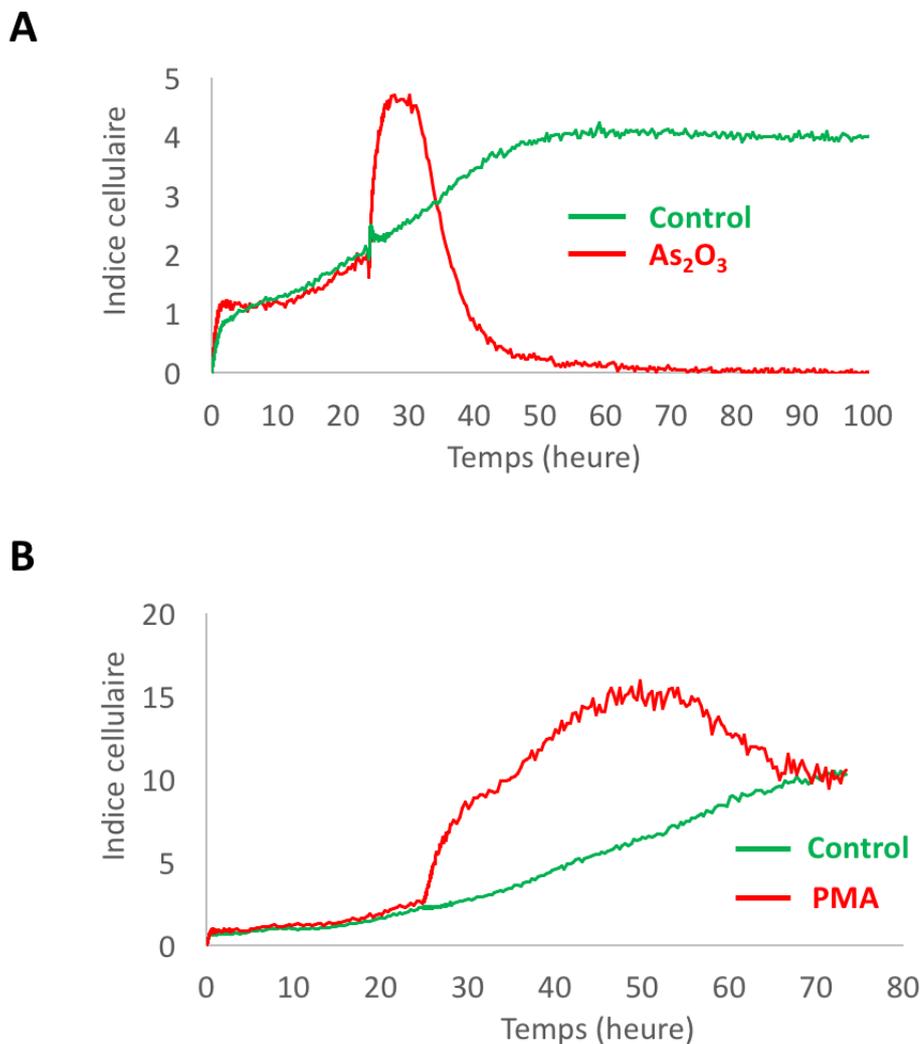


Figure 20 : Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules SH-SY5Y (A) et MCF-7 (B) dans des conditions contrôles ou en présence d'une activation par un chimique. À t_0 , 25.000 cellules SH-SY5Y ou 5.000 cellules MCF-7 ont été déposées au fond des puits et l'impédance est alors mesurée sur une durée allant de 80 à 100 heures. Vingt-quatre heures après le début de l'expérience, les cellules SH-SY5Y sont activées ou non en présence d'As₂O₃ 10 μ M et les cellules MCF-7 sont activées ou non en présence de PMA 1 nM.

⁶ <https://aceabio.com/publications/>

Nous avons voulu étudier l'effet des champs RF sur le comportement de la lignée de neuroblastome SH-SY5Y et de la lignée de cellules tumorales mammaires MCF-7, afin de réaliser une preuve de principe de notre approche. Ces deux lignées, dans des conditions où les cellules ne sont pas activées, présentent un tracé conforme au tracé modèle présenté en Fig. 19 (tracés verts sur la Fig. 20). Vingt-quatre heures après avoir débuté les expériences, la lignée SH-SY5Y a été activée à l'aide de trioxyde d'Arsenic (As_2O_3) qui entraîne l'apoptose de ces cellules (Akao et al., 1999), et la lignée MCF-7 a été activée en présence de phorbol Myristate Acétate (PMA) (Fig. 20). L'activation des cellules SH-SY5Y par l' As_2O_3 se traduit par une augmentation rapide de l'indice cellulaire suivie par un court plateau puis par une chute brutale, pour retomber à zéro au bout de 70 heures, indiquant la mort cellulaire. L'activation des cellules MCF-7 par le PMA entraîne également une augmentation rapide de l'indice cellulaire mais sur une période plus longue, avant d'atteindre un plateau au bout de 50 heures. Il suit alors une décroissance de l'indice cellulaire qui retourne au niveau de l'indice mesuré dans des conditions contrôles au bout de 80 heures. Ces deux profils indiquent clairement une réponse cellulaire aux agents chimiques utilisés. Notre acquisition étant purement phénotypique, il est évident qu'il n'est pas possible en l'état de dissenter sur la nature des voies de signalisation mises en jeu ici, outre qu'il est connu que le PMA entraîne l'activation de la PKC du fait de son analogie de structure avec le diacylglycérol. Cependant, l'obtention de signatures bien caractéristiques dans des conditions contrôles et dans des conditions activées est un atout pour étudier l'effet des RF sur les cellules, que ce soit en présence ou non d'une co-exposition avec un agent chimique.

Nous avons ensuite pu déterminer la dose optimale de chaque agent activateur à utiliser en réalisant une dose-réponse de trioxyde d'Arsenic sur les cellules SH-SY5Y et de PMA sur les cellules MCF-7 (Fig. 21). Les profils obtenus sont très intéressants car ils montrent à quel point la cinétique des événements complexes au sein des cellules est affectée par la dose de produit ajouté. Dans le cas de l' As_2O_3 , en dessous de 1 μM , il n'apparaît aucune variation significative de la mesure. Par contre, au-dessus de 1 μM , la quantité de produit ajoutée affecte l'amplitude de la montée initiale de l'indice cellulaire mais sans modifier la constante de temps de cette montée, et surtout accélère progressivement la phase de mort cellulaire. Au contraire, la PMA joue considérablement sur la constante de temps de la montée initiale de l'indice cellulaire, ainsi que sur l'amplitude de l'effet maximal. Des effets sont visibles à partir de 0.1 nM avec un effet maximal obtenu à partir de 3 nM de PMA. Sur la base de ces expériences, nous avons décidé d'utiliser dans le reste de nos expériences une dose de 10 μM d' As_2O_3 sur les cellules SH-SY5Y et 0,5 nM de PMA sur les cellules MCF-7, ces doses produisant des effets intermédiaires.

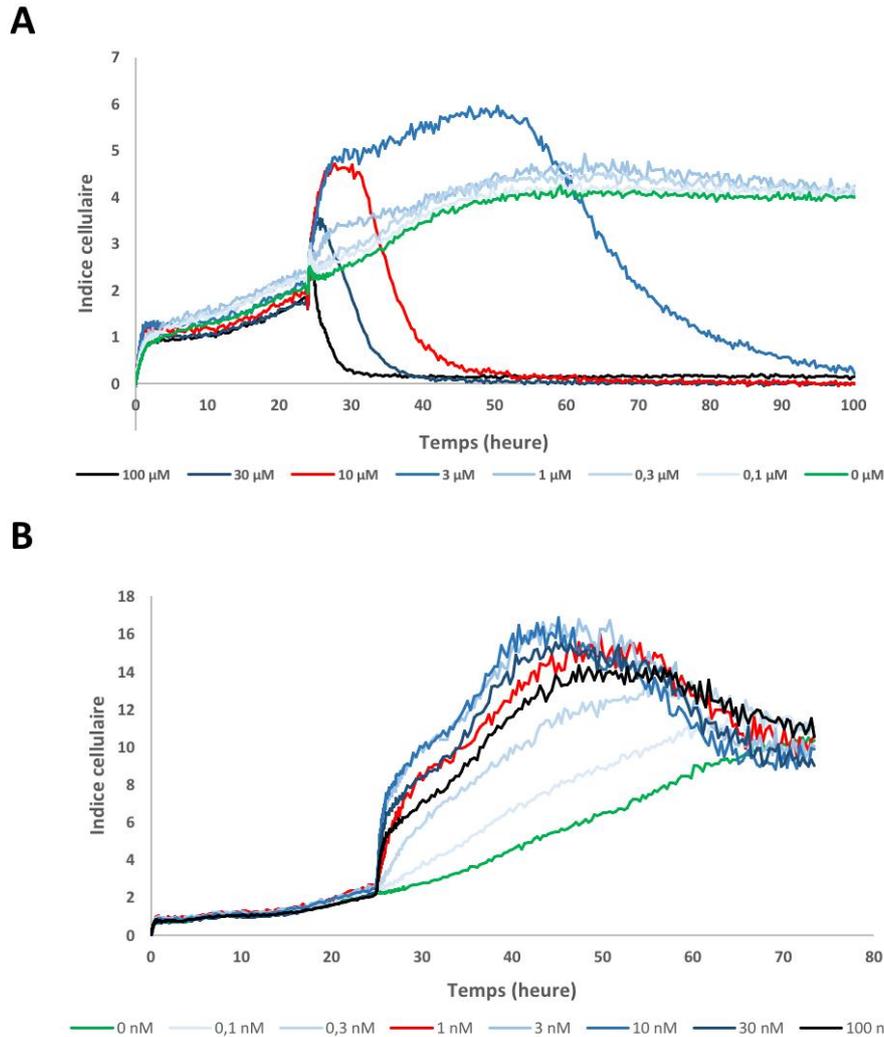


Figure 21 : Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules SH-SY5Y (A) et MCF-7 (B) dans des conditions contrôles ou en présence d'une activation par différentes concentrations de produit chimique activateur. À t_0 , 25.000 cellules SH-SY5Y ou 5.000 cellules MCF-7 ont été déposées au fond des puits et l'impédance est alors mesurée sur une durée allant de 80 à 100 heures. Vingt-quatre heures après le début de l'expérience, les cellules SH-SY5Y sont activées ou non en présence de différentes concentrations d' As_2O_3 et les cellules MCF-7 sont activées ou non en présence de différentes concentrations de PMA.

Ayant caractérisé la signature comportementale des deux lignées cellulaires humaines SH-SY5Y et MCF-7 dans des conditions de repos et suite à une stimulation chimique, nous avons pu entreprendre l'étude du comportement de ces deux lignées cellulaires sous exposition RF. Le comportement de ces deux lignées a donc été mesuré sur 72 heures en exposant les cellules, dès leur mise en culture, à un champ électromagnétique 1800 MHz présentant différentes modulations (CW, GSM, UMTS, LTS ou Wi-Fi) et émis à des D.A.S. allant de 5 W/Kg à 24 W/Kg. Rappelons ici que du fait de la concentration du champ

électrique dans l'épaisseur des cellules, la production de chaleur est immédiatement dissipée dans le milieu de culture (voir Fig.16E où une exposition à 200 W/kg entraîne une augmentation de température inférieure à 1 °C dans le plan des cellules). Vingt-quatre heures après la mise en culture, la moitié des cellules a été activée soit par la PMA soit par l'As₂O₃ alors que l'autre moitié des cellules n'a été mise en contact qu'avec le solvant du produit activateur (du DMSO pour la PMA, et de l'eau pour l'As₂O₃)(Fig. 22).

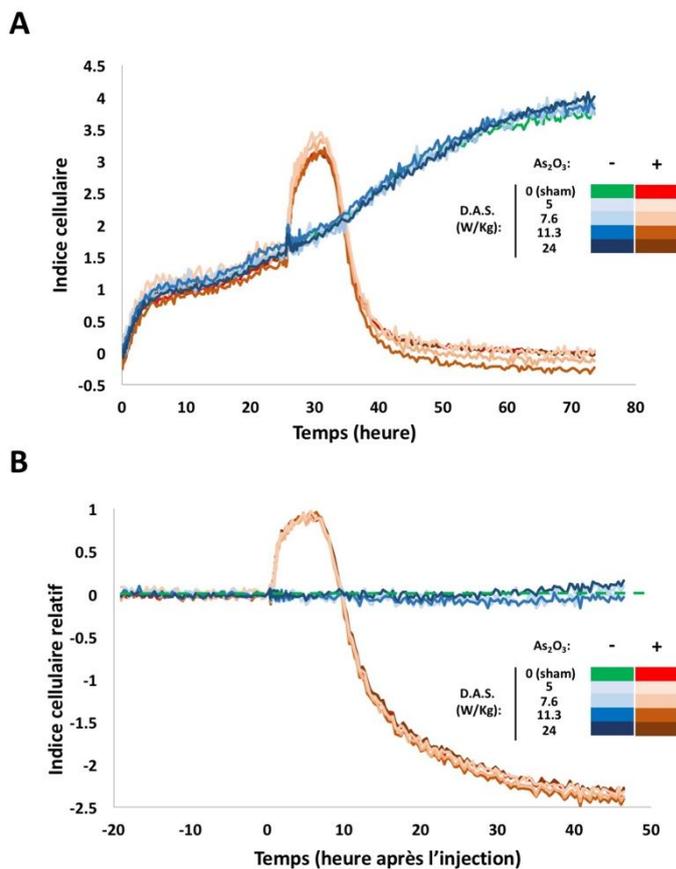


Figure 22 : Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules SH-SY5Y (A) exposées à un champ RF 1800 MHz dépourvu de modulation (signal CW), à différents D.A.S et co-exposées ou non avec de l'As₂O₃. À t₀, 25.000 cellules SH-SY5Y ont été déposées au fond des puits et l'impédance est alors mesurée sur une durée allant jusqu'à 80 heures. Vingt-quatre heures après le début de l'expérience, les cellules SH-SY5Y sont activées en présence d'As₂O₃ 10 µM. A) Résultats bruts. B) Les résultats sont exprimés de manière relative par rapport au moment de l'injection et par rapport au contrôle Sham non-stimulé, tel qu'expliqué dans le texte.

Les résultats indiquent une absence d'effet des RF sur le comportement des cellules SH-SY5Y, quelle que soit la modulation utilisée (GSM, UMTS, LTE, ou WiFi). Les RF n'ont pas non plus d'incidence sur la réponse des cellules SH-SY5Y à l'As₂O₃. Afin d'illustrer notre propos, nous montrons en exemple le résultat obtenu en présence de la porteuse non modulée (signal CW) (fig. 22A), étant admis que le résultat est identique en présence de modulation de la porteuse. Afin de bien comparer les résultats obtenus dans les différentes conditions d'exposition, les résultats de la fig. 22A ont été ré-analysés de manière relative tel qu'il l'a été décrit par (Stallaert et al., 2012). Brièvement, les valeurs d'indice cellulaire obtenus à chaque temps sont normalisés en étant divisé par l'indice cellulaire obtenu au moment de l'injection, puis exprimées en termes de différence par rapport à la condition sham / non-activée. Cette représentation permet de linéariser le profil de référence (la condition sham / non-activée) et de mettre en exergue toute variation du CI entre les différentes conditions testées et la

condition contrôle. Il est clair au regard de la fig. 22B qu'aucune différence significative n'est apparente entre les différentes conditions testées. Le trioxyde d'Arsenic entraîne bien la signature comportementale attendue mais l'exposition aux champs RF ne la modifie nullement.

Le résultat est le même lorsque nous utilisons les cellules MCF-7 activées ou non par la PMA. Aucune différence significative n'est observée dans les conditions non-activées entre le sham et les cellules exposées aux RF à différents D.A.S. allant jusqu'à 24 W/kg (la Fig. 23 montre un exemple de résultats sous exposition à un signal CW). De la même manière, le profil d'activation des cellules MCF-7, par une dose sub-optimale de PMA, n'est pas significativement modifié par l'exposition aux RF.

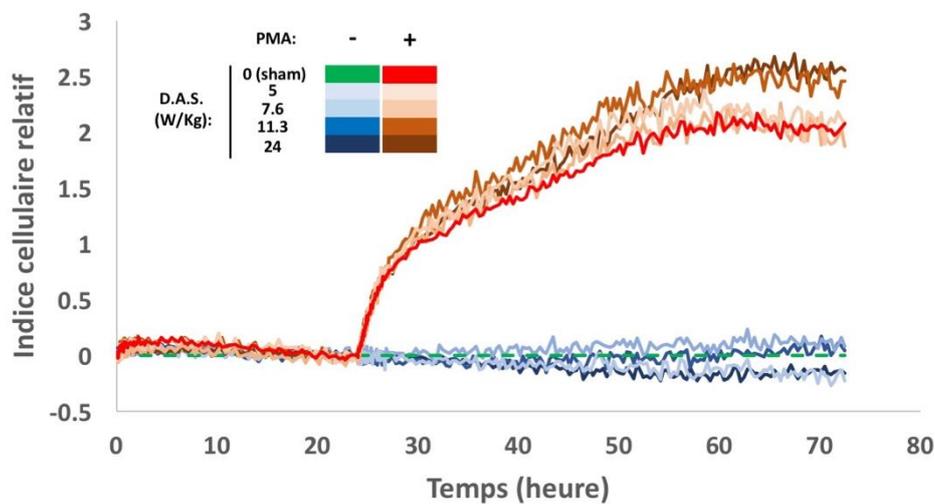


Figure 23 : Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules MCF7 exposées à un champ RF 1800 MHz dépourvu de modulation (signal CW), à différents D.A.S et co-exposées ou non en présence de 0,5 nM de PMA. A T_0 , 10.000 cellules MCF-7 ont été déposées au fond des puits et l'impédance est alors mesurée sur une durée allant jusqu'à 72 heures. Vingt-quatre heures après le début de l'expérience, les cellules MCF-7 sont activées en présence de PMA 0,5 nM. Seul l'indice cellulaire relatif est représenté qui permet une comparaison directe par rapport à la condition Sham non-activée.

8 Conclusions, perspectives et résultats préliminaires.

Dans cette dernière partie de ce manuscrit, il m'apparaît nécessaire de faire un rapide bilan de mon parcours scientifique, avant de me tourner vers l'avenir et d'exposer mes perspectives de recherches.

Au final, je serais passé dans cinq laboratoires différents en près de vingt ans de recherche depuis le début de mon D.E.A en Octobre 1997. Il n'échappera à personne que si ma situation professionnelle a évolué de manière linéaire, mon parcours scientifique a été plus sinueux.

Tel que je l'ai expliqué, il y avait une logique certaine dans ma volonté de rejoindre le laboratoire du Pr Bouvier à Montréal suite à mes travaux de thèse sur l'entrée du VIH-1. Cependant, à l'issue de mon stage post-doctoral, j'ai dû changer une première fois de thématique scientifique pour étudier les corps nucléaires PML durant ma première affectation en tant que chargé de recherche au CNRS. Puis j'ai changé une deuxième fois de thématique scientifique pour me concentrer sur les effets biologiques des champs électromagnétique.

Les différentes thématiques scientifiques que j'ai abordées m'ont conduit à maîtriser de nombreuses techniques de biochimie et de biologie moléculaire. Bien sûr, il ressort clairement que la maîtrise et le développement de la technique du BRET apparaît, depuis mon post-doc, comme un pilier de mon activité scientifique. Depuis mon arrivée à l'IMS je me suis concentré sur la mise en œuvre de systèmes d'analyse « temps-réel / cellules vivantes » en boucle fermée ou ouverte. Certaines de ces approches ne sont pas exposées dans ce manuscrit.

La première approche, exposée dans le chapitre 7.2.1, a consisté en la reproduction de résultats qui nous semblait solidement étayés dans la littérature : l'effet de champs EBF 50Hz sur la fonctionnalité des jonctions GAP. Il ne s'agit pas ici, à proprement parler d'une approche temps réel. À cette époque, n'ayant pas encore obtenu de contrat de recherche, j'essayais surtout « d'amorcer la pompe » en réalisant une première étude solide avec les moyens techniques disponibles dans mon institut de recherche. Bien qu'ayant été une réussite sur le plan technique, cette étude n'a pas permis de confirmer les résultats obtenus dans la littérature. La reproduction de résultats expérimentaux est un des piliers de la science moderne et la raison d'être de la publication scientifique. Nous avons cherché à nous mettre au plus près des conditions expérimentales décrites en particulier par l'équipe du laboratoire de bioélectromagnétisme de Hang Zhu, en Chine, qui a publié la plupart des résultats récent concernant l'effet du 50 Hz sur les jonctions GAP. A cette fin, Nous étions rentrés en contact avec ces chercheurs. Nous souhaitions discuter avec eux et utiliser leurs cellules mais nous avons dû essuyé une fin de non-recevoir... En absence de perspective et de financement, nous avons décidé d'arrêter ces recherches suite à la publication de nos travaux dans la revue *Bioelectromagnetics* (Percherancier et al., 2015). L'expertise technique acquise lors de ces

recherches sera mise à profit dans de futurs projets. Toujours est-il que ce sujet de recherche m'a permis de m'initier au bioélectromagnétisme en validant une première publication dans le domaine. Je tiens ici à souligner la collaboration avec le groupe NSYSA de l'Institut des sciences moléculaires (ISM), en particulier Stéphane Abault, Bertrand Goudeau et Neso Sojic, sans qui cette étude n'aurait jamais pu avoir été réalisée.

En 2013, l'Union Européenne a labellisé le projet GERONIMO dans le cadre du 7ème PCRD afin de répondre aux questions légitimes posées par le caractère ubiquitaire de l'exposition aux CEM dans notre environnement personnel et professionnel. Ce projet européen rassemble des laboratoires d'excellence sur le sujet, dont notre équipe, et intègre différentes approches (épidémiologie, évaluation de l'exposition, études biologiques in vivo et in vitro, évaluation du risque) en utilisant des méthodes innovantes qui permettront à terme : 1) de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux potentiels effets sur la santé des champs électromagnétiques, 2) de caractériser les niveaux d'exposition de la population aux RF, et 3) de faire avancer l'état des connaissances sur les RF et la santé des populations. Notre équipe, en la personne d'Isabelle Lagroye, est responsable du Workpackage 5 dédié à la recherche des effets des RF sur des modèles cellulaires au sein du programme GERONIMO. Notre participation au projet GERONiMO a été l'élément fondateur qui m'a permis de mettre en place les différentes approches techniques et technologiques présentées dans le chapitre 7 de ce manuscrit.

Grâce au projet GERONiMO, nous avons pu montrer à quel point le BRET peut-être une technique utile pour déterminer l'impact des CEM au niveau moléculaire, en particulier sur l'activité des protéines. Nous avons ainsi pu démontrer que l'exposition aux RF n'entraîne pas d'activation de TRPV1 autrement qu'en provoquant un échauffement diélectrique. Cette simple conclusion, qui récapitule plus de quatre années de recherche, peut paraître être une réponse évidente à la question initiale étant donné qu'il n'y avait (et qu'il n'y a toujours pas) de mécanisme connu qui pourrait expliquer un effet « non-thermique » des RF sur les canaux ioniques thermosenseurs. Toutefois, tel que discuté au chapitre 7.2.2, il reste de nombreuses pistes à explorer concernant l'impact des RF notamment sur l'activité des canaux sensibles au froid. Par ailleurs, les approches techniques développées ont permis d'ouvrir des perspectives de recherches fondamentales très intéressantes et offrent des opportunités intéressantes de partenariat avec des entreprises privées.

Toujours grâce au projet GERONiMO ainsi qu'à l'ANSES, nous avons concrétisé notre projet concernant l'utilisation de l'impédancemétrie pour tester l'effet des CEM sans a-priori sur un mécanisme particulier. Les résultats présentés dans ce manuscrit ne constituent qu'une première étude mais montrent à quel point cette approche est puissante et permet d'analyser une multitude de conditions expérimentales en temps réel, sur cellules vivantes et en simultané au cours de l'exposition aux CEM.

Mon projet de recherche pour les années à venir s'articule autour de trois grands axes :

- la poursuite de mes recherches en bioélectromagnétisme, à l'aide des approches temps réel / cellules vivantes décrites dans ce manuscrit.

- l'approfondissement, à l'aide des sondes BRET, développées dans le cadre du programme GERoNiMO, de la pharmacologie et de la biologie moléculaire des canaux (projet CANALBRET).

- le développement d'une recherche appliquée, en partenariat avec des entreprises privées, pour développer un appareillage permettant la mesure à haut débit de signaux de BRET multiplexés (projet BRET BOW).

Ces trois activités ne sont évidemment pas mutuellement exclusives et pourront au contraire être combinées pour une analyse plus fine des phénomènes étudiés.

8.1 Recherches en bioélectromagnétisme.

Les recherches que je mène dans le cadre du programme européen GERoNiMO sont loin d'être terminées et devraient occuper une grande partie de mon temps durant les deux années à venir. Pour honorer nos engagements au sein du programme GERoNiMO, je prévois:

- L'utilisation de nouvelles sondes BRET pour étudier les effets des champs RF et IF sur l'activité d'autres protéines que les canaux TRP, impliquées dans la régulation du stress cellulaire ou dans des grandes voies de transduction du signal. Parallèlement au projet GERoNiMO, je souhaite également poursuivre, à l'aide du BRET, l'évaluation des effets des RF sur d'autres canaux TRP sensibles au froid ou à des températures physiologiques.

- L'utilisation de l'impédancemétrie et du dispositif XCellRF pour évaluer les effets des RF et des IF sur des cellules primaires. Par ailleurs, une fois le projet GERoNiMO terminé, je souhaite tirer profit de l'impédancemétrie pour tester les effets sur les cellules de champs électromagnétiques différents de ceux rencontrés dans notre environnement quotidien. Nous pourrions alors évaluer l'impact sur le comportement cellulaire de différentes formes de modulation, en particulier de signaux RF pulsés en train d'ondes émis à des niveaux supérieurs aux normes environnementales.

8.1.1 Le bioélectromagnétisme à la lumière du BRET

Les travaux développés dans ce manuscrit montrent combien le BRET peut être un outil puissant pour l'exploration des effets des CEM sur l'activité des protéines. Notre participation dans le programme GERoNiMO inclut l'analyse des effets des RF et des IF émis à des niveaux environnementaux sur les protéines HSF-1, PKC, RAS, ERK, et JNK. Tel qu'expliqué ci-dessus, je souhaite également en marge du projet GERoNiMO explorer plus à

fond les rôles d'autres canaux TRP à l'aide de sondes BRET construites sur le modèle de celles permettant la mesure de l'activité de TRPV1 et ciblant TRPV3, TRPV4, TRPM8 et TRPA1.

Les chapitres qui suivent justifient le choix de ces différentes cibles protéiques et exposent le principe des sondes BRET permettant la mesure de l'activité de ces protéines. Enfin, les résultats préliminaires déjà obtenus quant à la caractérisation pharmacologique de ces sondes, ainsi que les perspectives de recherche en bioélectromagnétisme.

8.1.1.1 Mesure de l'activité de HSF-1 sous exposition RF à l'aide du BRET

La protéine HSF1 (pour heat shock factor 1) est un facteur de transcription hautement conservé au cours de l'évolution, et qui est directement impliqué dans l'activation de la transcription lors de l'apparition de condition de stress cellulaire. Son nom tient au fait qu'initialement, il a été montré que la protéine HSF1 régule la voie de réponse aux chocs thermiques chez l'homme, en agissant comme le principal facteur de transcription des protéines de choc thermique (Heat shock protein en anglais, ou HSP) (Akerfelt et al., 2010; Vihervaara and Sistonen, 2014; Hentze et al., 2016; Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova, 2017), lesquelles jouent un rôle protecteur en veillant au bon repliement et à la distribution des protéines dans les cellules. Cependant, au cours de la dernière décennie, il a pu être montré que HSF-1 joue un rôle bien plus large que ce qu'il était initialement supposé, et transactive de nombreux gènes impliqués dans divers processus tels que la division cellulaire, le vieillissement ou encore le développement (Vihervaara and Sistonen, 2014). Certains auteurs suggèrent que HSF-1 agit comme un intégrateur du stress cellulaire au niveau de l'organisme (Akerfelt et al., 2010). Il est intéressant à ce titre de constater que l'activation de TRPV1, dont le rôle d'intégrateur du stress cellulaire dans le système nerveux central a été récemment discuté (Ho et al., 2012), entraîne l'activation de HSF1 (Bromberg et al., 2013).

Le rôle de HSF-1 dans la réponse potentielle aux champs électromagnétique n'a été abordé qu'indirectement en mesurant le niveau d'expression de certains gènes cibles de HSF1, en particulier les gènes codant pour les HSP. La grande majorité des études réalisées sur le sujet de recherche suggère que l'exposition RF à des niveaux environnementaux ne provoque pas de réponse au stress cellulaire caractérisée par une modification de l'expression des gènes HSP, que ce soit au niveau transcriptionnel ou traductionnel (McNamee and Chauhan, 2009). Seul, un petit nombre d'études existent, où les conditions d'exposition semblent bien contrôlées, qui montre un effet des RF sur l'expression des HSP (McNamee and Chauhan, 2009). Récemment, une étude a montré que l'exposition à des RF présentant une modulation W-CDMA pouvait entraîner une réponse au stress (augmentation de l'expression des HSP) dans le cortex et le cervelet de rats exposés 6h par jour durant 3 jours à un D.A.S. de 4W/Kg en corps entier. Toutefois, cette activation de l'expression des HSP a clairement été corrélée à

une augmentation de la température de 1.5 °C du corps des animaux. Aucune activation n'a pu être observée pour des durées d'exposition plus courtes ou pour des D.A.S. inférieurs qui n'entraînaient pas d'augmentation de température corporelle des rats (Ohtani et al., 2016). Pris ensemble ces résultats suggèrent que les RF n'entraînent pas d'activation de la voie HSP en dehors d'un effet thermique. Pour autant, l'activité de HSF1 n'a jamais été mesurée en temps réel sur cellule vivante et un effet transitoire ne peut pas être exclu, l'activation des gènes HSP par la protéine HSF-1 représentant une boucle de rétrocontrôle de l'activité de HSF-1. Nous avons alors cherché une stratégie moléculaire permettant la mesure de l'activité de HSF1 en temps réel sous exposition RF et sur cellules vivantes, à l'aide du BRET.

Dans des cellules non soumises à des conditions de stress, HSF1 existe principalement sous forme de monomère inactif. Seule la forme oligomérique de HSF1 est active transcriptionnellement (Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova, 2017). Dans sa forme monomérique, HSF1 est normalement décrit comme étant distribué dans le cytoplasme, mais nombre d'articles indique sa localisation nucléaire même dans des conditions de repos. L'activation de HSF1 est réprimée par l'interaction avec des protéines chaperones telles que les protéines de choc thermique comme notamment la protéine Hsp90 (Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova, 2017). L'interaction de HSF1 avec ces protéines chaperonnes entraîne le masquage des domaines HR-A/B impliqués dans l'oligomérisation de HSF1. En cas de stress protéotoxique, tel que le choc thermique, ces protéines chaperonnes libèrent HSF1 pour remplir leur fonction. HSF1 va alors se trimériser et s'accumuler dans le noyau pour stimuler la transcription de gènes cibles. Ce mode de régulation de l'activation de HSF1 indique que l'équilibre entre la forme monomérique et la forme oligomérique de HSF1 est susceptible de refléter le niveau d'activation de HSF1. Il devient alors évident de tenter de mesurer cet équilibre à l'aide d'un test de BRET intermoléculaire (Fig. 24). Dans ce test, un groupement donneur est fusionné à une extrémité d'un monomère de HSF1 alors qu'un groupement accepteur est fusionné à l'extrémité d'un autre monomère de HSF1, les deux protéines HSF1 ainsi modifiées étant co-exprimées dans la même cellule. A l'état de repos, dans l'hypothèse où l'ensemble des protéines HSF1 sont maintenues à l'état monomérique, les groupements donneurs et accepteurs étant séparés, il n'y a pas de possibilité de mesurer un transfert d'énergie. Dans des conditions de stress, suite à la trimérisation de HSF1, des oligomères regroupant des protéines HSF1 fusionnées à la fois à la Luc et à la YFP se formeraient et l'on pourrait mesurer un signal de transfert d'énergie entre ces groupements.

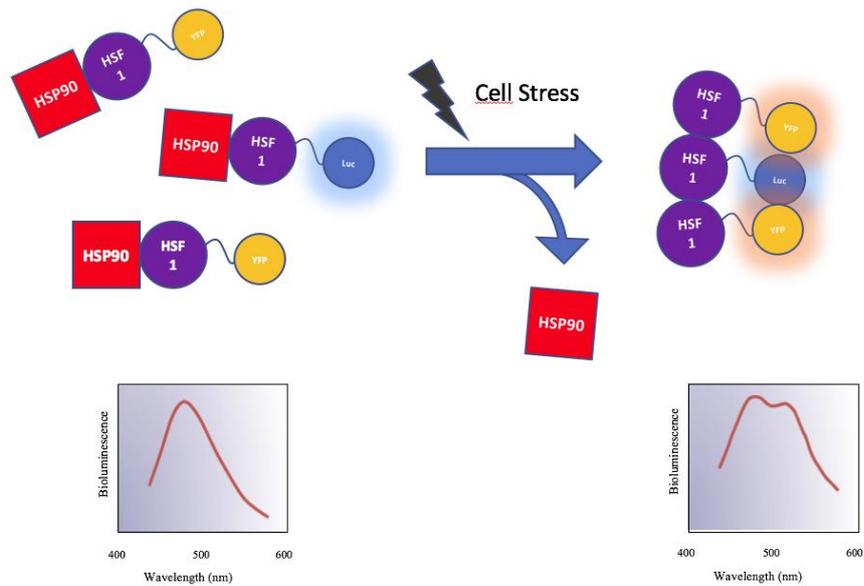


Figure 24 : Représentation schématique du test de BRET intermoléculaire permettant la mesure de la trimérisation de HSF1.

Nous avons réalisé la construction de différentes protéines HSF1 fusionnées soit en N-terminal, soit en C-terminal avec soit la Luc, soit la YFP. Après avoir transfecté les différents couples possibles au sein de cellules HEK293T, nous avons mimé un stress protéotoxique en présence de MG132, un puissant inhibiteur du protéasome, qui entraîne l'accumulation de protéines malformées au sein des cellules. Ceci est connu pour entraîner l'activation de HSF1 en induisant notamment l'activité de chaperonnes tel HSP90, qui maintiennent HSF1 sous forme monomérique, tel que mentionné précédemment. Dans ces conditions, nous avons pu mesurer une augmentation significative et reproductible du BRET de base mesuré avec le couple YFP-HSF1 / Luc-HSF1 (Fig. 25A). Il est à noter que seule cette orientation permet d'observer cette augmentation du niveau de BRET de base. Les autres orientations permettent une mesure d'un BRET de base mais aucune augmentation n'est mesurée après incubation des cellules en présence de MG132, indiquant qu'une orientation particulière des groupements donneur et accepteur d'énergie est requise. Nous avons également pu montrer que l'élévation de la température au-dessus de 37 °C entraîne aussi l'augmentation du BRET entre les protéines YFP-HSF1 et Luc-HSF1 (Fig. 25B). Ces observations, très prometteuses, demandent cependant à être approfondies pour parfaitement vérifier que ce test de BRET intermoléculaire reflète bien l'activation spécifique de HSF1. En absence d'inhibiteur connu de la trimérisation de HSF1, plusieurs solutions permettraient conjointement de valider ce test :

- Premièrement, le test pourrait être reproduit en présence de mutants ponctuels de HSF1 incapables de s'oligomériser.

- Deuxièmement, certains types de stress comme le stress du réticulum sont connus pour ne pas entraîner l'activation de HSF1. Suite à l'application d'un tel stress, nous ne devrions donc pas observer d'augmentation du BRET dans des cellules soumises à ce type de stress. Ces deux expériences de pensée restent à tester expérimentalement.

- Une troisième possibilité pour vérifier que notre test reflète effectivement l'état d'activation de HSF1 consiste à utiliser une drogue, tel le KRIBB11, connue pour empêcher HSF1 de se lier à l'ADN (Yoon et al., 2011). Dans ce cas, on attend que la forme activée de HSF1 s'accumule dans le noyau de cellules incubées en présence de cette drogue, ce qui devrait entraîner une augmentation maximale du niveau de BRET mesuré dans ces cellules. Nous avons pu vérifier expérimentalement cette prédiction lors d'expériences préliminaires (Fig. 25A).

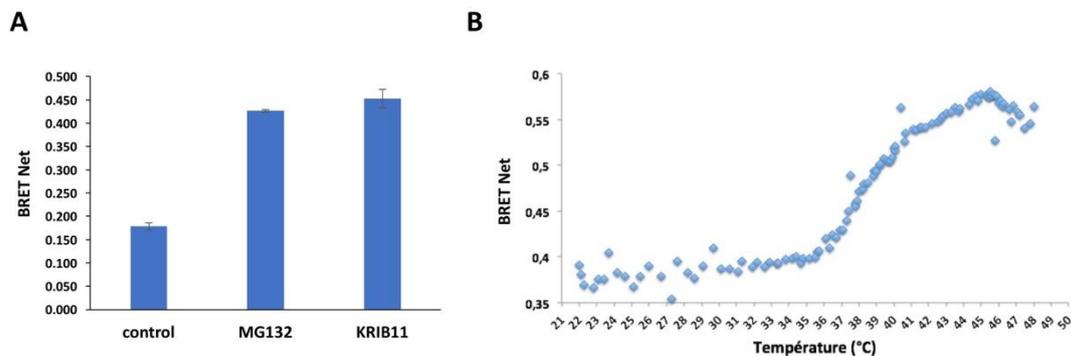


Figure 25 : Mesure du BRET dans des cellules HEK293T exprimant la sonde YFP-HSF1 / Luc-HSF1 de manière transitoire. A) le BRET est mesuré avant et après 12 h d'incubation avec soit 5 μ M de MG132, soit 5 μ M de KRIBB11 (n=2). B) Sensibilité du test à l'élévation de la température. Les expériences en A) et en B) n'ayant pas été réalisées sur le même appareil, les valeurs absolues du BRET de base sont différentes.

Nous poursuivons nos efforts pour parfaire la caractérisation de ce test de BRET intermoléculaire avec de bons espoirs de succès. Dans cette hypothèse, ce test pourra servir non pas seulement dans une perspective d'évaluation des effets des CEM au niveau moléculaire mais être également d'utilité pour explorer, au niveau, fondamentale la biochimie de HSF1. Ce test pourrait également constituer un test de criblage d'inhibiteurs de HSF1 dont l'accumulation sous sa forme active représente un pronostic faible dans nombre de cancers.

8.1.1.1.1 Mesure de l'activité des kinases PKC, ERK, RAS et JNK sous exposition RF à l'aide du BRET

Au cours des vingt dernières années, il est apparu que la tumorigénèse nécessite la dérégulation conjointe de plusieurs processus cellulaires et que les cellules cancéreuses doivent acquérir les capacités suivantes: indépendance aux signaux de prolifération, éviction de l'apoptose, insensibilité aux signaux inhibant la croissance, posséder un potentiel de réplication illimité, être en capacité d'envahir et de métastaser, et être capable d'attirer et de maintenir l'angiogenèse pour l'apport en nutriments (Hanahan and Weinberg, 2000). À cela, on peut ajouter l'acquisition d'une résistance aux médicaments et l'évitement de la sénescence induite par les oncogène (Hanahan and Weinberg, 2011). Les anomalies de la signalisation MAPK affectent la plupart, sinon l'ensemble, de ces processus et jouent, de fait, un rôle critique dans le développement et la progression du cancer (Dhillon et al., 2007).

Dans le cadre du projet GERoNiMO, nous avons voulu déterminer, à l'aide de sondes moléculaires, si l'exposition aux RF était susceptible de modifier l'activité de trois types de MAP kinases très souvent retrouvées mutées ou dérégulées dans les cancers : les kinases ERK, JNK et RAS.

Plusieurs sondes moléculaires basées sur la technique du FRET étaient déjà caractérisées dans la littérature et permettaient la mesure de l'activité de ces kinases (Mochizuki et al., 2001; Violin et al., 2003; Harvey et al., 2008; Fosbrink et al., 2010; Komatsu et al., 2011). Parmi ces différentes sondes, celles réalisées par le groupe du Pr Matsuda à l'université de Kyoto au Japon nous sont apparues particulièrement intéressantes (Komatsu et al., 2011).

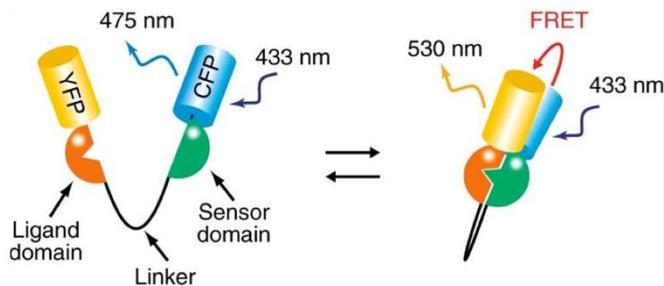
À partir de 1998, le groupe du Pr Matsuda a commencé à développer des sondes moléculaires pour analyser la signalisation intracellulaire au niveau spatio-temporel. Le but de ces chercheurs était en particulier de développer des sondes pour les kinases et les protéines G, deux familles d'acteurs clefs dans la transduction du signal. Ils nommèrent leur projet “**Phosphorylation and Guanine-nucleotide Exchange Monitoring Project (PHOGEMON Project)**”⁷. Leurs sondes sont toutes basées sur un même principe : un domaine senseur et un domaine de liaison, tous deux spécifiques de la kinase ciblée, sont connectés par une séquence de liaison flexible (linker) et le tout est pris en sandwich entre deux protéines fluorescentes compatibles qui jouent le rôle de donneur et d'accepteur d'énergie (Fig. 26A). En présence d'un signal activateur, la conformation du domaine senseur est modifiée, permettant l'interaction avec le domaine de liaison. Ceci conduit à un changement dans la structure

⁷ <http://www.fret.lif.kyoto-u.ac.jp/e-phogemon/phomane.htm>

tridimensionnelle de la sonde moléculaire entraînant une modification de l'efficacité du transfert d'énergie entre le groupe donneur et l'accepteur d'énergie.

L'exemple de la sonde EKAR (extracellular signal- regulated kinase activity reporter), mesurant l'activité des kinases ERK dans les cellules, illustre parfaitement la structure et le fonctionnement général de ces sondes (Harvey et al., 2008). Ainsi, la sonde EKAR est constituée d'une part d'une séquence peptidique de phosphorylation cible de la kinase ERK, issue de la protéine Cdc25C, et qui contient la séquence consensus PRTP cible des MAPK et d'autre part d'un domaine de liaison aux résidus phosphorylés (Fig. 26B). Les deux parties sont séparées par une séquence flexible de liaison. La spécificité de la signalisation par les MAPK étant assurée par des motifs d'accrochage spécifiques, une séquence FQFP qui assure la spécificité d'interaction des kinases ERK a été placée de manière adjacente à la séquence cible de la phosphorylation. L'ensemble est pris en sandwich entre les groupements fluorescents donneurs et accepteurs d'énergie. L'activation des protéines ERK conduit à la phosphorylation de la séquence substrat de la sonde et à la fixation subséquente du domaine de liaison aux résidus phosphorylés. Il résulte un rapprochement des groupements donneurs et accepteurs d'énergie et une augmentation du signal de FRET.

A



B

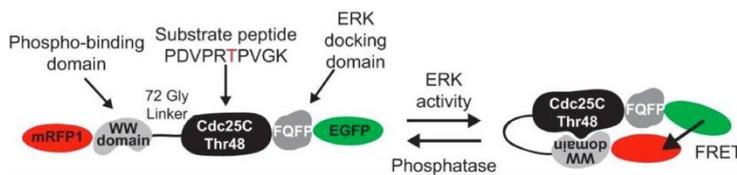


Figure 26 : Organisation

schématique de la structure des sondes FRET mesurant l'activité des kinases. A) Principe général du repliement de ces sondes (Komatsu et al., 2011). B) exemple d'application à la sonde EKAR mesurant l'activité de la kinase ERK (figure issue de (Harvey et al., 2008))

En 2011, les chercheurs du projet PHOGEMON firent une avancée considérable en établissant une stratégie moléculaire permettant de rendre leurs sondes FRET indépendantes de l'orientation relative du donneur et de l'accepteur, et de fait, uniquement dépendantes de la distance séparant les deux groupements en optimisant la longueur du domaine de liaison séparant le domaine senseur du domaine de liaison (Komatsu et al., 2011). En utilisant un linker de 116 résidus a.a, il fut possible de réduire le signal de base et d'améliorer l'amplitude

du signal d'activation. En utilisant ce linker optimisé et en sélectionnant des séquences adéquates pour les domaines de liaison et des séquences substrats, il devint possible de créer diverses sondes extrêmement sensibles permettant la mesure en temps réel et sur cellule vivante de plusieurs kinases dont notamment les kinases JNK, RAS et donc ERK.

Les dernières versions de ces sondes ayant été réalisées avec le couple CFP/YFP comme protéines donneuse et acceptrice d'énergie, il devenait évident de dériver ces sondes FRET en sondes BRET en remplaçant la séquence cDNA de la CFP par celle de la luciférase rLuc8 (Fig. 27)

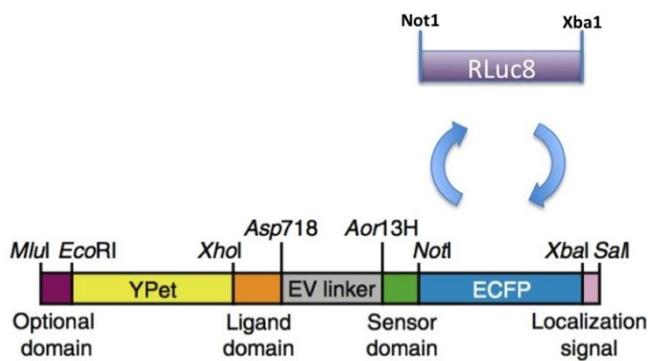


Figure 27 : Stratégie de clonage permettant le remplacement de la CFP par la rLUC8 dans la séquence cDNA codant les biosenseurs issus du projet PHOGEMON.

Nous avons déjà pu construire et tester ces nouvelles sondes BRET qui présentent une grande sensibilité à une activation par exemple par le PMA, entraînant l'activation des kinases ERK et RAS, tel que présenté dans la fig. 28 :

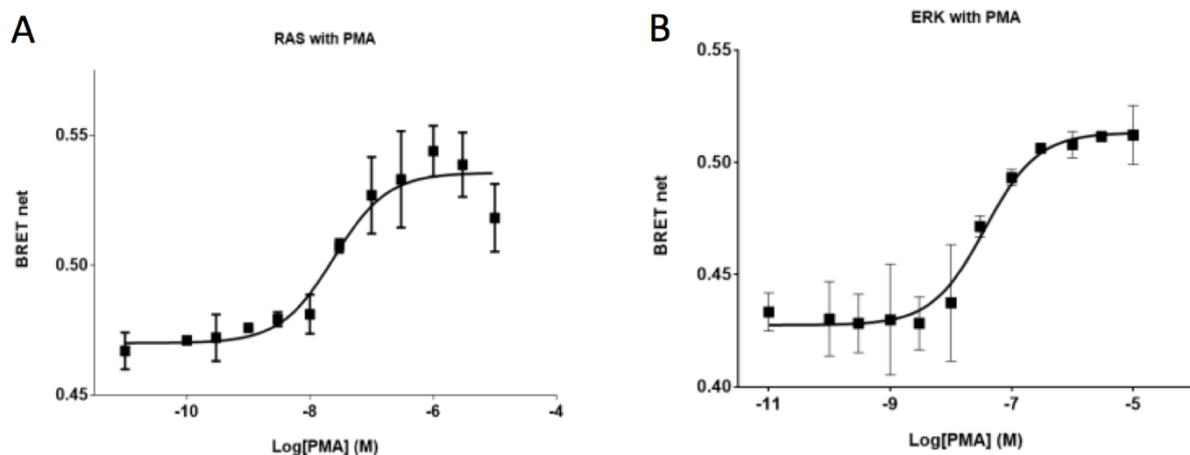


Figure 28: Courbe dose-réponse de l'activation par le PMA des sondes BRET mesurant l'activité des kinases RAS (A) et ERK (B) dans des cellules HuH7.

Grâce aux sondes BRET permettant la mesure de l'activité des kinases ERK, RAS et JNK, nous projetons dans un avenir proche de tester l'effet des CEM sur ces sondes. Nous utiliserons pour cela le système d'exposition déjà mis en place pour l'analyse de l'activité du canal TRPV1 sous exposition radiofréquence. Nous chercherons en particulier à déterminer si

l'exposition aux CEM est capable de modifier la puissance ou l'efficacité de l'activation de ces sondes par des produits chimiques tel que le PMA (pour les kinases ERK et RAS) ou l'Anisomycine (pour la kinase JNK). Nous réaliserons des courbes doses-réponses sur des cellules exposées durant 24h dans des plaques 96 puits placées dans les cellules TEM (Fig. 29). L'équipe de Philippe Lévêque a déjà réalisé les simulations numériques permettant de calculer le niveau de D.A.S. dans le plan des cellules. Il apparaît que l'exposition reste relativement homogène entre les puits avec une valeur moyenne de l'exposition et une variation de plus ou moins 30% entre les puits, ce qui reste acceptable.

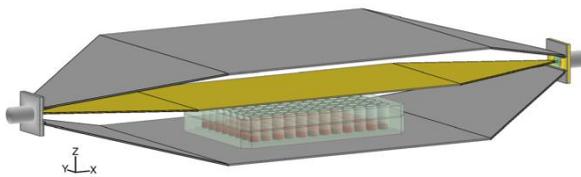


Figure 29 : Représentation d'une plaque 96 puits placée dans la plaque TEM, en vue de son exposition aux CEM.

8.1.1.2 Mesure de l'activité d'autres canaux thermo-TRP sous exposition RF à l'aide du BRET

Tel que discuté dans notre article sur les effets des RF sur TRPV1, au chapitre 7.2.2, il nous paraît important de continuer notre exploration des effets potentiels des RF sur des canaux thermo-TRP sensibles à d'autres gammes de température. Nous projetons de réaliser ce type d'étude sur les canaux TRPA1 et TRPM8, sensibles au froid, ainsi que sur les canaux TRPV3 et TRPV4 qui sont activés à des températures ambiantes. Nous avons déjà réalisé plusieurs sondes intra et intermoléculaires capables de mesurer l'activité de TRPV3 et TRPV4. Sachant que TRPA1 et TRPM8 peuvent également entrer en interaction avec la CaM, nous construirons différentes sondes intra- et intermoléculaires similaires à celles réalisées pour TRPV1, que nous caractériserons tant dans le mode d'activation chimique que dans le mode d'activation thermique.

8.1.2 L'impédancemétrie comme outil d'exploration des paramètres des CEM entraînant un effet biologique.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis d'établir que l'impédancemétrie est une technique puissante permettant l'exploration des effets des champs sur cellules vivantes. La puissance de cette technique tient dans le grand nombre de conditions expérimentales qui peuvent être testées en parallèle, et dans la nature même de la réponse enregistrée qui permet d'observer une réponse phénotypique des cellules en temps réel sous exposition aux CEM et sans à priori sur un mécanisme moléculaire particulier.

A l'issue des expériences décrites dans le chapitre 7.2.3, il apparaît que les champs RF émis à des niveaux largement supérieurs aux normes en vigueur ne sont pas susceptibles de modifier le comportement des lignées cellulaires SH-SY5Y et MCF-7, ni leurs réponses à des

activateurs chimiques. Cette première étude réalisée, il nous paraît cependant primordial de réaliser une étude similaire mais sur des cellules primaires. Dans le cadre du programme GERoNiMO, nous prévoyons de tester l'effet des RF environnementaux sur le comportement d'astrocytes et de cellules souches prélevés chez le rat.

Avec ces études, nous espérons que nous aurons démontré que l'impédancemétrie est un outil d'intérêt pour la communauté scientifique travaillant sur le bioélectromagnétisme. Nous souhaitons ensuite tirer profit de cet outil original pour "sortir" de la thématique des champs environnementaux et explorer des paramètres des CEM qui induisent des effets biologiques, notamment dans un but thérapeutique.

Les recherches les plus abouties en bioélectromagnétisme concernent l'utilisation de champs électriques pulsés très intenses (Pulsed Electric Fields en anglais, PEF) comme thérapie anticancéreuse (Breton and Mir, 2012). Lorsqu'une cellule est exposée à un champ électrique suffisamment intense, son potentiel trans-membrane augmente, ce qui conduit à des réarrangements structuraux de sa membrane plasmique, voire de ses organites. La thérapie par champ électrique pulsé est une procédure utilisant des impulsions électriques intenses mais courtes, qui provoquent en fonction de leur durée et de leur intensité, soit une perméabilisation réversible ou irréversible des cellules exposées, soit une déstabilisation des membranes et des composants intracellulaires. Les impulsions typiques utilisées vont d'une dizaine de microsecondes avec des amplitudes de quelques kilovolts par centimètre, à des impulsions de quelques nanosecondes, voir même picosecondes, mais nécessitant des champs de plusieurs dizaines de kilovolts par centimètre. Il est très important de souligner que ces différentes techniques n'entraînent aucun effet thermique.

Parmi ces différentes techniques, l'électrochimiothérapie, développée initialement par Lluís Mir (Mir et al., 1991) est une technique sûre, facile et efficace pour le traitement des tumeurs solides qui utilise des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde ou de la centaine de microsecondes pour perméabiliser de manière transitoire des cellules cancéreuses et améliorer l'activité de médicaments anticancéreux non perméables comme la bléomycine. Cette thérapie donne d'excellents résultats et est déjà remboursée dans de nombreux pays d'Europe. Récemment, notamment du fait des progrès réalisés dans les appareillages délivrant les champs électriques pulsés, l'application de pulses nanoseconde est apparue comme une méthode alternative à l'électrochimiothérapie. La thérapie par pulse nanoseconde n'utilise pas de drogues tout en permettant l'inhibition de la croissance tumorale. De manière très intéressante, les pulses nanosecondes peuvent cibler les organites intracellulaires.

Dans tous les cas, il est nécessaire d'appliquer les champs électriques pulsés à l'aide d'électrodes. Ceci peut ne pas être un problème majeur pour les tumeurs solides qui ne sont pas trop profondément enfouies comme les mélanomes ou les tumeurs du sein. Toutefois, le traitement peut être fortement invasif dans le cas de cancers touchant des organes internes.

Une solution consisterait donc à délivrer de manière radiative des champs électromagnétiques entraînant les mêmes effets que les champs électriques pulsés. Il est clair que la réduction de la longueur des impulsions en dessous de la nanoseconde ouvre la porte à l'utilisation d'antennes à large bande, qui pourront se substituer aux électrodes de contact, pour délivrer de manière propagative les champs électromagnétiques dans un tissu avec une résolution spatiale dans la gamme des centimètres, et permettre théoriquement un traitement non invasif de lésions profondes (Joshi and Schoenbach, 2010). Toutefois, le développement de ces antennes représente un véritable défi technologique (Arockiasamy and Mohan, 2016).

Une autre solution consiste à utiliser des trains d'onde radiofréquence (Fig. 30) de forte intensité pour produire la perméabilisation des cellules. Ces signaux s'apparentent à des signaux RADAR, faciles à générer, et qui permettraient une grande focalisation de l'énergie au niveau de la tumeur à l'aide d'antennes plus classiques. Cette solution n'a que très peu été envisagée dans la littérature et demande donc une preuve de principe. Nous proposons donc de réaliser cette preuve de principe de l'effet biologique de trains d'ondes RF de forte intensité en tirant profit de l'appareil XCellRF. La mesure de l'impédance nous permettra très rapidement de déterminer si les cellules présentent une réponse biologique à ces signaux. Si nous trouvons des effets, nous pourrions caractériser et optimiser les propriétés des trains d'onde à appliquer pour produire un effet biologique maximal (fréquence de la porteuse, taux de remplissage, intensité, durée du pulse etc.).

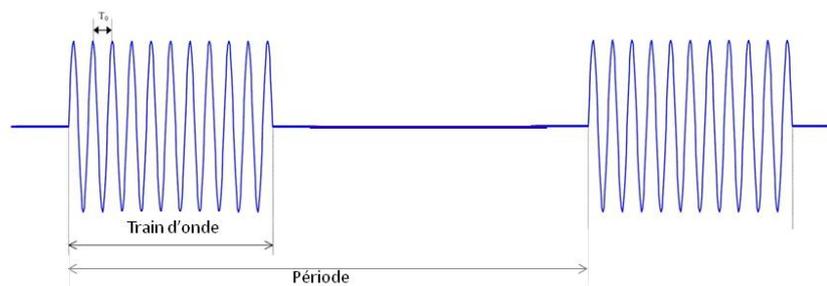


Figure 30 : Représentation d'un signal composé de trains d'ondes. T_0 représente la période de la porteuse. La période du train d'onde représente la durée pendant laquelle l'onde est émise plus le temps qui sépare deux trains d'onde successifs.

En ce sens, nous allons utiliser l'appareil XCellRF pour accélérer le balayage des paramètres utiles de ces trains d'onde RF, ce qui permettra ensuite d'appliquer ces signaux de manière propagative à l'aide d'antennes.

8.2 Les projets CanalBRET et BRET BOW.

Les recherches que nous avons menées pour déterminer les effets des RF sur les canaux TRP nous ont conduit à mettre en place des outils novateurs, le BRET spectral et les sondes

BRET permettant la mesure de l'activité des canaux. Ces différents outils ont fait l'objet de dépôt de brevets internationaux par la SATT Aquitaine et sont décrits dans l'article que nous avons récemment publié dans *Biophysical Journal* (Ruigrok et al., 2017), chapitre 7.2.2.3). Les applications de ces outils dépassent largement le contexte du bioélectromagnétisme et sont susceptibles d'intéresser le monde du privé pour des besoins applicatifs, tout comme la recherche publique pour une recherche fondamentale. Je détaille ci-dessous les axes de recherche que je souhaite développer en lien avec ces outils.

8.2.1 Le projet CanalBRET

Ce projet vise à une meilleure caractérisation de la pharmacologie, des mécanismes d'ouvertures et de la régulation des canaux ioniques à l'aide de la technique du BRET. Ayant fait la preuve de l'utilité des sondes BRET pour l'étude de l'activation des canaux TRPV1/3 et 4, nous souhaitons étendre le champ d'investigation de nos sondes à d'autres canaux. À ce jour, nous envisageons de réaliser des sondes BRET qui permettront d'étudier les canaux TRPA1 et TRPM8, tel qu'énoncé en chapitre 7.2.2. Outre leur intérêt en bioélectromagnétisme, les canaux TRPA1 et TRPM8 représentent des cibles pharmacologiques d'intérêt étant donné leur rôle émergent dans de nombreux processus ou désordres physiologiques comme l'inflammation, la douleur ou encore le cancer. Nous souhaitons nous intéresser également aux canaux PIEZO dont le rôle mécanosenseur vient d'être découvert récemment (Honoré et al., 2015). La mise au point de sondes BRET permettant l'étude de ces canaux se fera en collaboration avec l'équipe de Pierre Vacher, à l'institut Bergonié, qui souhaite explorer le rôle de ces canaux dans les phénomènes de métastase. Nous sommes également en discussion avec des partenaires privés qui souhaiteraient potentiellement utiliser nos sondes BRET pour réaliser des tests de criblage à haut débit. Dans le cadre d'un accompagnement par la SATT Aquitaine, et en discussion avec ces partenaires privés, nous déterminerons dans un premier temps une liste de quelques canaux d'intérêt, pour lesquels nous réaliserons puis caractériserons des sondes BRET qui pourront ensuite être utilisées pour des activités de criblage.

De nombreuses études ont pu montrer que les canaux ioniques sont intégrés dans des complexes multi-protéiques, dont les interactions probablement dynamiques sont susceptibles de réguler l'activité des canaux (Stoilova-McPhie et al., 2013; Rouwette et al., 2015). L'identification et la caractérisation de partenaires d'interaction est donc susceptible de fournir une mine d'information sur de nombreux aspects de la biologie des canaux ioniques et pourrait être d'une importance capitale pour l'identification de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques (Stoilova-McPhie et al., 2013; Rouwette et al., 2015). La base de données TRIP (pour **T**Ransient receptor potential **I**nteracting **P**rotein)⁸, qui recense les différentes

⁸ <http://www.trpchannel.org/proteins/show?id=TRPV1>

interactions protéines mises en évidence avec les canaux TRP, s'est énormément enrichie au cours des dernières années. Pour autant, étant donné la difficulté de purification et de manipulation des protéines membranaires, la plupart des techniques utilisées pour mettre à jour ces interactions sont des méthodes préparatives qui ne permettent pas d'obtenir une analyse dynamique des interactions mises à jour. Dans cette optique, nous souhaitons réaliser un crible des interactions protéines-protéines sur cellule vivante à l'aide du BRET en prenant le canal TRPV1 comme modèle d'étude. À l'aide d'une banque de cDNA couplée à la YFP, réalisée par le Pr Jérémie Simpson à l'université de Dublin, et en utilisant un RCPG couplé à la Luciférase comme appât, nous avons déjà réalisé un crible à moyen débit des interactions protéines-protéines qui a conduit à la découverte de l'interaction de certains RCPGs avec la protéine CNIH4 (human cornichon homologue 4), et à la mise en évidence du rôle de cette protéine dans les étapes de maturation et d'adressage à la membrane des RCPGs (Sauvageau et al., 2014). Ce test peut s'apparenter à la méthode du double hybride, mais sur cellule de mammifère. Sur le modèle de notre étude, et en collaboration avec le Pr Simpson qui a considérablement enrichi sa banque, nous espérons mettre à jour des interactions du canal TRPV1 avec de nouveaux partenaires. Si de nouveaux partenaires d'interactions étaient découverts, nous pourrions alors réaliser l'étude de leurs fonctions également à l'aide du BRET et de techniques conventionnelles comme le patch-clamp et la mesure de calcium intracellulaire.

Par ailleurs, sur le modèle de ce que nous avons réalisé avec la CaM, nous souhaitons étudier la dynamique des interactions de TRPV1 avec d'autres partenaires déjà caractérisés tel que AKAP 79, la cavéoline, la PKC et la PKA... La mise au point de nouveaux tests de BRET intermoléculaire permettra l'étude multiplexée de la dynamique des interactions de TRPV1 avec ses partenaires lors de son activation (dans les différents modes), ceci grâce au BRET spectral.

8.2.2 Le projet BRET BOW

En tirant profit de l'environnement extrêmement propice à l'émergence de projets interdisciplinaires qu'offre le laboratoire IMS, nous souhaitons développer un prototype d'appareillage qui permettra à terme l'acquisition et l'analyse de 12 à 96 signaux de BRET spectraux en simultané. Un tel appareil permettra de réaliser le criblage de composés chimiques avec un rendement bien supérieur à ce qui existe aujourd'hui.

Tel que présenté dans le chapitre 7.2.2.2, avec nos confrères du groupe Nano-Système analytique (NSysA), à l'institut des sciences moléculaires (UMR 5255), nous avons développé une méthode d'acquisition déportée du signal de BRET grâce à une fibre optique reliée à un spectromètre ultrasensible (Spectra pro 2300i, Acton, disponible au NSysA), qui rend possible l'analyse spectrale de plusieurs sondes BRET au sein d'un seul puits de lecture. Ce type d'analyse spectrale appliqué sur plusieurs fibres optiques en simultanément (Fig. 31) démultiplierait la puissance d'analyse du BRET et offrirait des retombées commerciales évidentes, tant au niveau des appareillages mis en place qu'au niveau des analyses pharmacologiques qui deviendraient possibles. Ce projet, nommé BRET BOW, réunira diverses compétences présentes à l'IMS en biologie, en électronique, en analyse du signal et en automatique. Le projet BRET BOW est suivi par la SATT Aquitaine et nous sommes en contact étroit avec des partenaires industriels régionaux et nationaux qui souhaiterait utiliser cette technologie pour leurs activités.

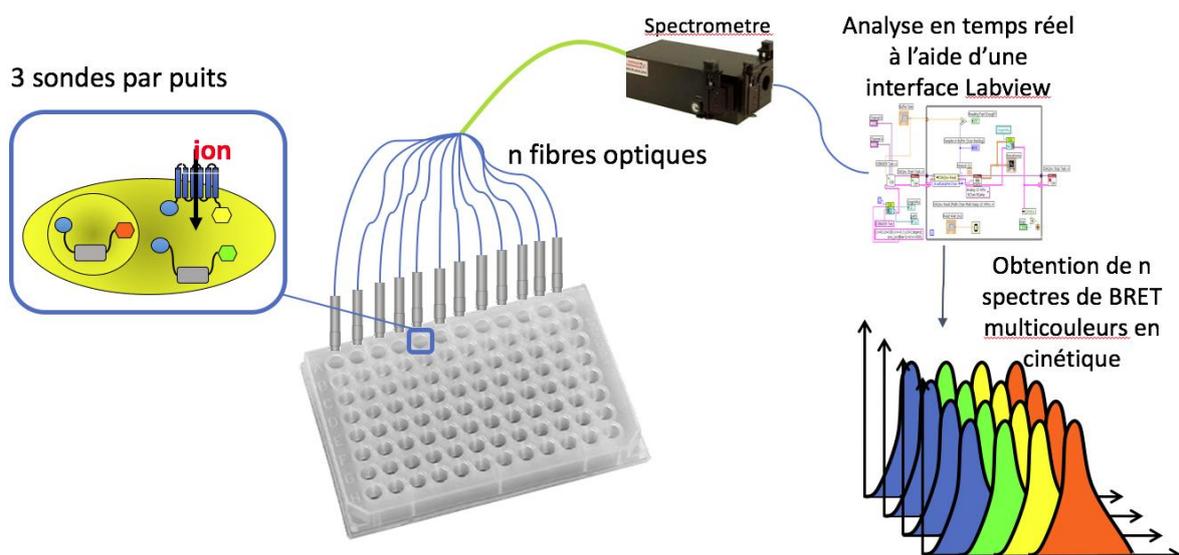


Figure 31 : Représentation schématique d'un appareillage permettant l'acquisition et l'analyse simultanée de 12 signaux de BRET multiplexés. Dans chaque puits les cellules sont transfectées avec trois sondes BRET possédant des couleurs différentes.

Plusieurs défis restent à relever cependant. La démultiplication du nombre de fibres optiques entraîne une diminution du signal par fibre et demande donc d'utiliser un spectromètre extrêmement sensible pour ne pas rallonger le temps d'intégration au-delà de la seconde (une seconde étant un temps d'acquisition acceptable pour la très grande majorité des tests de crible). Il va sans dire que la réussite d'un tel projet tient à un bon équilibre entre le coût de l'appareillage, le coût de son développement et la taille du marché. Toujours avec l'aide de la SATT Aquitaine, nous sommes en discussion avec différentes entreprises pour

réaliser un partenariat visant à la mise au point de ce dispositif de lecture multipuits des signaux de BRET multiplexés. Nous espérons intéresser suffisamment ces acteurs privés pour déposer avec eux une ANR PRCI lors du prochain appel d'offre en octobre 2017.

8.3 Encadrement d'étudiant(e)s

Depuis mon entrée en thèse, j'ai toujours encadré « à la paillassse » des étudiants qui venaient en stage dans les laboratoires où je réalisais mes recherches. Depuis mon entrée à l'IMS, j'ai eu le bonheur d'encadrer trois étudiant(e)s en M2. Il s'agit de Jennifer Beauvarlais, Lorenza Patrignoni et Hermanus Ruigrok. Ce dernier réalise actuellement son doctorat sous ma direction scientifique, l'université de Bordeaux 2 m'ayant attribué une autorisation à diriger une thèse (ADT).

Durant leurs stages, ces trois étudiant(e)s ont réalisé un travail formidable et de très grande qualité. En particulier, durant son stage Lorenza Patrignoni aura construit et caractérisé toutes les sondes BRET ciblant les kinases qui serviront dans le projet exposé au chapitre 8.1.1.2. Pour sa part, Jennifer Beauvarlet a exploré un axe de recherche sur l'interaction du récepteur au FAS ligand avec ces effecteurs dont la protéine FADD, dans le cadre d'une collaboration avec Pierre Vacher, chercheur à l'institut Bergonié à Bordeaux (avec qui j'avais co-encadré Jennifer Beauvarlet). Enfin l'ensemble des résultats exposés sur TRPV1 et l'impédancemétrie est également le fruit du travail de Hermanus Ruigrok au cours de son master 2 et de sa thèse. Il est évident que le travail réalisé avec Mr Ruigrok est absolument fondateur pour mes projets à venir.

Je finirais donc ce manuscrit sur une réflexion du Pr Michel Bouvier, chez qui j'ai effectué mon post-doctorat, et qui n'avait de cesse de dire que la qualité et le nombre des étudiants (master, thésard, post-doctorant) encadrés par une équipe était un excellent indicateur de la dynamique de cette équipe. Etant acquis qu'il ne peut y avoir de recherche de qualité sans étudiants, la transmission du savoir est de fait l'un des fondements de notre activité de recherche et représente pour moi une source intarissable de satisfaction.

9 Bibliographie

Ablan, S., Rawat, S.S., Viard, M., Wang, J.M., Puri, A., and Blumenthal, R. (2006). The role of cholesterol and sphingolipids in chemokine receptor function and HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Virology* 3, 104.

Ahlbom, A., Day, N., Feychting, M., Roman, E., Skinner, J., Dockerty, J., Linet, M., McBride, M., Michaelis, J., et al. (2000). A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* 83, 692-98.

Akao, Y., Nakagawa, Y., and Akiyama, K. (1999). Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro. *FEBS Lett* 455, 59-62.

Akerfelt, M., Morimoto, R.I., and Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 545-555.

Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairt, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3684-89.

Armando, S., Quoyer, J., Lukashova, V., Maiga, A., Percherancier, Y., Heveker, N., Pin, J.P., Prézeau, L., and Bouvier, M. (2014). The chemokine CXCR4 and CXCR2 receptors form homo- and heterooligomers that can engage their signaling G-protein effectors and β arrestin. *FASEB J* 28, 4509-523.

Arockiasamy, P., and Mohan, S. (2016). Design of compact electromagnetic impulse radiating antenna for melanoma treatment. *Electromagn Biol Med* 35, 134-142.

Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Islami, F., Galichet, L., et al. (2011). Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol* 12, 624-26.

Baek, S.H. (2006). A novel link between SUMO modification and cancer metastasis. *Cell Cycle* 5, 1492-95.

Bertrand, L., Parent, S., Caron, M., Legault, M., Joly, E., Angers, S., Bouvier, M., Brown, M., Houle, B., and Ménard, L. (2002). The bret2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 22, 533-541.

Bobé, P., and Chelbi-Alix, M.K. (2008). De nouvelles perspectives thérapeutiques pour l'arsenic-De la leucémie aiguë promyélocytaire aux maladies auto-immunes. *médecine/sciences* 24, 967-971.

Bossis, G., and Melchior, F. (2006). SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* 1, 13.

Breton, M., and Mir, L.M. (2012). Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments. *Bioelectromagnetics* 33, 106-123.

Bromberg, Z., Goloubinoff, P., Saidi, Y., and Weiss, Y.G. (2013). The membrane-associated transient receptor potential vanilloid channel is the central heat shock receptor controlling the cellular heat shock response in epithelial cells. *PLoS One* 8, e57149.

Cao, X., Ma, L., Yang, F., Wang, K., and Zheng, J. (2014). Divalent cations potentiate TRPV1 channel by lowering the heat activation threshold. *J Gen Physiol* 143, 75-90.

Charest, P.G., Terrillon, S., and Bouvier, M. (2005). Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* 6, 334-340.

Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.

Coulon, V., Audet, M., Homburger, V., Bockaert, J., Fagni, L., Bouvier, M., and Perroy, J. (2008). Subcellular imaging of dynamic protein interactions by bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys J* 94, 1001-09.

Cronier, L., Crespin, S., Strale, P.O., Defamie, N., and Mesnil, M. (2009). Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 11, 323-338.

Dacres, H., Michie, M., Wang, J., Pflieger, K.D., and Trowell, S.C. (2012). Effect of enhanced Renilla luciferase and fluorescent protein variants on the Förster distance of Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Biochem Biophys Res Commun* 425, 625-29.

Davis, C.C., and Balzano, Q. (2010). The brain is not a radio receiver for wireless phone signals: Human tissue does not demodulate a modulated radiofrequency carrier. *Comptes rendus Physique* 11, 585-591.

Dayalan Naidu, S., and Dinkova-Kostova, A.T. (2017). Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J*

Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29, 135-161.

Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-290.

Dragulescu-Andrasi, A., Chan, C.T., De, A., Massoud, T.F., and Gambhir, S.S. (2011). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12060-65.

Draper, G., Vincent, T., Kroll, M.E., and Swanson, J. (2005). Childhood cancer in relation to distance from high voltage power lines in England and Wales: a case-control study. *BMJ* 330, 1290.

Fang, Y. (2011). The development of label-free cellular assays for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 6, 1285-298.

Feizi, A., and Arabi, M.A.A. (2007). Acute childhood leukemias and exposure to magnetic fields generated by high voltage overhead power lines-a risk factor in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 8, 69.

Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C.J., Devesa, I., and Ferrer-Montiel, A. (2014). Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes (Basel)* 4, 525-564.

Ferrer-Montiel, A., Fernández-Carvajal, A., Planells-Cases, R., Fernández-Ballester, G., González-Ros, J.M., Messeguer, A., and González-Muñiz, R. (2012). Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Pat* 22, 999-1017.

Fosbrink, M., Aye-Han, N.N., Cheong, R., Levchenko, A., and Zhang, J. (2010). Visualization of JNK activity dynamics with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5459-464.

Foster, K.R., and Glaser, R. (2007). Thermal mechanisms of interaction of radiofrequency energy with biological systems with relevance to exposure guidelines. *Health Phys* 92, 609-620.

Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz (Intermolecular energy migration and fluorescence). *Annalen der Physik* 2, 55-75.

Funk, R.H., Monsees, T., and Ozkucur, N. (2009). Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. *Prog Histochem Cytochem* 43, 177-264.

Glaser, r. (2005). Are thermoreceptors responsible for “non-thermal” effects? In Edition Wissenschaft (

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Goyet, E., Bouquier, N., Ollendorff, V., and Perroy, J. (2016). Fast and high resolution single-cell BRET imaging. *Sci Rep* 6, 28231.

Greenland, S., Sheppard, A.R., Kaune, W.T., Poole, C., and Kelsh, M.A. (2000). A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. Childhood Leukemia-EMF Study Group. *Epidemiology* 11, 624-634.

Grignani, F., Valtieri, M., Gabbianelli, M., Gelmetti, V., Botta, R., Luchetti, L., Masella, B., Morsilli, O., Pelosi, E., et al. (2000). PML/RAR alpha fusion protein expression in normal human hematopoietic progenitors dictates myeloid commitment and the promyelocytic phenotype. *Blood* 96, 1531-37.

Hamdan, F.F., Percherancier, Y., Breton, B., and Bouvier, M. (2006). Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci Chapter 5*, Unit 5.23.

Hamdan, F.F., Rochdi, M.D., Breton, B., Fessart, D., Michaud, D.E., Charest, P.G., Laporte, S.A., and Bouvier, M. (2007). Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* 282, 29089-9100.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harris, Daniel C. (2010). In *Quantitative chemical analysis* (New York: W.H. Freeman and Co.).

Harvey, C., and French, P.W. (1999). Effects on protein kinase c and gene expression in a human mast cell line, hmc-1, following microwave exposure. *Cell Biol Int* 23, 739-748.

Harvey, C.D., Ehrhardt, A.G., Cellurale, C., Zhong, H., Yasuda, R., Davis, R.J., and Svoboda, K. (2008). A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19264-69.

Held, K., Voets, T., and Vriens, J. (2015). TRPM3 in temperature sensing and beyond. *Temperature (Austin)* 2, 201-213.

Hentze, N., Le Breton, L., Wiesner, J., Kempf, G., and Mayer, M.P. (2016). Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *Elife* 5

Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. (1979). Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3107-110.

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1783-86.

Ho, K.W., Ward, N.J., and Calkins, D.J. (2012). TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *Am J Neurodegener Dis* 1, 1-14.

Honoré, E., Martins, J.R., Penton, D., Patel, A., and Demolombe, S. (2015). The Piezo Mechanosensitive Ion Channels: May the Force Be with You!. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 169, 25-41.

Hu, G.L., Chiang, H., Zeng, Q.L., and Fu, Y.D. (2001). ELF magnetic field inhibits gap junctional intercellular communication and induces hyperphosphorylation of connexin43 in NIH3T3 cells. *Bioelectromagnetics* 22, 568-573.

IARC (2002). *Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields*. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC)).

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2002). *Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 80, 1-395.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2013). *Non-ionizing radiation, Part 2: Radiofrequency electromagnetic fields*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 102, 1-460.

Jara-Oseguera, A., Nieto-Posadas, A., Szallasi, A., Islas, L.D., and Rosenbaum, T. (2010). Molecular Mechanisms of TRPV1 Channel Activation. *Open Pain Journal*

Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-233.

Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2010). Bioelectric effects of intense ultrashort pulses. *Crit Rev Biomed Eng* 38, 255-304.

Kabuto, M., Nitta, H., Yamamoto, S., Yamaguchi, N., Akiba, S., Honda, Y., Hagihara, J., Isaka, K., Saito, T., and Ojima, T. (2006). Childhood leukemia and magnetic fields in Japan: A case-control study of childhood leukemia and residential power-frequency magnetic fields in Japan. *International Journal of Cancer* 119, 643-650.

Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell* 22, 4647-656.

Kowalczyk, C., Yarwood, G., Blackwell, R., Priestner, M., Sienkiewicz, Z., Bouffler, S., Ahmed, I., Abd-Alhameed, R., Excell, P., et al. (2010). Absence of nonlinear responses in cells and tissues exposed to RF energy at mobile phone frequencies using a doubly resonant cavity. *Bioelectromagnetics* 31, 556-565.

Lampe, P.D., and Lau, A.F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384, 205-215.

Li, C.M., Chiang, H., Fu, Y.D., Shao, B.J., Shi, J.R., and Yao, G.D. (1999). Effects of 50 Hz magnetic fields on gap junctional intercellular communication. *Bioelectromagnetics* 20, 290-94.

Litovitz, T.A., Krause, D., Montrose, C.J., and Mullins, J.M. (1994). Temporally incoherent magnetic fields mitigate the response of biological systems to temporally coherent magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 15, 399-409.

Loening, A.M., Fenn, T.D., Wu, A.M., and Gambhir, S.S. (2006). Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* 19, 391-400.

Loening, A.M., Wu, A.M., and Gambhir, S.S. (2007). Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* 4, 641-43.

Manikonda, P.K., Rajendra, P., Devendranath, D., Gunasekaran, B., Channakeshava, Aradhya, R.S., Sashidhar, R.B., and Subramanyam, C. (2007). Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca²⁺ signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 413, 145-49.

Martinac, B. (2008). *Sensing with ion channels* (Springer).

McNamee, J.P., and Chauhan, V. (2009). Radiofrequency radiation and gene/protein expression: a review. *Radiat Res* 172, 265-287.

Mikkonen, L. (2013). SUMO-1 conjugation in normal and stress conditions in vivo.

Mir, L.M., Orłowski, S., Belehradek, J., and Paoletti, C. (1991). Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 27, 68-72.

Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., and Matsuda, M. (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* *411*, 1065-68.

Müller, S., Miller, W.H., and Dejean, A. (1998). Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Blood* *92*, 4308-316.

Neves, S.R. (2012). Modeling of spatially-restricted intracellular signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* *4*, 103-115.

Nie, K., and Henderson, A. (2003). MAP kinase activation in cells exposed to a 60 Hz electromagnetic field. *J Cell Biochem* *90*, 1197-1206.

Ohtani, S., Ushiyama, A., Maeda, M., Hattori, K., Kunugita, N., Wang, J., and Ishii, K. (2016). Exposure time-dependent thermal effects of radiofrequency electromagnetic field exposure on the whole body of rats. *J Toxicol Sci* *41*, 655-666.

P. vecchia, R. Matthes, J.C. Lin, R.D. Saunders, G. Ziegelberger, and A. Swerdlow. (2009). Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz), eds. (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection).

Paulraj, R., and Behari, J. (2004). Radio frequency radiation effects on protein kinase C activity in rats' brain. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *545*, 127-130.

Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* *280*, 9895-9903.

Percherancier, Y., Germain-Desprez, D., Galisson, F., Mascle, X.H., Dianoux, L., Estephan, P., Chelbi-Alix, M.K., and Aubry, M. (2009). Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem* *284*, 16595-6608.

Percherancier, Y., Goudeau, B., Charlet de Sauvage, R., de Gannes, F.P., Haro, E., Hurtier, A., Sojic, N., Lagroye, I., Arbault, S., and Veyret, B. (2015). Effects of 50 Hz magnetic fields on gap junctional intercellular communication in NIH3T3 cells. *Bioelectromagnetics* *36*, 287-293.

Percherancier, Y., Lagane, B., Planchenault, T., Staropoli, I., Altmeyer, R., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Hoessli, D.C., and Bachelier, F. (2003). HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem* *278*, 3153-161.

Percherancier, Y., Planchenault, T., Valenzuela-Fernandez, A., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Bachelierie, F. (2001). Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J Biol Chem* 276, 31936-944.

Pickard, W.F., and Barsoum, Y.H. (1981). Radio-Frequency Bioeffects at the membrane level: separation of thermal and athermal contributions in the characeae. *Journal of Membrane Biology* 61, 39-54.

Pontier, S.M., Percherancier, Y., Galandrin, S., Breit, A., Galés, C., and Bouvier, M. (2008). Cholesterol-dependent separation of the beta2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *J Biol Chem* 283, 24659-672.

Ravera, S., Repaci, E., Morelli, A., Pepe, I.M., Botter, R., and Beruto, D. (2004). Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on the adenylate kinase activity of rod outer segment of bovine retina. *Bioelectromagnetics* 25, 545-551.

Renard, P., Percherancier, Y., Kroll, M., Thomas, D., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Bachelierie, F. (2000). Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear IkkappaBalpha. *J Biol Chem* 275, 15193-99.

Rouwette, T., Avenali, L., Sondermann, J., Narayanan, P., Gomez-Varela, D., and Schmidt, M. (2015). Modulation of nociceptive ion channels and receptors via protein-protein interactions: implications for pain relief. *Channels (Austin)* 9, 175-185.

Ruigrok, H.J., Shahid, G., Goudeau, B., Poullietier de Gannes, F., Poque-Haro, E., Hurtier, A., Lagroye, I., Vacher, P., Arbault, S., et al. (2017). Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Three TRPV Channels. *Biophys J* 112, 87-98.

Saito, K., Hatsugai, N., Horikawa, K., Kobayashi, K., Matsu-Ura, T., Mikoshiba, K., and Nagai, T. (2010). Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca²⁺ imaging at the single cell level. *PLoS One* 5, e9935.

Saitoh, H., Pu, R.T., and Dasso, M. (1997). SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci* 22, 374-76.

Sauvageau, E., Rochdi, M.D., Oueslati, M., Hamdan, F.F., Percherancier, Y., Simpson, J.C., Pepperkok, R., and Bouvier, M. (2014). CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and controls their export from the endoplasmic reticulum. *Traffic* 15, 383-400.

Schann, S., Bouvier, M., and Neuville, P. (2013). Technology combination to address GPCR allosteric modulator drug-discovery pitfalls. *Drug Discov Today Technol* 10, e261-67.

Schüz, J., Dasenbrock, C., Ravazzani, P., Rössli, M., Schär, P., Bounds, P.L., Erdmann, F., Borkhardt, A., Cobaleda, C., et al. (2016). Extremely low-frequency magnetic fields and risk of childhood leukemia: A risk assessment by the ARIMMORA consortium. *Bioelectromagnetics*

Seeler, J.S., and Dejean, A. (2001). SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7243-49.

Sheppard, A.R., Swicord, M.L., and Balzano, Q. (2008). Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. *Health Phys* 95, 365-396.

Shupak, N.M. (2003). Therapeutic Uses of Pulsed Magnetic-Field Exposure: A review. *Radi Science Bulletin* , 9-32.

Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.P., et al. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186-190.

Stallaert, W., Dorn, J.F., Westhuizen, E., Audet, M., and Bouvier, M. (2012). Impedance responses reveal β_2 -adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles. *PLoS One* 7, e29420.

Stoilova-McPhie, S., Ali, S., and Laezza, F. (2013). Protein-Protein Interactions as New Targets for Ion Channel Drug Discovery. *Austin J Pharmacol Ther* 1

Tan, C.H., and McNaughton, P.A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536, 460-63.

Trugnan, G., Fontanges, P., Delautier, D., and Ait-Slimane, T. (2004). [FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM...new techniques for a colourful life]. *Med Sci (Paris)* 20, 1027-034.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544.

Tuinstra, R., Goodman, E., and Greenebaum, B. (1998). Protein kinase C activity following exposure to magnetic field and phorbol ester. *Bioelectromagnetics* 19, 469-476.

Uckun, F.M., Kurosaki, T., Jin, J., Jun, X., Morgan, A., Takata, M., Bolen, J., and Luben, R. (1995). Exposure of B-lineage lymphoid cells to low energy electromagnetic fields stimulates Lyn kinase. *J Biol Chem* 270, 27666-670.

Vassort, G., and Fauconnier, J. (2008). [Transient receptor potential, TRP channels: a new family of channels broadly expressed]. *Med Sci (Paris)* 24, 163-68.

Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4, 137-142.

Verschaeve, L., Juutilainen, J., Lagroye, I., Miyakoshi, J., Saunders, R., de Seze, R., Tenforde, T., van Rongen, E., Veyret, B., and Xu, Z. (2010). In vitro and in vivo genotoxicity of radiofrequency fields. *Mutat Res* 705, 252-268.

Verschave, L. (2012). Evaluations of international expert group reports on the biological effects of radiofrequency fields. In *Wireless communications and networks : recent advances*, A. Eksim, eds. (Rijeka, Croatia:

Vihervaara, A., and Sistonen, L. (2014). HSF1 at a glance. *J Cell Sci* 127, 261-66.

Violin, J.D., Zhang, J., Tsien, R.Y., and Newton, A.C. (2003). A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol* 161, 899-909.

Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748-754.

Wang, Y., Shyy, J.Y., and Chien, S. (2008). Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. *Annu Rev Biomed Eng* 10, 1-38.

Woudenberg-Vrenken, T.E., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2009). The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5, 441-49.

Yamaguchi, D.T., Huang, J., Ma, D., and Wang, P.K. (2002). Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields in osteoblast-like models is dependent on cell differentiation. *J Cell Physiol* 190, 180-88.

Yoon, Y.J., Kim, J.A., Shin, K.D., Shin, D.-S., Han, Y.M., Lee, Y.J., Lee, J.S., Kwon, B.-M., and Han, D.C. (2011). KRIBB11 inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor b to the hsp70 promoter. *Journal of Biological Chemistry* 286, 1737-747.

Zeng, Q., Ke, X., Gao, X., Fu, Y., Lu, D., Chiang, H., and Xu, Z. (2006). Noise magnetic fields abolish the gap junction intercellular communication suppression induced by 50 hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 27, 274-79.

Ziemann, U. (2017). Thirty years of transcranial magnetic stimulation: where do we stand? *Exp Brain Res* 235, 973-984.