



**HAL**  
open science

# Étude en temps réel des effets cellulaires et moléculaires des champs électromagnétiques radiofréquence environnementaux

Hermanus Ruigrok

► **To cite this version:**

Hermanus Ruigrok. Étude en temps réel des effets cellulaires et moléculaires des champs électromagnétiques radiofréquence environnementaux. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0674 . tel-01782402v2

**HAL Id: tel-01782402**

**<https://theses.hal.science/tel-01782402v2>**

Submitted on 16 May 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE**

En vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR EN SCIENCE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

**Spécialité Biochimie**

par

**Hermanus RUIGROK**

**Étude en temps réel des effets cellulaires et moléculaires  
des champs électromagnétiques radiofréquence  
environnementaux**

Thèse dirigée par M. Yann PERCHERANCIER

Soutenue le 29 Septembre 2017 devant la commission d'examen :

M. Thomas DUCRET, Professeur de l'Université de Bordeaux	Président
M. Rod O'CONNOR, Professeur de l'École des Mines de St Etienne	Rapporteur
M. René DE SÈZE, Directeur de recherche INERIS	Rapporteur
M. Vincent COMPAN, Chargé de recherche CNRS	Examineur
M. Yves LE DRÉAN, Maître de conférences, Université de Rennes	Examineur
M. Bernard VEYRET, Directeur de recherche honoraire CNRS	Invité
M. Yann PERCHERANCIER, Chargé de recherche CNRS	Directeur de thèse

## Résumé

Durant les quinze dernières années, une attention particulière a été portée aux effets potentiels sur le vivant des champs radiofréquence (RF) des communications sans fil. Malgré l'intensité des efforts de recherche sur les effets biologiques et sanitaires potentiels des RF, 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 le LTE (4G) sont déjà largement déployée et que la 5G est annoncée à l'horizon 2020. S'y ajoutent le Wi-Fi, le WiMAX, les RFID et des signaux émergents dans la gamme des millimétriques. 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 acteurs de la politique citoyenne en environnement-santé. Par ailleurs, 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).

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, sachant qu'aucun échauffement n'est provoqué par l'exposition aux dispositifs de communications sans fil en raison des très faibles niveaux correspondant. Il est donc 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.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer en temps réel et sur cellules vivantes, les effets de l'exposition aux champs radiofréquences (CW, GSM-1800, UMTS, Wi-Fi, WiMax, LTE), soit au niveau moléculaire en ciblant l'activité du canal ionique TRPV1 qui est l'un des thermorécepteurs de notre organisme, soit au niveau cellulaire en étudiant le comportement général de cellules exposées aux RF à l'aide d'une technique dite « sans marquage », l'impédancemétrie.

Le suivi de l'activité du canal TRPV1 sous exposition RF a été réalisé à l'aide de la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET), une technique spectroscopique qui permet l'analyse des interactions protéines-protéines ou des changements de conformation des protéines en temps réel et sur cellules vivantes. La mise en place de cette

technique a demandé la construction et la caractérisation de sondes BRET ciblant les canaux TRP ainsi que la mise au point d'un dispositif de mesure déporté des spectres de BRET à l'aide d'une fibre optique, afin de pouvoir exposer les échantillons aux champs RF. La conclusion de ce volet de la thèse est que les RF sont capables d'activer le canal TRPV1 en produisant un échauffement diélectrique, mais qu'en absence d'augmentation de la température il n'y a aucun effet des RF sur le niveau d'activité basal du canal TRPV1 ou sur l'efficacité de la Capsaïcine, un agoniste, à activer TRPV1.

L'analyse du comportement global de cellules en culture sous exposition RF a été réalisée à l'aide d'un système xCELLigence modifié afin de pouvoir à la fois suivre le comportement cellulaire par impédancemétrie tout en utilisant le réseau d'électrodes des plaques de mesure pour exposer les cellules mises en culture aux RF. À l'aide de ce dispositif, nous avons pu réaliser des expositions de cellules SH-SY5Y avec un DAS de 24 W/Kg sans provoquer d'échauffement dans le milieu de culture ou dans les cellules. Aucun effet des RF sur le comportement de la lignée de neuroblastome SH-SY5Y n'a cependant pu être mis en évidence, que ce soit en absence ou en présence d'une co-stimulation par un agent chimique.

La conclusion de cette étude est que dans des conditions où la température reste stable, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification du fonctionnement du vivant que ce soit au niveau moléculaire ou au niveau cellulaire. Les outils développés dans ce travail de thèse ouvrent, de plus, d'importantes perspectives tant dans le domaine du criblage de médicaments candidats à l'aide du BRET spectral, que pour de futures études en bioélectromagnétisme.

**Mots clés :** radiofréquences, temps réel, cellules vivantes, BRET, impédancemétrie

# **Abstract**

## **Real-time study of cellular and molecular effects of electromagnetic fields**

The biological and health effects of radiofrequency (RF) electromagnetic fields (EMF) exposure have been very actively studied in the past two decades, mainly triggered by concerns about potential health effects of wireless communication systems. This physical agent is among the most common, fastest-growing environmental factors, triggering concerns in the population, as even a minor effect of EMF exposure on health could have a major public health impact.

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 well-described effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF EMF) on biological systems are caused by dielectric-relaxation heating. In contrast, “nonthermal” RF EMF effects refer to other potential biological effects 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, making difficult to draw conclusions on the basis of available experimental results. Nonetheless, in 2011, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified RF emitted by cell phones as “possibly carcinogenic to humans” (Class 2B). The characterization of nonthermal biological RF EMF effects is therefore of primary importance for setting safety limits since guidelines and standards have so far been set to protect from the known health risks associated only with the thermal effects of RF EMF exposures.

The aim of this basic science thesis work is to characterize the effects of environmental RF EMF signals on living matter at the cellular and molecular level. In this work, we took advantage of modern and innovative methods to observe the behavior of living matter under RF EMF exposure in real time at various specific absorption rates (SAR). In particular, we have studied:

- (i) Specific RF EMF effects on the ionic channel TRPV1, a major thermoreceptor in our body. TRPV1 activation under RF EMF exposure was studied using the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technique. The implementation

of this technique called for the construction and characterization of BRET probes targeting TRP channels as well as the development of a device for the remote measurement of BRET spectra, using an optical fiber. The conclusion of this part of the thesis is that RFs are able to activate the TRPV1 channel by producing a dielectric heating but in the absence of temperature increase there is no RF effect on the basal activation state of TRPV1 and no change of capsaicin maximal efficacy to activate TRPV1.

- (ii) The analysis of the global behavior of cells in culture under RF exposure was carried out using a modified xCELLigence system where the array of electrodes of the measuring plates were also used to expose the cells to RF EMF. Using this device, we were able to perform SH-SY5Y cell exposures with a SAR of 24 W/kg without causing heating in the culture medium or in the cell culture. No effect of RF EMF on the behavior of the neuroblastoma SH-SY5Y line could however be demonstrated, either in the absence or in the presence of a co-stimulation by a chemical agent.

The conclusion of this study is that under conditions where the temperature remains stable, we have not been able to demonstrate any changes in the functioning of living cells, either at the molecular level or at the cellular level. The tools developed in this thesis work offer important prospects both in the field of drug screening using spectral BRET, and pave the ways for future studies in bioelectromagnetics.

**Key words:** radiofrequencies, real-time, living cells, BRET, impedancemetry.

Cette thèse a été réalisée au sein du :

**Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, UMR 5218**

**351 cours de la Libération**

**33405 Talence cedex, France**

## Remerciements

Je tiens avant tout à remercier Yann Percherancier, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir permis de réaliser mon stage de Master 2 et surtout ma thèse avec toi. Je me souviendrais toujours de toutes ces heures de manip ensemble avec radio Nova, de nos voyages en tram, les bras rempli de matériel, d'avoir fait sonner l'alarme du NSySA... Chaque thésard n'a pas la chance de regarder Retour vers le futur III et Star Wars VII avec son directeur de thèse. Mais mis à part ça, j'ai énormément appris durant ces quatre années, et je te remercie pour tout !

Je voudrais aussi remercier Bernard Veyret, qui a également été mon directeur de thèse pendant mes deux premières années de thèse. Merci pour tous tes conseils et les longues discussions scientifiques toujours passionnantes ! Je me souviendrais aussi qu'il ne faut pas lutter contre toi sur un lac en canoë ! Si personnellement je n'en ai pas fait les frais, j'ai vu quelques étudiants passer par-dessus bord !

Je tiens également à remercier les rapporteurs et examinateurs, messieurs Thomas Ducret, Rod O'Connor, René De Sèze, Vincent Compan et Yves Le Dréan d'avoir accepté d'expertiser mon travail.

Je voudrais aussi dire un grand merci aux personnes qui m'ont accueilli à l'institut Bergonié et au NSySA, et qui m'ont permis d'utiliser leur matériel pendant de très longues heures, et sans jamais avoir eu envie de me pousser dehors (enfin, à ma connaissance) ! J'ai bien sûr pensé pour toi Lydia. Si j'en suis arrivé à la aujourd'hui, c'est aussi grâce à toi ! Merci pour tout ! Pauline, sans toi, les manips de BRET interminables n'auraient pas été aussi sympas ! Un petit coup de Spray Net, dans la face la, et ça repart ! Merci pour tout !

Merci aux formidables membres de l'équipe Bio-EM que j'ai pu côtoyer pendant ces quatre années : Isabelle, Renaud, Emma (nos trajets en voiture vont beaucoup me manquer ! Je reviendrais sur Bordeaux juste pour ça !), Florence, Rémy "Râteau" Renom (alors, ça match ?), Annabelle, Corinne (tu en as eu du courage à m'écouter râler !), Marion (qui est partie vers d'autres horizons, comme ça elle ne mangera plus mon St Félicien !), et tous les stagiaires qui sont passés par là ! Notamment Jennifer, qui a un peu été ma première stagiaire ! Et Guillaume ma ptite Bouloussse ! (Azy, on s'prend un ptit café ? Juste comme ça, vous m'avez trahi comme ça !) A quand le prochain traquenard ?



Merci aussi aux équipes ELIBIO et AS2N et à tous les copains ! Farad (merci d'être la bro ! Change pas !), Jonathan, Antoine, Amélie, Charly, Luigi, Jean-Paul Potier, Manu, Krishna, Katrin, aux anciens thésards Flopinou, François, Mathieu et Gwendal, et à tous les stagiaires !

Denis, Lynn, et David, on se souviendra de Ghent, et du genièvre au piment ! Merci pour cette superbe semaine en Belgique !

Un grand merci à tous ceux qui sont venus me voir sur Bordeaux, ou qui m'ont permis de m'échapper de la thèse durant un weekend ou pour des vacances ! Je pense à Julie et Eddy, et à tous mes amis que j'ai rencontré à l'EPHE ! Si j'ai réussi cette thèse, c'est grâce à vous aussi !

A tous mes potes de Sassenage, Grenoble et les environs, un énorme merci ! Vous faites partis de ma famille les gars, je ne vous oublierai jamais ! On se donne rendez-vous aux Enginières, ou on se fait un Jungle Speed sur le skate-park de l'Ovalie !

Pour finir, j'aimerais remercier toute ma famille, mon grand-père et mes deux formidables sœurs ! Et à mes parents, qui m'ont tout donné et m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui, je vous remercie de tout mon cœur. Ik hou van jullie !

*À ma famille*

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>4</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Introduction au bioélectromagnétisme</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Notions sur le rayonnement électromagnétique</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Spectre électromagnétique et interaction onde-matière</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 Le spectre électromagnétique.....	13
1.2.2 Rayonnements ionisants et non-ionisants .....	14
1.2.3 Effets thermiques.....	14
<b>1.3 Interaction des champs radiofréquence avec la matière vivante</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Contexte social, économique et scientifique</b> .....	<b>17</b>
<b>1.5 Approches expérimentales</b> .....	<b>19</b>
<b>2 Première approche : analyse de l'activité des canaux TRP sous l'effet des champs RF à l'aide de la technique du BRET</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Les canaux Transient Receptor Potential</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Introduction générale des TRP .....	21
2.1.2 Les sous-familles de TRP.....	23
2.1.2.1 <i>Structure générale des TRP</i> .....	24
2.1.2.2 <i>TRPC (Canonique)</i> .....	25
2.1.2.3 <i>TRPV (Vanilloïde)</i> .....	26
2.1.2.4 <i>TRPM (Melastatine) et TRPA (Ankyrine)</i> .....	30
2.1.2.5 <i>TRPP (Polycystine)</i> .....	30
2.1.2.6 <i>TRPML (Mucolipine)</i> .....	31
2.1.2.7 <i>TRPN (nompC)</i> .....	31
2.1.3 Structure et régulation détaillée de TRPV1.....	31
2.1.3.1 <i>Structure détaillée de TRPV1</i> .....	31

2.1.3.2	<i>Régulation de TRPV1</i> .....	34
2.1.3.2.1	Température.....	34
2.1.3.2.2	pH .....	34
2.1.3.2.3	Molécules chimiques .....	35
2.1.3.2.3.1	Agonistes .....	35
2.1.3.2.3.2	Antagonistes.....	36
2.1.3.2.4	Autres molécules .....	38
2.1.3.3	<i>Hypothèses et mécanismes d'ouverture du canal TRPV1</i> .....	40
2.1.3.4	<i>Adressage de TRPV1 à la membrane plasmique et recyclage</i> .....	43
2.1.3.5	<i>Implication de TRPV1 dans de nombreuses maladies</i> .....	44
<b>2.2</b>	<b>Transfert d'énergie en résonance.....</b>	<b>45</b>
2.2.1	Le principe du transfert d'énergie en résonance .....	45
2.2.2	Green fluorescent protein .....	47
2.2.3	DsRed.....	50
2.2.4	Le transfert d'énergie en résonance de fluorescence .....	51
2.2.5	Transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET).....	54
2.2.6	Combinaison des techniques de RET permettant d'étudier l'interaction entre plusieurs protéines .....	57
<b>2.3</b>	<b>Etudes des effets des radiofréquences sur l'activation du canal TRPV1 .....</b>	<b>58</b>
2.3.1	Caractérisation des sondes BRET ciblant les canaux TRP et mise en place de la lecture spectrale des signaux de BRET – Article 1.....	58
2.3.2	Etude de l'effet des RF sur le canal TRPV1 – Article 2 .....	77
<b>3</b>	<b>Deuxième approche : analyse globale du comportement cellulaire sous exposition RF .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1</b>	<b>Introduction aux techniques sans-marquages .....</b>	<b>88</b>
3.1.1	Biocapteurs optiques .....	89

3.1.2	Biocapteurs électriques .....	92
3.1.3	Etude des fonctions cellulaires à l'aide des techniques label-free .....	95
<b>3.2</b>	<b>Analyse globale du comportement cellulaire sous exposition RF à l'aide de l'impédancemétrie .....</b>	<b>97</b>
3.2.1	Utilisation de l'impédancemétrie en bioélectromagnétisme .....	97
3.2.2	Résultats expérimentaux .....	101
3.2.3	Discussion .....	108
<b>4</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>111</b>
<b>4.1</b>	<b>Perspectives : autres cibles moléculaires à étudier .....</b>	<b>112</b>
4.1.1	Autres canaux thermo-TRP .....	112
4.1.2	Le Heat Shock Factor-1 et les Heat Shock Proteins.....	113
4.1.3	Les MAPK PKC, Ras, ERK et JNK.....	114
<b>4.2</b>	<b>Perspectives : l'impédancemétrie pour approfondir les connaissances sur le comportement cellulaire sous l'influence des CEM .....</b>	<b>117</b>
4.2.1	Etude d'autres lignées cellulaires et de cellules primaires.....	117
4.2.2	Exploration des paramètres des champs électromagnétiques .....	117
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>120</b>

## Liste des abréviations

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
4 $\alpha$ -PDD	4 $\alpha$ -Phorbol 12,13-didecanoate
5-iodoRTX	5-iodorésinifératoxine
ADN	Acide Désoxyribonucléique (DNA en anglais)
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AKAP 79/150	A-Kinase Anchoring Protein 79/150
ARD	Domaine Ankyrin Répété
ATP	Adénosine Triphosphate
BFP	Blue Fluorescent Protein
BiFC	Complémentation biomoléculaire de fluorescence
BiLC	Complémentation biomoléculaire de bioluminescence
BRET	Transfert d'Énergie en Résonance de Bioluminescence
CaM	Calmoduline
CAPS	Capsaïcine
Cdk5	Cyclin-dépendant kinase 5
CEM	Champs Electromagnétiques
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CIRC	Centre International de la Recherche sur le Cancer
Clz	Coelentérazine
CPZ	Capsazépine
CW	Continuous Wave
DAG	Diacylglycérol

DAS	Degré d’Absorption Spécifique
DMR	Dynamic Mass Redistribution
DRG	Dorsal Root Ganglia
EBF	Extrêmement Basses Fréquences
ECIS	Electric Cell-substrate Impedance Sensing
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EKAR	Extracellular signal-regulated Kinase Activity Reporter
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FLIM-FRET	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy-FRET
FRET	Transfert d’Energie en Résonance de Fluorescence
GABARAP	$\gamma$ -amino butyric acid A-Type receptor associated protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GSM	Global System for Mobile communication
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d’hydrogène
HCE-T	Cellules épithéliales cornéennes humaines
HSF	Heat Shock Factor
Hsp	Heat shock protein
IP <sub>3</sub>	Inositol Triphosphate
KIF13B	Kinesin-3 family member 13B
KO	Knock-out
Kv channels	Canaux potassiques voltage-dépendant
LBP	Luciferin Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
LTE	Long Term Evolution

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mRFP1	monomeric Red Fluorescent Protein 1
NGF	Nerve Growth Factor
nompC	NO mechanoreceptor potential C
OMS	Organisme Mondial de la Santé
PCA	Proteic Complementation Assay
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKD2	Polycystic Kidney Disease 2
PKD2L1 and 2	Polycystic Kidney Disease 2 Like 1 and 2
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol Myristate Acétate
REM	Rayonnements Electromagnétiques
RET	Transfert d'Energie en Résonance
RF	Radiofréquences
RFP	Red Fluorescent Protein
Rluc	<i>Renilla</i> Luciférase
RTX	Résinifératoxine
RuR	Ruthénium Red
RWG	Resonant Waveguide Grating
SAR	Specific Absorption Rate
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SI	Système International



SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SPR	Surface Plasmon Resonance
TM	Transmembranaire
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrine
TRPC	Transient Receptor Potential Canonique
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatine
TRPML	Transient Receptor Potential Mucoipine
TRPN	Transient Receptor Potential NompC
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystine
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
UMTS	Universal Mobile Telecommunication System
UV	Ultra-Violets
W-CDMA	Wideband Code Division Multiple Access
Wi-Fi	Wireless Fidelity
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## Préambule

Le nombre grandissant d'appareils interconnectés et la multiplication des sources d'expositions aux radiofréquences (RF) provoquent de nombreuses craintes au sein de la société quant aux potentiels effets que pourraient avoir les ondes électromagnétiques sur notre santé. Ces craintes persistent malgré les normes établies pour protéger les populations et les recherches d'effets biologiques de ces ondes. Le seul effet connu et bien caractérisé des RF est l'échauffement, qui est obtenu à des niveaux d'expositions élevés. En revanche, on ne connaît pas précisément aujourd'hui de mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient être impactés par les RF émis à des niveaux environnementaux, dits « non-thermiques ». Les quelques études ayant rapporté des effets biologiques des RF n'ont jamais pu être reproduites et souffrent souvent d'un manque de contrôles expérimentaux, notamment concernant l'évolution de la température sous exposition. De plus, la grande majorité des études en bioélectromagnétisme utilise, pour étudier les effets cellulaires et moléculaires des RF, des approches ne permettant une analyse de la matière vivante qu'après l'exposition. Ce type d'approche peut entraîner une vision biaisée des processus biologiques soumis aux RF, les cellules existant dans des états d'équilibre dynamique métastables par nature et souvent réversibles. Le recours à des approches en temps réel serait donc plus approprié pour étudier, *in-vitro*, les mécanismes d'interactions entre les ondes et le vivant.

Dans ce manuscrit, après avoir introduit la notion de champ électromagnétique (CEM) et exposé les objectifs de la recherche en bioélectromagnétisme, nous présenterons notre travail de recherche expérimental qui a pour thème l'étude *in vitro* des effets non-thermiques des CEM RF à l'aide d'approches temps-réel / cellules vivantes. Ce travail de recherche doctoral se décline au travers de deux axes de recherches distincts et complémentaires. Pour chacun de ces deux axes de recherches, les notions scientifiques nécessaires à la compréhension des résultats expérimentaux seront préalablement introduites.

Dans un premier volet de ces recherches doctorales, nous avons cherché à caractériser les effets des champs RF sur l'activation du canal TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), une protéine largement exprimée chez l'homme et qui fait partie de la famille des canaux thermo-TRP, canaux qui permettent aux cellules de « ressentir la chaleur ». Les CEM RF provoquant un échauffement de la matière vivante, il restait à déterminer si un couplage spécifique, non causé par l'échauffement, pouvait exister entre les CEM RF et des

thermorécepteurs, tel que TRPV1. Pour réaliser cette étude, nous avons eu recours au transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET, pour Bioluminescence Resonance Energy Transfer, en anglais). La construction et la caractérisation de sondes BRET basées sur la structure des canaux thermo-TRP a nécessairement constitué une première étape de nos recherches. Par la suite, la mise en place d'un dispositif déporté de lecture des signaux BRET en vue de l'exposition des échantillons aux RF, nous a conduit à mettre au point une nouvelle méthode d'analyse spectrale des signaux BRET. Ce développement technologique nous a permis de tester l'effet des RF sur TRPV1 et ouvre également d'intéressantes perspectives de recherches dans le cadre plus large du criblage de candidats médicaments.

Dans un deuxième volet des recherches développées dans ce travail, nous avons tiré profit d'une méthode d'analyse « sans-marquage » pour étudier plus largement le comportement cellulaire sous exposition aux RF sans faire d'a priori sur un mécanisme moléculaire en particulier. La cellule est une unité complexe où se mêle une multitude de mécanismes moléculaires pour assurer son bon fonctionnement. Étudier une cible moléculaire permet d'observer un seul événement cellulaire à la fois. Dans ce contexte, une approche intégrative, permettant de mesurer le comportement global de la cellule au cours de l'exposition, nous apparaissait comme pouvant faciliter énormément l'identification des paramètres critiques des champs. Depuis quelques années, l'émergence de techniques « sans-marquage » rend possible l'étude du comportement d'une cellule ou d'une population cellulaire dans son ensemble, de manière non-invasive et en temps réel. Parmi les différentes technologies existantes, l'impédancemétrie s'est avéré être une technique de choix pour l'étude du comportement cellulaire sous exposition à des champs électromagnétiques. Nous avons donc mis en place une approche cellulaire utilisant la mesure d'impédance pour intégrer l'ensemble des réactions cellulaires potentiellement causées par l'exposition aux différents types de signaux RF et cribler grâce à cette technique les paramètres des champs efficaces.

# 1 Introduction au bioélectromagnétisme

Les recherches concernant les effets biologiques des champs électromagnétiques (CEM) sur la matière vivante ont commencé dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle avec les recherches d'Arsène 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 RF des communications sans fil. 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.

## 1.1 Notions sur le rayonnement électromagnétique

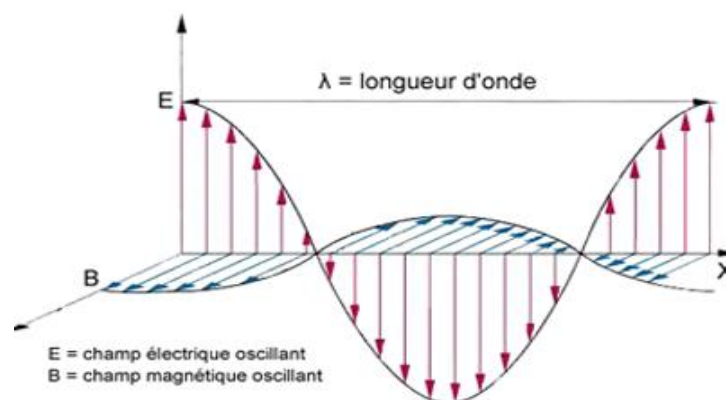
Les rayonnements électromagnétiques (REM) sont une forme de transport de l'énergie sans support matériel. En 1865, Maxwell formula une grande synthèse de tous les phénomènes électriques et magnétiques, les fameuses "équations de Maxwell". En combinant ces équations, Maxwell réussit à montrer qu'une onde 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  $\mu$  représente la perméabilité magnétique du milieu.

À 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 (Figure 1). Dans le vide, la propagation est rectiligne et se fait à la vitesse de la lumière, soit environ  $3 \times 10^8$  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<sup>2</sup>).

Les ondes électromagnétiques se caractérisent par un ensemble de paramètres comprenant la fréquence ( $f$ ), la longueur d'onde ( $\lambda$ ), 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 1 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  $\lambda$  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 ( $\epsilon$ ) et sa perméabilité ( $\mu$ ). 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 1.** 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 :

$$S = E^2/120 \pi = E^2/377$$

et

$$S = 120 \pi H^2 = 377 H^2$$

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  $H$ .

## 1.2 Spectre électromagnétique et interaction onde-matière

### 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 dans la Figure 2, 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 champ 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 champ. 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.

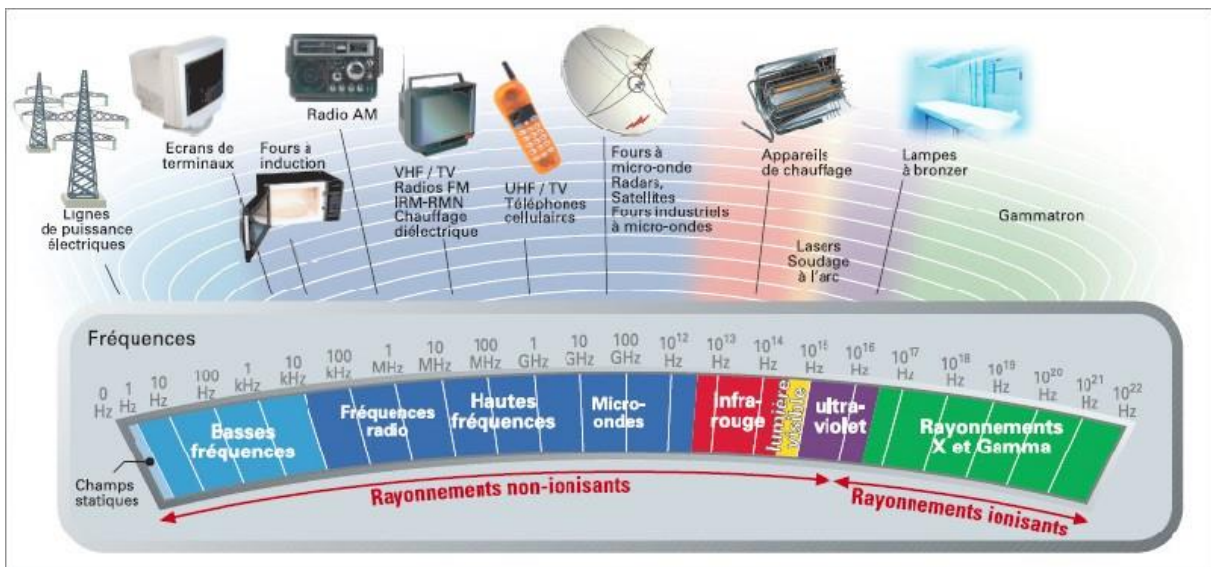


Figure 2. Spectre électromagnétique : bande de fréquences et applications<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> [www.champs-electro-magnetiques.com/ondes/le-spectre-electromagnetique-8.html](http://www.champs-electro-magnetiques.com/ondes/le-spectre-electromagnetique-8.html)

### **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 EBF – rayonnements 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  $\gamma$ , sont dits ionisants (Figure 2).

### **1.2.3 Effets thermiques**

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

Dans le cas de rayonnements énergétiques, tels que les 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 joules 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 ( $A/m^2$ ).

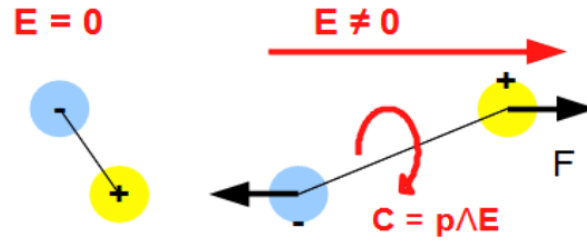


### 1.3 Interaction des champs radiofréquence avec la matière vivante

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 (Figure 1).

Une onde RF a la capacité de se propager dans la matière, et donc dans notre organisme. Elle interagit 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 « spécifiques ». À ce jour, seuls les effets thermiques ont été validés et caractérisés sur le plan 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. 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 (Figure 3).



**Figure 3.** *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 environ 50% de l'onde. Les 50% restants sont réfléchis. L'absorption des RF est quantifiée par le DAS exprimé 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 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 d'environ 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 la partie suivante, 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 de mon travail de thèse et sera présentée dans les parties 2 et 3 du présent manuscrit.

## **1.4 Contexte social, économique et scientifique**

La recherche sur les effets biologiques des champs électromagnétiques 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 environnementale. 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 RF utilisées par les communications sans fil.

La conclusion à ce jour est que les mécanismes biophysiques responsables des effets biologiques des champs électromagnétiques 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, 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 en 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.

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 déployée en 2020. S'y ajoutent le Wi-Fi, le WiMAX, les RFID et des 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<sup>ème</sup> siècle, il est capital de savoir si l'on peut totalement exclure des effets non-thermiques des RF. Bien que certains travaux tendent à montrer que les RF à bas niveau provoquent des effets cellulaires, il faut rappeler que de nombreuses autres études montrent une absence d'effet (pour revue : (IARC, 2013; 2009; Verschaeve, 2012; Verschaeve et al., 2010). 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'aucune hypothèse mécanistique plausible ne soit encore disponible (Foster and Glaser, 2007; IARC, 2013; Sheppard et al., 2008) et qu'il soit difficile de dégager des conclusions sur la base des résultats expérimentaux disponibles (Vecchia et al., 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) sur la base des résultats épidémiologiques.

En France, la loi Abeille<sup>2</sup>, définitivement adoptée en 2015, est le premier texte de loi mettant en œuvre 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

---

<sup>2</sup> <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000030212642&categorieLien=id>

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 contribueraient sans nul doute à la ré-évaluation du risque sanitaire des champs radiofréquences et à d'éventuelles applications thérapeutiques.

## **1.5 Approches expérimentales**

La connaissance des effets biologiques potentiels des champs RF 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 (Funk et al., 2009; Shupak et al., 2003). Il est important de souligner que ces champs sont différents de ceux auxquels nous sommes exposés dans notre environnement quotidien. Les champs électromagnétiques EBF ambiants sont sinusoïdaux et de faible niveau (typiquement inférieur à 10  $\mu$ T (micro Tesla), 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.

Un autre constat en bioélectromagnétisme est que la grande majorité des approches proposées jusqu'alors pour étudier les effets cellulaires et moléculaires consistent en des analyses a posteriori de la matière vivante, à partir d'extraits cellulaires ou tissulaires. Ce type d'approche peut entraîner une vision biaisée des processus biologiques, les cellules existant dans des états d'équilibre dynamique métastables par nature et souvent réversibles. Le recours à des approches permettant une exploration non invasive en temps réel sur cellule vivante sous exposition permettrait de se positionner clairement quant à l'existence d'effets biologiques

causés par l'exposition. Par ailleurs, cela rendrait 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 (Fang, 2011; Neves, 2012; Trugnan et al., 2004). Étonnamment, la recherche en bioélectromagnétisme n'a pas encore pleinement bénéficié de ces innovations biotechnologiques. Dans cette thèse sont présentées deux approches en temps réel et sur cellules vivantes permettant d'étudier de manière non invasive le comportement de la matière vivante aux niveaux cellulaires et moléculaires au cours de l'exposition aux RF. La première approche consiste en l'analyse de l'activité de protéines possiblement cibles des effets des RF à l'aide de la technique du BRET (chapitre 2). La seconde approche 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 3).

## **2 Première approche : analyse de l'activité des canaux TRP sous l'effet des champs RF à l'aide de la technique du BRET**

### **2.1 Les canaux Transient Receptor Potential**

Au cours des vingt dernières années, la plupart des études concernant les effets biologiques induits par les champs RF ont été réalisées à des DAS de faible niveau, c'est-à-dire au-dessous du seuil critique de l'effet thermique (4 W/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 pouvaient 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.

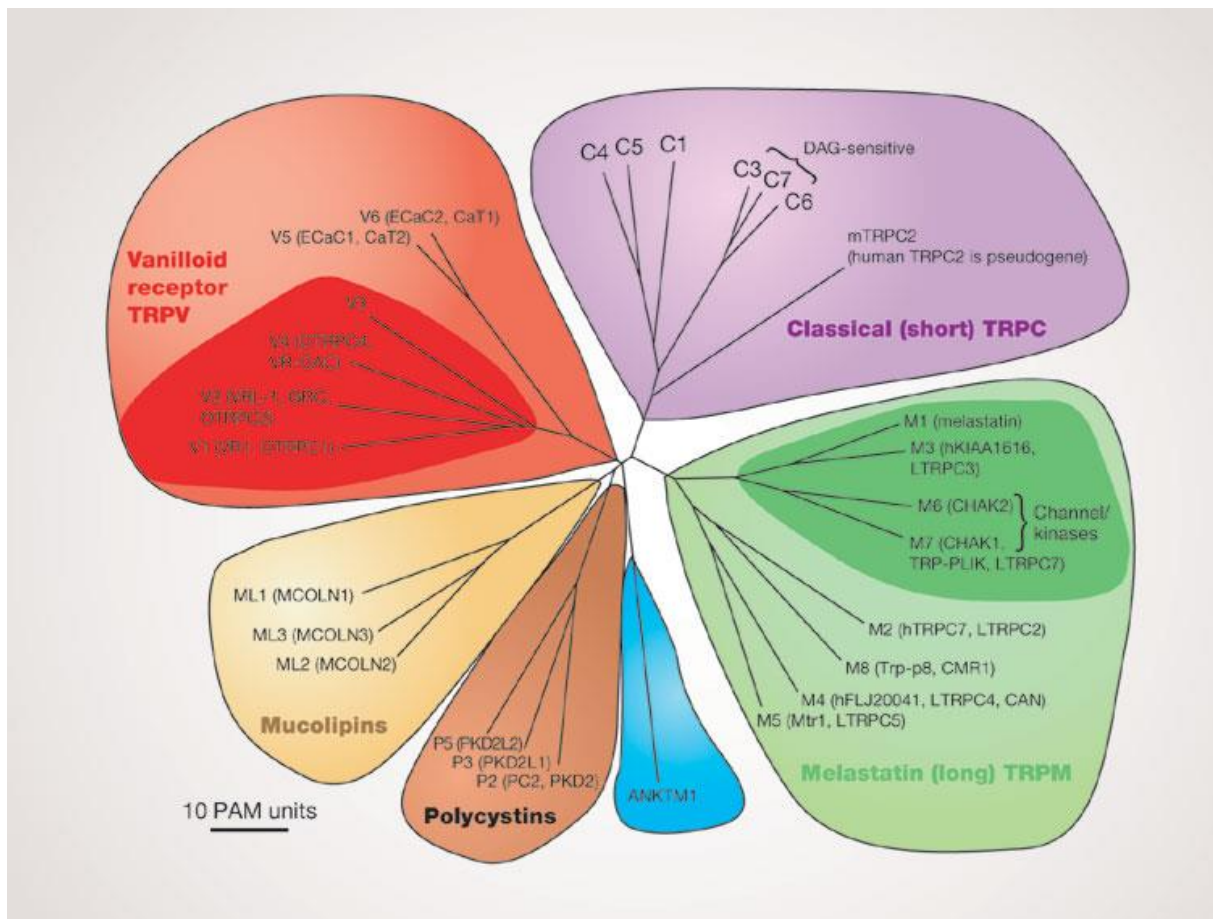
#### **2.1.1 Introduction générale des TRP**

Savoir détecter les changements de l'environnement, comme la température, est une fonction vitale et présente chez tous les organismes vivants. Pour cela, les cellules expriment à leur surface des récepteurs tels que des canaux ioniques qui vont initier des cascades de signalisation résultant en une réponse physiologique et comportementale afin de s'adapter à ces variations. Il existe chez un grand nombre d'organismes vivants, dont l'Homme, une grande famille de récepteurs sensibles aux modifications de l'environnement : les canaux Transient Receptor Potential (TRP). Les protéines TRP sont des canaux cationiques exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme. Ils jouent un rôle de transducteurs de stimuli physiques et

chimiques tels que la température, la pression membranaire, un grand nombre de molécules chimiques synthétiques ou naturelles, le potentiel d'oxydation-réduction, l'osmolarité et le pH (Moran et al., 2011; Nieto-Posadas et al., 2011). L'activation des canaux TRP permet une entrée de cations, tel que le  $\text{Ca}^{2+}$ , à travers la membrane plasmique ce qui entraîne de nombreuses réponses cellulaires telles que la dépolarisation de la membrane cellulaire déclenchant un potentiel d'action, ou le relargage de neuropeptides dans les cellules neuronales. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  provoquée par l'activation de TRPV1 induit l'apoptose dans les kératinocytes de la peau, ce qui permet de régénérer la barrière épidermale (Tóth et al., 2014). Ainsi, les canaux TRP peuvent être impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques incluant la physiologie sensorielle (nociception, thermosensibilité, sensations mécaniques), la régulation cardiovasculaire, le contrôle de la croissance et la prolifération cellulaire, la régulation de la pression sanguine, ou encore des fonctions urologiques (Clapham, 2003; Ramsey et al., 2006).

Le premier canal TRP a été découvert chez *Drosophila melanogaster* par Cosens et Manning en 1969 (Cosens and Manning, 1969). Il a été montré que le gène *trp* jouait un rôle dans la phototransduction impliquant un signal calcique. Une mutation de ce gène entraîne une réponse transitoire du potentiel dans les cellules photoréceptrices des drosophiles mutantes, bien que la lumière soit maintenue (Montell et al., 1985). De là est venu le nom de Transient Receptor Potential. Mais ce n'est qu'en 1989 que le gène *trp* fut cloné pour la première fois (Montell and Rubin, 1989). Ces recherches ont permis de découvrir les premiers canaux TRP chez les mammifères appelés Transient Receptor Potential Canonical (TRPC), qui possèdent une homologie de séquence avec les canaux TRP découvert chez *Drosophila* (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995). Entre 1993 et 2003, six sous-familles de TRP furent découvertes, dont la famille TRPV (Vanilloïde) qui contient le membre le plus connu et étudié à ce jour, TRPV1 (Figure 4) (Caterina et al., 1997).





**Figure 4.** *Arbre phylogénétique des TRP.* TRPC1, l'un des sept membres de la famille des TRPC, fut le premier TRP découvert chez les mammifères. Depuis, cinq autres familles ont été découvertes : TRPV, TRPM, TRPA (ou ANKTM1), TRPP et TRPML (Clapham, 2003).

### 2.1.2 Les sous-familles de TRP

La famille des TRP est constituée de nombreux canaux cationiques non sélectifs enchâssés dans les membranes de types cellulaires différents, ayant des fonctions très diverses et variées. Cette famille est composée de 28 canaux différents répartis dans sept sous-familles : TRPC canonique, TRPV vanilloïde, TRPM melastatine, TRPP polycystine, TRPML mucolipine, TRPA ankyrine, et TRPN nompC (NO mechanoreceptor potential C), mais cette dernière sous-famille n'est pas présente chez les mammifères.

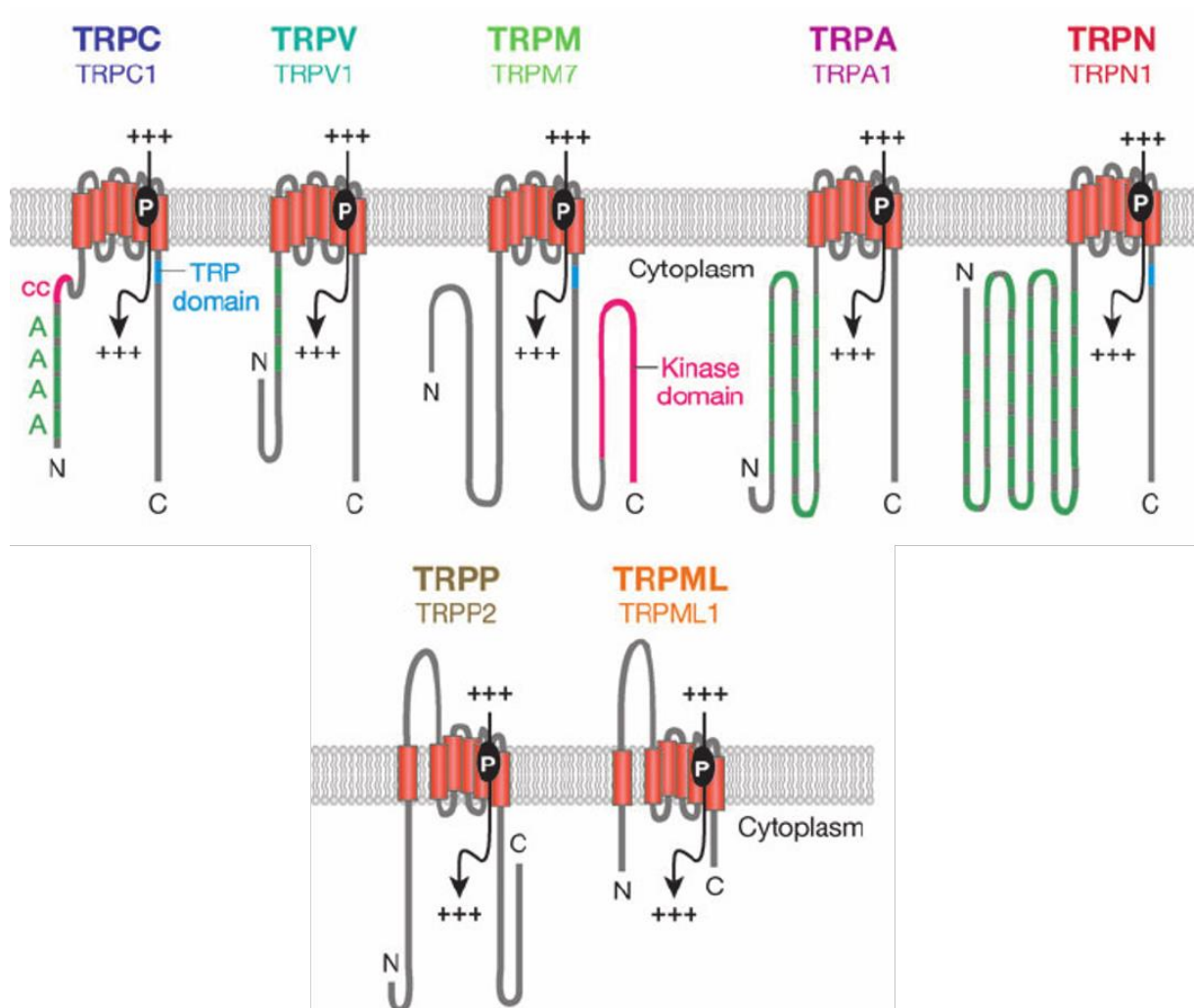
### 2.1.2.1 Structure générale des TRP

Tous les canaux TRP partagent des caractéristiques communes (Figure 5). Ils possèdent une structure quaternaire tétramérique et chaque monomère est composé de six segments transmembranaires (TM) (S1 à S6), avec les extrémités N- et C-terminales dans le cytoplasme. Le pore du canal, est situé entre les segments transmembranaires S5 et S6, et laisse entrer dans le cytoplasme des cellules, de manière non-sélective, des cations, notamment du calcium et du sodium, avec une perméabilité  $P_{Ca}/P_{Na}$  variant de 0,3 à 10 (Vassort and Fauconnier, 2008). De part cette structure, les canaux TRP font partis de la superfamille des canaux ioniques à six domaines TM, qui inclue les canaux  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  voltage-dépendant. L'extrémité C-terminale cytoplasmique est reliée à la partie inférieure du pore et permet la régulation de l'entrée des cations. Sur l'extrémité C-terminale et suivant directement le segment S6, on retrouve une séquence de 25 acides aminés conservée chez tous les canaux TRP appelée domaine TRP (excepté les sous-familles TRPA et TRPP). Ce domaine contient une séquence de 6 acides aminés appelée TRP box (EWKFAR chez les TRPC, moins conservé chez les autres membres de la famille TRP), ainsi qu'une région riche en proline appelée TRP box 2 (Clapham, 2003; Venkatachalam and Montell, 2007). Ce domaine est nécessaire à la liaison du PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), un lipide polaire ubiquitaire et régulateur du transport et de la fonction des canaux. Ce lipide induit l'activation de certains TRP (TRPV5, TRPM5, TRPM7, TRPM8) mais son rôle chez TRPV1 reste controversé (Huang et al., 2006; Ramsey et al., 2006).

Des domaines d'interactions avec la calmoduline (CaM) sont présents chez un grand nombre de canaux TRP (dont notamment les canaux TRPV1, 3 et 4). La CaM est une protéine avec une grande affinité pour les ions calcium, et le complexe CaM/ $Ca^{2+}$  induit la désensibilisation des canaux TRP suite à leur activation (Chaudhury et al., 2011; Rosenbaum et al., 2004). Enfin, les canaux TRPC et TRPV possèdent entre quatre et six domaines ankyrine répétés en N-terminal. TRPA1 contient également des domaines ankyrine répétés au nombre de 14, ainsi que les membres de la sous-famille TRPN qui en possèdent entre 17 et 29. Ces domaines permettent aux canaux d'interagir avec le cytosquelette et d'autres protéines impliquées dans leur régulation (Gaudet, 2008).

Malgré ces caractéristiques communes, les canaux TRP sont toutefois classés dans sept sous-familles différentes selon leur homologie de séquence, et non pas selon leur fonction ou sélectivité comme la plupart des canaux. Les canaux TRP peuvent être activés par divers

moyens et ont des fonctions très différentes les uns des autres, même au sein d'une même sous-famille.



**Figure 5.** *La superfamille des TRP.* Schéma représentant un membre de chaque sous-famille. Les domaines suivants sont indiqués : A, domaines ankyrine répétés ; cc, domaines coiled-coil ; domaine TRP ; domaines kinases. Les domaines transmembranaires sont représentés par des rectangles orange, P représente le pore du canal et (+++) le flux de cations (Venkatachalam and Montell, 2007).

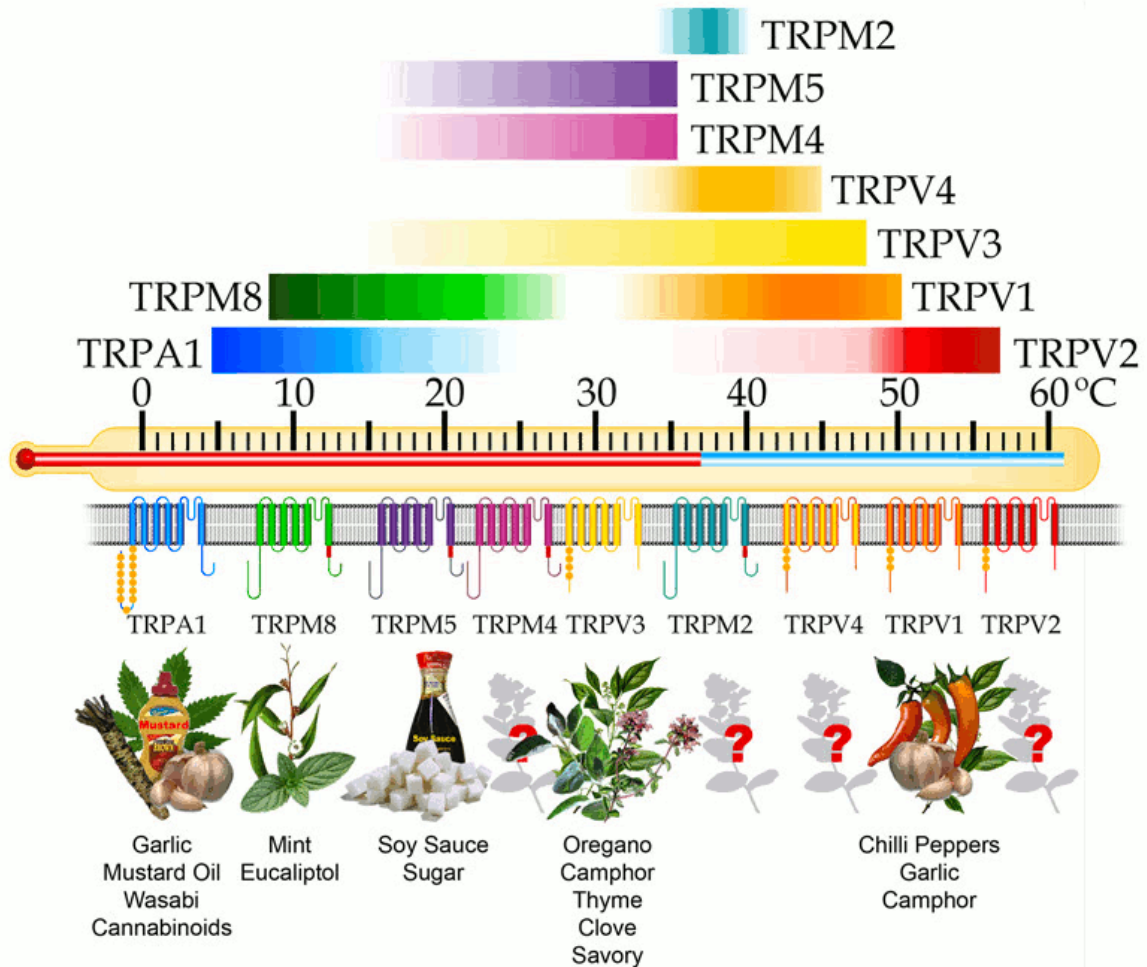
### 2.1.2.2 TRPC (Canonique)

Tous les canaux TRPC semblent être analogues au TRP découvert chez la drosophile, avec 30 à 40% d'homologie et ont en commun la séquence EWKFAR, comme présenté

précédemment. Au sein de cette famille, les canaux TRPC sont divisés en trois groupes : TRPC1/4/5, TRPC3/6/7 et TRPC2. Néanmoins, pour certains auteurs, TRPC1, qui fut le premier TRP découvert chez les mammifères (Wes et al., 1995), forme un 4<sup>ème</sup> groupe même si ce canal a la capacité de former des hétérotétramères avec TRPC4 et TRPC5. Les membres de cette sous-famille sont activés par des ligands, la phospholipase C (PLC), le diacylglycérol (DAG), la diminution du stock de calcium du réticulum endoplasmique et l'étirement membranaire (Venkatachalam and Montell, 2007a). TRPC1/4/5 sont tous trois exprimés dans le cerveau. Le canal TRPC5, mais pas TRPC1, est présent dans les cônes de croissance hippocampaux et module l'extension des neurites. Le canal TRPC4, qui est également exprimé dans l'endothélium, est important dans la vasorégulation et la perméabilité microvasculaire des poumons (Clapham, 2003). Les canaux TRPC3/6/7 sont identiques à 75% et sont exprimés dans les cellules des muscles cardiaques et lisses. Ces canaux joueraient un rôle dans les fonctions cardiaques, la résistance des voies aériennes et le tonus vasculaire. TRPC6, par exemple, est un élément important à l'activation de l'adrénorécepteur  $\alpha 1$ , un récepteur largement distribué dans le système vasculaire et qui joue un rôle central dans le contrôle de la pression sanguine, via les nerfs sympathiques (Inoue et al., 2001). TRPC2 en revanche, est considéré comme un pseudogène chez l'homme, n'étant présent que sous une forme tronquée, mais est fonctionnel chez les rongeurs.

#### 2.1.2.3 *TRPV (Vanilloïde)*

Cette sous-famille est composée de six membres, divisés en deux groupes : TRPV1-4, appelés aussi thermo-TRP et qui sont donc sensibles à la température (Figure 6), et TRPV5 et TRPV6.

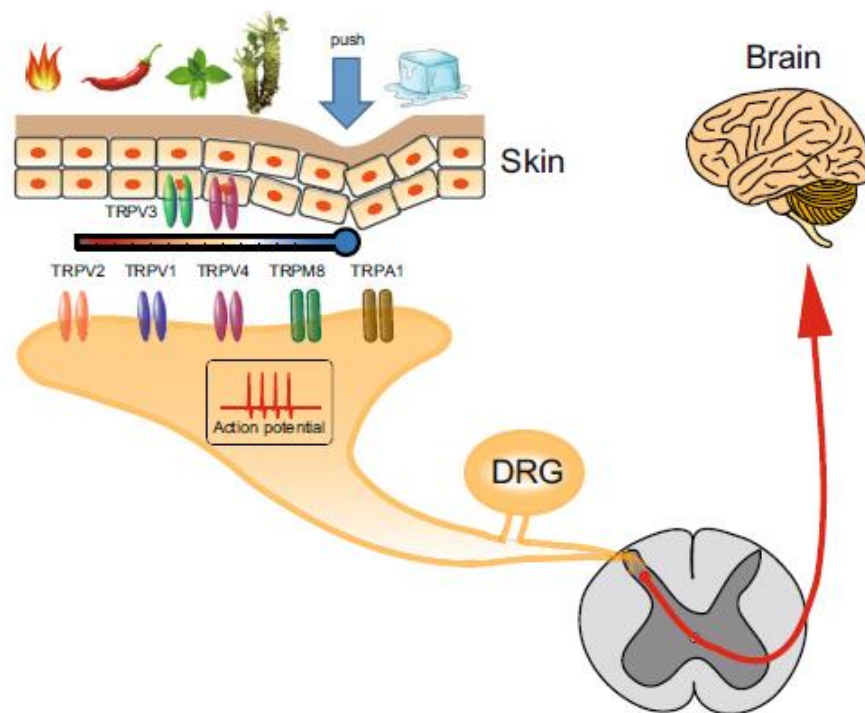


**Figure 6.** Représentation schématique des plages de températures auxquelles sont sensibles les différents thermoTRPs<sup>3</sup>. Certains composés naturels sont également connus pour activer certains canaux, produisant par exemple une sensation de chaleur ou de froid.

TRPV1 est le membre le plus connu et le plus étudié de tous les TRP. Il est avant tout exprimé dans les terminaisons nerveuses de fibres sensorielles lentes, mais aussi dans les kératinocytes de la peau, dans l'urothélium de la vessie, dans les systèmes cardiovasculaire et respiratoire, et dans de nombreux autres tissus dans lesquels il joue un rôle important. TRPV1 est sensible à des températures supérieures à 43 °C et à la capsaïcine (CAPS), la molécule responsable de la sensation de chaleur dans le piment (Caterina et al., 1997). Certains canaux

<sup>3</sup> <https://rxisk.org/ion-channels/>

TRP (TRPV1/2/3/4, TRPM8 et TRPA1) sont connus pour agir au niveau de la thermorégulation et de la nociception, c'est-à-dire dans la détection de conditions nocives pour l'organisme, notamment provoquées par des agents chimiques, des températures nocives ou par une inflammation. Dans le cas de TRPV1, la CAPS, une température élevée, un pH faible, ou les molécules sécrétées durant l'inflammation, vont entraîner l'activation du canal, ce qui va provoquer une dépolarisation de la membrane des neurones dans lesquels TRPV1 est exprimé et déclencher un potentiel d'action. L'information traitée par le cerveau va finalement induire une sensation douloureuse (Figure 7) (Dai, 2016). Les caractéristiques du canal TRPV1 et son implication dans la détection de conditions nocives font de lui une des plus importantes cibles thérapeutiques dans le traitement contre la douleur (Kaneko and Szallasi, 2014; Vay et al., 2012). La structure et les différents modes d'activation et de régulation du canal TRPV1 seront exposés plus en détail dans le chapitre 2.1.3.



**Figure 7.** Les TRP et la nociception. L'évènement nocif induit l'activation des canaux TRP correspondant ce qui provoque une dépolarisation de la membrane et la formation d'un potentiel d'action. L'information est envoyée au cerveau et traitée, et se traduit par une sensation de douleur (Dai, 2016).

TRPV2 possède 50 % d'homologie de séquence avec TRPV1 et est sensible aux températures supérieures à 52 °C, au 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate), et à l'étirement mécanique. Il est exprimé également dans les neurones du système nerveux central (Ramsey et al., 2006), et est activé dans les neurones du DRG (Dorsal Root Ganglia) suite à une inflammation, ce qui montre que ce canal est, comme TRPV1, impliqué dans la perception de la douleur (Figure 7). TRPV2 joue aussi beaucoup d'autres rôles, notamment au niveau des muscles cardiaques où il est très fortement exprimé et activé par un étirement mécanique, ainsi que dans le pancréas où il agit sur la sécrétion d'insuline (Perálvarez-Marín et al., 2013). TRPV2 est enfin impliqué dans le système immunitaire, où la fonction des macrophages est affectée suite à un KO du canal (Perálvarez-Marín et al., 2013).

TRPV3 et TRPV4 sont sensibles à des températures plus physiologiques. TRPV3 est activé pour des températures supérieures à 31 °C, et TRPV4 pour des températures supérieures à 25 °C (Clapham, 2003). TRPV3 peut également être activé par différents composés chimiques naturels : thym, carvacrol, eugénol, et non-naturels tel le 2-APB. TRPV4 quant à lui, est activé par le 4  $\alpha$ -PDD (4 $\alpha$ -Phorbol 12,13-didecanoate), mais est insensible au 2-APB contrairement aux TRPV1/2/3 (Hu et al., 2004). TRPV4 répond également à un stress hypotonique dû à la production d'eicosanoïde 5',6'-époxyeicosatriénoïque, dépendante du gonflement (Vriens et al., 2004; Watanabe et al., 2003). TRPV3 et TRPV4 sont exprimés de manière prédominante dans les kératinocytes de la peau, et leur sensibilité à la chaleur laisse penser que tous deux jouent un rôle dans la thermosensation (Chung et al., 2004), et sont impliqués dans la nociception (Figure 7) (Dai, 2016). TRPV3 est également exprimé dans la langue et le système nerveux. TRPV4 joue aussi un rôle dans la mécano-sensation, et dans l'ouïe (Vay et al., 2012). Enfin, comme pour TRPV1, l'activité de ces deux canaux peut être régulée par leur interaction avec la CaM (Phelps et al., 2010).

TRPV5 et TRPV6 sont identiques à 74 % et contrairement aux autres membres de leur sous-famille, ne sont pas considérés comme des thermo-TRP. Ces canaux sont également perméables au Ca<sup>2+</sup>, mais si TRPV1 et TRPV4 ne laissent entrer des ions calcium qu'en faible quantité ( $P_{Ca}/P_{Na} \sim 10-20$ ), TRPV5 et TRPV6 présentent un ratio  $P_{Ca}/P_{Na} > 100$ . Ces deux canaux sont grandement exprimés dans les reins, et sont régulés par une inactivation calcium-dépendante, via la CaM (Ramsey et al., 2006). TRPV5 et TRPV6 peuvent également être inactivés par le Mg<sup>2+</sup>, qui a la capacité de se lier aux résidus aspartate situés dans le pore de ces canaux, et de bloquer l'ouverture (Vassort and Fauconnier, 2008).

#### 2.1.2.4 TRPM (*Melastatine*) et TRPA (*Ankyrine*)

La sous-famille TRPM est composée de huit membres ayant des fonctions très diversifiées. TRPM1 est le premier membre découvert et est considéré comme un marqueur pronostique de métastases dans les mélanomes. En revanche, son activité n'a pas réellement encore été décrite. TRPM2 répond au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et au TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et agirait comme un senseur du potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire (Hara et al., 2002), alors que TRPM3 est sensible à l'hypotonicité. Si TRPM2 et TRPM3 sont tous deux perméables au Ca<sup>2+</sup>, ce n'est pas le cas de TRPM4 et TRPM5 qui sont les deux seuls canaux de la famille des TRP à n'être perméable qu'aux cations monovalents, et sont activés par le Ca<sup>2+</sup> (Hofmann et al., 2003; Launay et al., 2002). TRPM6 et TRPM7 sont uniques puisqu'ils possèdent des domaines kinases fonctionnels en plus de leur fonction de canal. TRPM7 permet la régulation de l'homéostasie des ions Mg<sup>2+</sup>, alors que TRPM6 est important dans l'absorption des ions Mg<sup>2+</sup> dans les reins et l'intestin (Clapham, 2003). TRPM8 et TRPA1 font eux aussi parti des thermo-TRP (Figure 6 et Figure 7). Mais contrairement à ceux déjà présentés, ces deux canaux sont sensibles au froid. TRPM8, connu aussi pour être le récepteur au menthol, s'active à des températures comprises entre 8 et 28 °C, et est notamment exprimé dans les neurones sensoriels (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). TRPA1 est le seul membre de la sous-famille des TRP ankyrine. Il a la particularité de posséder 14 domaines ankyrine répétés (ARD, pour Ankyrin Repeated Domain) dans l'extrémité N-terminal, ce qui est bien plus que chez les autres canaux TRP exprimés chez les mammifères. Il est activé par des températures froides (<15 °C) et est exprimé dans les neurones sensoriels du DRG.

#### 2.1.2.5 TRPP (*Polycystine*)

Dans ce groupe, seuls TRPP2, TRPP3 et TRPP5, aussi appelés PKD2, PKD2L1 et PKD2L2 respectivement, sont considérés comme des canaux composés de six domaines TM. TRPP1 est un cas particulier. En effet, il est composé de onze domaines TM, mais possède une extrémité C-terminale composée de six domaines TM. Seul, TRPP1 n'est pas considéré comme un canal TRP, mais en association avec TRPP2, il forme un canal cationique non-sélectif (Hanaoka et al., 2000). Les mutations de TRPP1 et TRPP2 sont responsables de la maladie polykystique rénale. Ils sont également importants dans le développement corporel normal (cœur, muscles squelettiques, et reins) et dans les mouvements ciliaires (Nauli et al., 2003).



TRPP3 est impliqué dans le développement de la rétine et des poils. TRPP5 est exprimé dans les testicules de souris et sa surexpression dans les cellules Hela induit l'arrêt de la prolifération cellulaire et induit l'apoptose (Xiao et al., 2010). Néanmoins, l'activité et le rôle de ce canal restent très peu connus.

#### 2.1.2.6 *TRPML (Mucolipine)*

Cette sous-famille est composée de trois membres (TRPML1-3) dont l'expression semble être restreinte aux vésicules intracellulaires. Des mutations de TRPML1 sont associées à la mucopolidose de type IV, un trouble de stockage lysosomal neurodégénératif. TRPML3 est dans le cytoplasme de cellules des cheveux et dans la membrane plasmique des stéréociles. La fonction de TRPML2 n'est pas connue.

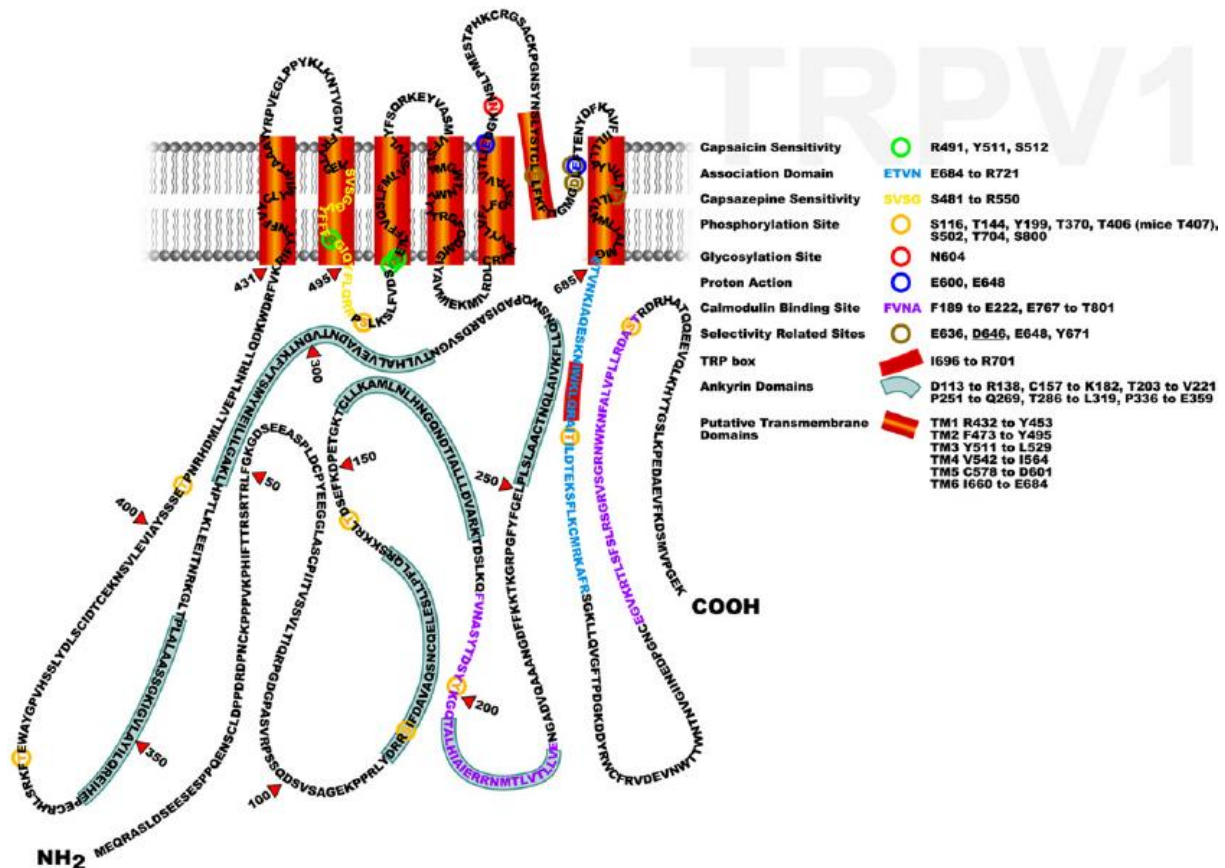
#### 2.1.2.7 *TRPN (nompC)*

Les TRPN sont caractérisés par la présence de 29 ARD dans le domaine N-terminal. Ce sont des canaux mécano-transducteurs impliqués dans l'audition chez les vers, mouches et le poisson zèbre, mais ne sont pas représentés chez les mammifères (Vassort and Fauconnier, 2008).

### **2.1.3 Structure et régulation détaillée de TRPV1**

#### 2.1.3.1 *Structure détaillée de TRPV1*

Le canal TRPV1 est une protéine de 838 résidus acides aminés (Caterina et al., 1997) qui, comme tous les membres des canaux TRP, possède les extrémités N- et C-terminales cytoplasmique, et est composé de six domaines transmembranaires (S1 à S6), le pore du canal étant situé entre les segments S5 et S6 (Figure 8).



**Figure 8.** Modèle de la structure détaillée du canal TRPV1. TRPV1 est une protéine de 838 acides aminés, contenant un long domaine N-terminal, six domaines transmembranaires S1 à S6, un module S1-S4 voltage-dépendant, un module pore S5-S6, et un domaine C-terminal. (Latorre et al., 2007).

TRPV1 possède un long domaine N-terminal de 432 acides aminés qui est caractérisé par la présence de six ARD entre les résidus S101 et H364 (entre D113 et E359 selon Latorre *et al.*, 2007) (Latorre et al., 2007; Lishko et al., 2007). Les domaines ARD sont connus pour interagir avec un grand nombre de protéines et sont capables de lier l'ATP (Adénosine Triphosphate). Lishko et al. ont déterminé l'importance des résidus R115, K155, K160, L163, Y199, Q202 et E210 dans l'interaction avec l'ATP, laquelle est importante pour l'activation de TRPV1. Une mutation dans le domaine de liaison à l'ATP affecte la réponse de TRPV1 à la CAPS (Lishko et al., 2007). Une interaction entre la CaM et les ARD a également été mise en évidence, au niveau de la même région liant l'ATP, entre les résidus F189 et E222, suggérant une compétition pour la fixation à TRPV1 (Lishko et al., 2007; Rosenbaum et al., 2004). Il a par ailleurs été démontré que les domaines ARD déterminent l'assemblage en homo ou

hétérotétramère de TRPV5 et TRPV6, mais pas pour TRPV1 (Latorre et al., 2007). Le domaine N-terminal contient aussi de nombreux sites de phosphorylation important dans la régulation positive et négative de TRPV1. La régulation de TRPV1 par les protéines kinases sera détaillée dans la partie 2.1.3.2.4.

Les six domaines transmembranaires de TRPV1 sont situés entre les résidus R432 et E684 (S1 : R432-Y453, S2 : F473-Y495, S3 : Y511-L529, S4 : V542-I564, S5 : C578-D601, S6 : I660-E684). Chez les canaux Kv (canaux potassiques voltage-dépendant), la dépendance au voltage est due à une série d'acides aminés chargés positivement localisés dans le domaine transmembranaire S4. Ces charges positives sont sensibles au champ électrique à travers la membrane plasmique et bougent en réponse à la force exercée par ce champ. Si les canaux TRPV1 ont la capacité à répondre au voltage, leur sensibilité est très faible par rapport aux canaux Kv et d'autres canaux voltage-dépendant. Cela est probablement dû à l'absence d'acides aminés chargés positivement dans le domaine S4 (Zheng, 2013). Les domaines S2 et S3 contiennent les sites de fixation de la CAPS, l'agoniste de TRPV1, mais aussi ceux de l'antagoniste CPZ. Les résidus R491, Y511 et S512 sont impliqués dans l'interaction avec la CAPS, alors que la séquence entre les résidus 480 et 550 est nécessaire pour la fixation de la CPZ (Jordt and Julius, 2002). Le pore du canal est situé entre les domaines S5 et S6 et est très conservé parmi les canaux TRPV. TRPV1 est un canal cationique non sélectif, mais possède une préférence pour les cations divalents, et notamment le  $\text{Ca}^{2+}$ , avec un  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  d'environ 10, et un  $P_{\text{Mg}}/P_{\text{Na}}$  d'environ 5. Un site de glycosylation au niveau de l'acide aminé E604, ainsi que d'autres résidus dans le pore du canal, ont pu être déterminés, jouant un rôle dans la sensibilisation au pH du canal en réponse à la CAPS, la sensibilisation à la CAPS ou dans la modification de la sélectivité du  $\text{Ca}^{2+}$  (Latorre et al., 2007; Wirkner et al., 2005). Certains résidus dans le pore du canal seraient important dans la sensibilisation à la température (Grandl et al., 2010). D'autres études ont montré qu'une séquence de 24 acides aminés entre le S5 et la boucle du pore était impliquée dans l'activation de TRPV1 par la chaleur (Yang et al., 2010).

Le domaine C-terminal, enfin, est situé entre les résidus T685 et K838. Il contient une séquence de 25 acides aminés hautement conservée chez tous les TRP (mis à part les sous-familles TRPA et TRPP) appelée domaine TRP. Ce domaine comprend une région de 6 acides aminés appelée TRP box (IWKLQR chez TRPV1). Un motif coiled-coil entre les résidus E684 et R721 chevauchant le TRP box a été identifié comme un domaine nécessaire à la tétramérisation de TRPV1. L'extrémité C-terminale comporterait également un domaine de

sensibilité à la chaleur. La délétion d'une partie de l'extrémité C-terminale diminue le seuil de sensibilité à la chaleur (Vlachová et al., 2003). De plus, l'échange des domaines C-terminaux entre TRPV1 et TRPM8 inverse leur sensibilité à la température (Brauchi, 2006). Comme dans l'extrémité N-terminal, l'extrémité C-terminale contient un domaine d'interaction avec la CaM, entre les résidus 767 et 801. L'interaction de TRPV1 avec la CaM est dépendante du  $Ca^{2+}$  et est importante pour la désensibilisation du canal suite à son activation par les différents modes d'activation (Numazaki et al., 2003). L'extrémité C-terminale possède elle aussi des sites de phosphorylation nécessaire à la sensibilisation de TRPV1 et un domaine d'interaction avec le PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), un inhibiteur de la fonction du canal (Chuang et al., 2001; Huang et al., 2006; Ramsey et al., 2006) (voir la partie 2.1.3.2.4).

### 2.1.3.2 *Régulation de TRPV1*

L'ouverture du canal est étroitement régulée par divers facteurs physiques et par l'interaction de TRPV1 avec des partenaires protéiques.

#### 2.1.3.2.1 Température

TRPV1 est sensible à des températures nociceptives et possède un seuil d'activation déterminé à 43 °C. Le terme de seuil est utilisé pour définir une température pour laquelle le courant de calcium entrant dans la cellule via TRPV1 est suffisant pour déclencher un potentiel d'action dans une fibre nerveuse afférente. La notion de seuil n'est toutefois pas toujours applicable à TRPV1. L'augmentation de température augmente la probabilité d'ouverture du canal mais ce dernier peut être activé en dessous de 43 °C dans certaines conditions. Ce seuil d'activation peut en effet être abaissé notamment par l'action de médiateurs proinflammatoires libérés lors de blessures ou d'inflammation, tel que la PKC, qui phosphoryle les résidus S502 et S800 (Huang et al., 2006; Vay et al., 2012).

#### 2.1.3.2.2 pH

Une diminution du pH dans un tissu suite à une infection ou une inflammation peut engendrer une douleur chez les mammifères, ce qui a permis à Caterina et al. (1997) de proposer les protons comme possible activateurs de TRPV1. Il a été montré qu'une acidification du

milieu extracellulaire (diminution du pH de 7.6 à 6.3) augmentait le courant ionique suite à une activation de TRPV1 par la CAPS. En revanche, les protons seuls ne suffisent pas à une activation du canal (Caterina et al., 1997). D'autres études ont permis de démontrer l'importance de certains résidus, E600 et E648, dans la régulation de la potentialisation de TRPV1 en milieu acide (Jordt et al., 2000).

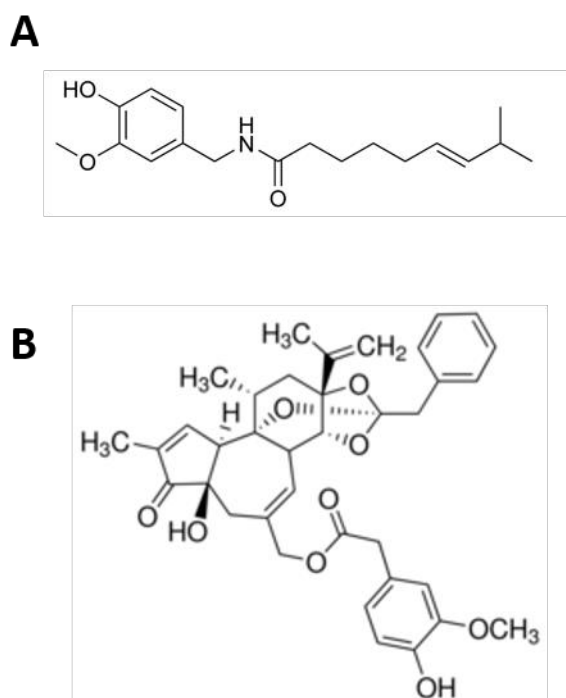
#### 2.1.3.2.3 Molécules chimiques

##### 2.1.3.2.3.1 Agonistes

TRPV1 peut être activé par un grand nombre de composés naturels présents dans notre alimentation parmi lesquels la famille des capsaïcinoïdes, composée de la capsaïcine (composant actif du piment), la pipérine (issue du poivre noir), et l'eugénol (issue du clou de girofle). TRPV1 peut également être activé par la résinifératoxine, une toxine provenant de la plante *Euphorbia resinifera*, analogue de la capsaïcine (Vennekens et al., 2008).

La capsaïcine (CAPS, Figure 9A), N-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl]-8-methyl-6-nonenamide, est l'agoniste le plus connu de TRPV1. La CAPS est composée d'un noyau aromatique vanillé hydrogéné couplé à une liaison amide ou ester lié à un groupe lipophile. Ce dernier groupe va lier TRPV1 au niveau des domaines transmembranaires S2 et S3 sur les résidus R491, Y511 et S512 (Jordt and Julius, 2002). L'interaction entre la CAPS et TRPV1 va entraîner l'ouverture du canal et provoquer un courant calcique entrant. Tout comme lors d'une activation par la température, la Protéine Kinase C (PKC) phosphoryle les résidus S502 et S800 et potentialise la probabilité d'ouverture du canal induite par la CAPS (Huang et al., 2006; Vay et al., 2012). Une activation prolongée ou répétée par la CAPS entraîne une désensibilisation de TRPV1, et donc une diminution de la sensibilité à la chaleur. Cette méthode est utilisée dans les traitements contre la douleur (Vay et al., 2012).

La résinifératoxine (RTX) (Figure 9B), formée de 4 unités d'isoprène, est un analogue de la CAPS, mais est 3 à 4 fois plus puissante (Szallasi and Blumberg, 1989). Tout comme la CAPS, la RTX est utilisée dans les traitements contre la douleur.



**Figure 9.** Structure chimique des principaux agonistes de TRPV1. (A) Structure de la Capsaïcine. (B) Structure de la résinifératoxine.

#### 2.1.3.2.3.2 Antagonistes

Le canal TRPV1 peut être inhibé par différents antagonistes naturels ou synthétiques.

Il existe plusieurs inhibiteurs naturels de TRPV1. La thapsigargine provient de la plante *Thapsia garganica*. Si ce composé a la capacité d'inhiber TRPV1, cet antagoniste possède une plus grande affinité pour les pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) (Vennekens et al., 2008). La yohimbine, qui provient de l'arbre *Pausinystalia yohimbe* et de la racine *Rauwolfia* était initialement identifiée comme un aphrodisiaque, puis utilisée dans les traitements contre les dysfonctionnements érectiles. Il a également été montré que ce composé avait la capacité d'inhiber les canaux  $\text{Na}^+$  et TRPV1 (Vennekens et al., 2008). Un effet inhibiteur puissant est aussi retrouvé dans le venin de l'araignée *Agelenopsis aperta*, qui est, entre autre, composé de deux toxines inhibant le canal en se liant sur la partie extracellulaire (Vennekens et al., 2008).

Il existe plusieurs antagonistes compétitifs synthétiques de TRPV1, notamment la capsazépine, la 5-iodorésinifératoxine (5-iodoRTX), et l'AMG 517. Un antagoniste compétitif

se fixe sur les mêmes sites que les agonistes et bloque le canal dans un état fermé et non perméable aux cations.

La capsazépine, identifiée par Sandoz (Novartis aujourd'hui), est un inhibiteur de l'activation de TRPV1 induite par la CAPS et la température chez l'homme et se fixe entre les résidus S481 et R550, un domaine qui recouvre les sites de fixation de l'agoniste (Figure 10A) (Latorre et al., 2007). La composition chimique de la CPZ est analogue à celle de la CAPS, à la différence près qu'un groupement thio-urée a remplacé l'urée présente chez la CAPS. En revanche, la CPZ présente une faible stabilité métabolique et des propriétés pharmacocinétiques diminuées chez le rongeur, ce qui a empêché son développement clinique (Messeguer et al., 2006; Walker, 2003).

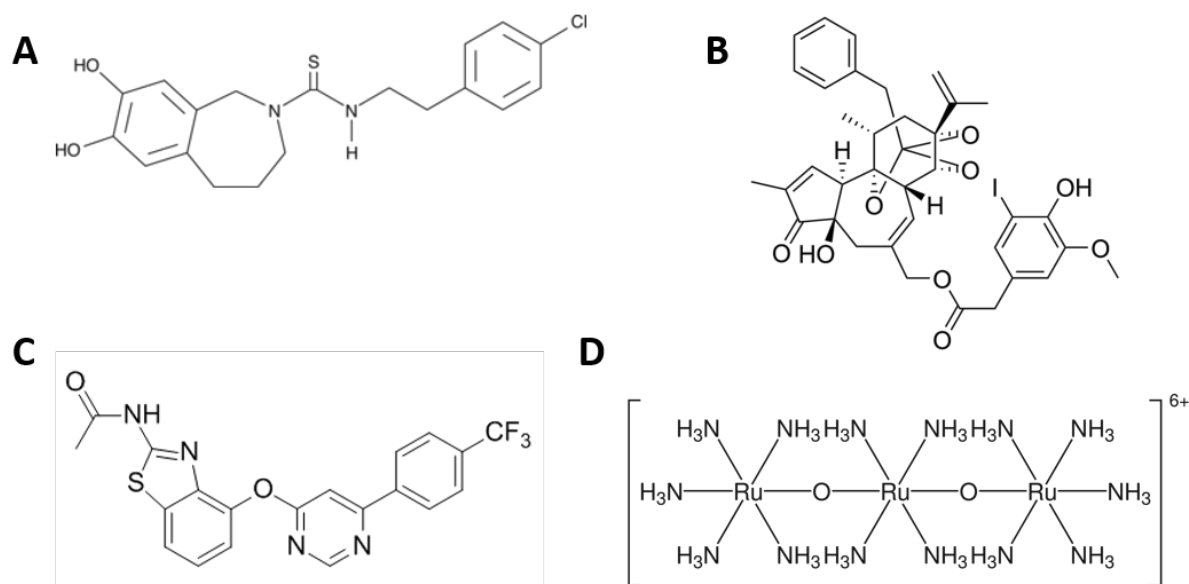
La 5-iodoRTX est un analogue de la RTX où un atome d'iode a été ajouté sur le groupement vanillyl, modifiant l'activité pharmacologique de la RTX en un antagoniste de TRPV1 (Figure 10B). En 2006, ce composé faisait l'objet d'études cliniques mais la complexité de la structure chimique et le coût de synthèse ont représenté des inconvénients majeurs (Messeguer et al., 2006).

Enfin, l'AMG 517 inhibe l'activation du canal par la température, le pH et différents agonistes dont la CAPS, et agit comme un antihyperalgésique (Figure 10C). Un traitement par l'AMG 517 entraîne cependant une légère hyperthermie, qui disparaît avec la répétition du traitement, ou par l'application d'acétaminophène, un antipyrétique (Gavva et al., 2007).

Il existe aussi des antagonistes non-compétitifs de TRPV1 qui vont se fixer sur des domaines différents de ceux des agonistes et vont empêcher l'ouverture du canal. Le Ruthénium Red (RuR) fut le premier antagoniste non-compétitif découvert et le seul pendant plusieurs années (Figure 10D). Il s'agit d'un complexe polyamine trinuécléaire possédant une forte puissance inhibitrice, mais produisant des effets secondaires *in vivo* et ayant une toxicité importante, empêchant ce composé d'être développé en clinique (Fernández-Carvajal et al., 2015; Messeguer et al., 2006).

Les inhibiteurs incompétitifs représentent une 3<sup>ème</sup> classe d'inhibiteurs. Ils n'agissent que sur le complexe enzyme/substrat, donc, dans le cas de TRPV1, lorsque le canal lie la CAPS ou de manière générale, lorsqu'il est activé et en position ouverte. Ces inhibiteurs sont particulièrement attractifs puisqu'ils vont cibler préférentiellement les canaux suractivés et ne reconnaissent que faiblement les canaux physiologiquement actifs. Récemment, la Triazine

8aA a été découverte. Ce composé a la capacité de bloquer TRPV1 de façon voltage-dépendante et agit lorsque le potentiel membranaire est négatif, une caractéristique des inhibiteurs de canaux ouverts. La Triazine 8aA est prometteuse pour un développement thérapeutique (Fernández-Carvajal et al., 2015).



**Figure 10.** Structure chimique des principaux antagonistes de TRPV1. (A) Capsazépine. (B) 5-iodorésinifératoxine. (C) AMG517. (D) Ruthénium red.

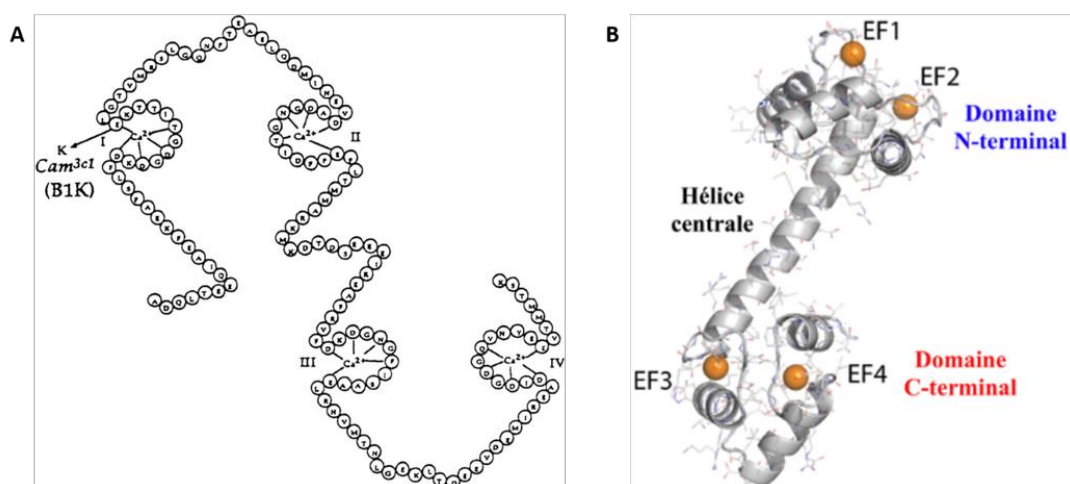
#### 2.1.3.2.4 Autres molécules

TRPV1 contient de nombreux sites de phosphorylation importants dans sa régulation positive et négative. Ainsi, la Protéine Kinase A (PKA) phosphoryle TRPV1 au niveau de six résidus, dont les résidus S116, T144, T370 et S502 qui sont impliqués dans la sensibilisation de TRPV1 à la chaleur (Bhave et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2003). La PKC phosphoryle TRPV1 sur les résidus S502 et S800. Une mutation en alanine de ces deux résidus entraîne la perte de l'activité de TRPV1 induite par la chaleur, la CAPS et le pH (Bhave et al., 2003). La phosphorylation de TRPV1 par la PKA et la PKC n'est rendue possible que par la A-Kinase Anchoring Protein 79/150 (AKAP79/150, avec AKAP79 exprimé chez l'homme et AKAP150 chez les rongeurs). En effet, AKAP possède à la fois des domaines de fixation de la PKA et PKC, d'une part, et la capacité de lier TRPV1 d'autre part. La protéine AKAP 79/150 permet donc la phosphorylation du canal en permettant le rapprochement entre TRPV1 et les deux



kinases, PKA et PKC. Cette phosphorylation sensibilise TRPV1 à la CAPS et la température (Jeske et al., 2008, 2009).

L'ouverture du pore du canal provoque une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , qui est captée par la CaM. La CaM (Figure 11) est une protéine ubiquitaire très conservée de 15 kDa et présente dans de nombreux organismes (animaux, plantes, champignons, protozoaires). La CaM agit comme un transducteur de signal calcique dans les cellules de mammifères. Cette protéine est capable de lier les ions calcium libres grâce à quatre structures appelées « main EF », une paire de ce motif étant présent en N- et l'autre paire en C-terminal. Les deux paires de mains EF, structurées en hélice-boucle-hélice, sont reliées par un domaine central conformé en hélice  $\alpha$ . Les deux paires de mains EF ne présentent que 75 % d'homologie de séquence et cela se traduit par des affinités de liaisons du  $\text{Ca}^{2+}$  différentes. En effet, les mains EF en C-terminal possèdent une affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  10 fois plus importante ( $K_d = 0,2 \mu\text{M}$ ) que celles en N-terminal ( $K_d = 2 \mu\text{M}$ ) (Vetter and Leclerc, 2003). La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  provoque un changement de conformation de la CaM et permet au complexe CaM/ $\text{Ca}^{2+}$  de se lier à des domaines d'interaction sur d'autres protéines, modulant ainsi l'activité de ces protéines de manière  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante. La CaM interagit avec un grand nombre de protéines différentes, dont TRPV1. Sa liaison avec le canal au niveau du domaine N-terminal entre les résidus 189 et 222 et au niveau du domaine C-terminal entre les résidus 767 et 801 interfère avec et inhibe l'association entre AKAP 79/150 et TRPV1, provoquant la désensibilisation ou empêchant une re-sensibilisation de ce dernier. Ce mécanisme de rétrocontrôle permet aux canaux TRPV1 de ne pas être suractivés (Chaudhury et al., 2011; Rosenbaum et al., 2004).



**Figure 11.** *La calmoduline.* (A) Séquence peptidique de la calmoduline (Arredondo et al., 1998). (B) Vue 3D de la structure tertiaire de la calmoduline. Les deux paires de main EF aux

extrémités N- et C-terminales sont représentées avec un ion calcium (sphère jaune) fixé en leur centre (d'après K. Hines, Aldrich lab).

D'autres kinases comme la tyrosine-kinase Src jouent un rôle dans la modulation de TRPV1. La protéine Src, activée par le NGF (Nerve Growth Factor), phosphoryle le canal au niveau du résidu Y200, ce qui permet sa sensibilisation et son adressage à la membrane des neurones (Zhang et al., 2005).

Le PIP<sub>2</sub> a un effet direct et indirect sur la régulation du canal. L'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> par la PLC produit de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et du DAG, un puissant activateur de la PKC qui permet la sensibilisation de TRPV1, comme expliqué précédemment. Le PIP<sub>2</sub> peut également interagir avec TRPV1 au niveau de l'extrémité C-terminale, inhibant la fonction du canal. La PLC permet le décrochement du PIP<sub>2</sub> de TRPV1 et l'augmentation de la sensibilité du canal à la CAPS et à la chaleur. Ce mécanisme est supposé jouer un rôle essentiel dans la sensibilisation de TRPV1 par la bradykinine et le NGF, tous deux agissant via la PLC (Chuang et al., 2001; Huang et al., 2006; Zhang et al., 2005).

### 2.1.3.3 *Hypothèses et mécanismes d'ouverture du canal TRPV1*

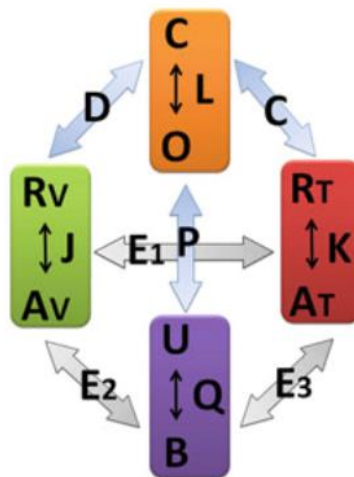
Tel qu'énoncé préalablement, TRPV1 peut être activé par différents stimuli dont notamment la température et le contact avec la CAPS. Les mécanismes menant à l'ouverture du canal ne sont toutefois pas encore complètement élucidés. Plusieurs modèles se sont succédés qui peuvent rendre compte des mécanismes moléculaires menant à l'ouverture des canaux thermoTRPs.

Dans un premier temps, l'équipe du Pr Nilius a fait plusieurs observations fondamentales en comparant l'ouverture des canaux TRPV1 (sensible à la chaleur) et TRPM8 (sensible au froid) :

- TRPV1, bien que structurellement lié aux canaux potassiques voltage-dépendant, n'est lui-même que peu sensible au voltage, dû à la faible présence de résidus chargés dans le domaine S4 (Zheng, 2013).

- un échauffement déplace la courbe de sensibilité de TRPV1 au potentiel membranaire, entraînant une plus grande probabilité d'ouverture des canaux TRPV1 au potentiel des membranes des cellules au repos (Voets et al., 2004).
- de manière analogue, les mêmes observations ont pu être réalisées pour TRPM8 mais dans le cas d'un refroidissement ou d'un traitement au menthol.

Ces différentes observations ont conduit l'équipe du Pr. Nilius à faire l'hypothèse d'un modèle à deux états (ouvert et fermé) où la fenêtre de sensibilité de TRPV1 et de TRPM8 au potentiel de membrane était déplacée par la température ou la liaison à l'agoniste (Voets et al., 2004). Ce modèle a été rapidement remis en question par plusieurs équipes qui lui opposent un modèle allostérique de l'ouverture des canaux TRPV1 et TRPM8 (Brauchi et al., 2004; Matta and Ahern, 2007). Dans ce modèle, les domaines senseurs du potentiel membranaire, de la température et des ligands chimiques (agonistes ou antagonistes) sont distincts et séparés dans la structure du canal. L'activation des différents capteurs (ligands, voltage et température) et l'ouverture du canal constituent quatre équilibres distincts à deux états qui interagissent de manière allostérique les uns avec les autres. Selon Matta et al, ces équilibres peuvent être représentés à l'aide d'un modèle multi-états (Figure 12) où l'ouverture des canaux TRPV1 et TRPM8 est régulée de manière synergique à la fois par des stimuli physiques, chimiques et thermiques (Matta and Ahern, 2007).



**Figure 12.** *Modèle de la régulation allostérique de l'activation des canaux TRPV1 et TRPM8.* Le modèle comprend une interaction allostérique entre l'ouverture du canal (décrite par la constante L régissant l'équilibre entre l'état fermé (C) et l'état ouvert (O) du canal), l'activation du canal par le voltage (décrite par la constante J régissant l'équilibre entre l'état de repos (R)

et l'état activé (A)), l'activation du capteur de température (décrite par la constante  $K$  régissant l'équilibre entre l'état de repos (R) et l'état activé (A)) et l'activation de l'agoniste (décrite par la constante  $Q$  régissant l'équilibre entre l'état non-lié (U) et l'état lié (B)).  $C$ ,  $D$  et  $P$  sont des facteurs allostériques ( $> 1$ ) couplant les équilibres sensibles à la température, au potentiel transmembranaire et à la liaison d'un agoniste, respectivement, avec l'ouverture des pores.  $E1$ ,  $E2$  et  $E3$  sont des facteurs allostériques qui interviennent dans l'interaction entre les différents équilibres dépendants de la température, du potentiel transmembranaire et de la liaison à l'agoniste.

Dans les canaux thermo-TRPs, le passage d'un état fermé à un état ouvert provoqué par un stimulus thermique est associé à des variations enthalpiques et entropiques importantes (Baez et al., 2014; Jara-Oseguera and Islas, 2013). Pour TRPV1,  $\Delta H \sim 150$  kcal / mol et  $T\Delta S \sim 140$  kcal / mol à 25 °C (Liu et al., 2003) ; et pour TRPM8  $\Delta H \sim -150$  kcal / mol, et  $T\Delta S \sim -113$  kcal / mol à 25 °C (Brauchi et al., 2004). Pour que la transition de l'état fermé à l'état ouvert soit favorisée, la variation d'enthalpie libre de la réaction ( $\Delta G_0$ ) doit être bien évidemment négative. Les niveaux très élevés de variation d'enthalpie et d'entropie mis en jeu dans le processus d'ouverture de TRPV1 et TRPM8 implique qu'il existe un réarrangement structural hautement dépendant de la température et impliquant la rupture de liaisons non covalentes. L'effet de la température dépend de fait du signe et de la grandeur de  $\Delta S$  et  $\Delta H$ . Le signe du changement d'entropie indique que, théoriquement, l'état ouvert du récepteur au froid TRPM8 est plus ordonné que l'état fermé. Le contraire est observable pour TRPV1 dont l'état ouvert est théoriquement plus désordonné que l'état fermé. Du fait que les variations d'entropie compensent les variations d'enthalpie lors de la transition de l'état fermé à l'état ouvert, que ce soit pour TRPV1 ou TRPM8, il résulte que les canaux thermo-TRPs présentent des valeurs de  $\Delta G_0$  relativement faibles. Ceci assure la réversibilité de la transition car le changement net d'énergie libre peut être facilement surmonté pour transiter entre chaque état.

Concernant TRPV1, ces modifications thermodynamiques reflètent différents processus moléculaires impliquant des domaines senseurs de la température chez TRPV1, localisés dans les extrémités N- et C-terminales, mais aussi dans les modules transmembranaires entre le S1 et S4, ou dans le module pore du canal (Brauchi, 2006; Vlachová et al., 2003; Yang et al., 2010). À l'aide de la dynamique moléculaire, Chugunov et al. ont pu montrer que seul le pore du canal subit des changements de conformation sous l'effet de la chaleur, mais pas les domaines

transmembranaires S1-S4, qui stabilisent la protéine dans la membrane (Chugunov et al., 2016). Néanmoins, leur étude n'est basée que sur une protéine TRPV1 incomplète en faisant abstraction des extrémités N- et C-terminales. On peut logiquement s'attendre à ce que, en plus de l'effet de la chaleur, l'interaction des différentes protéines avec TRPV1 nécessaire à son activation induise des changements de conformation au niveau des extrémités N- et C-terminales.

#### 2.1.3.4 *Adressage de TRPV1 à la membrane plasmique et recyclage*

Suite à une inflammation ou une stimulation avec un agoniste, le nombre de canaux TRPV1 à la surface cellulaire augmente, entraînant une sensibilité accrue des cellules aux stimuli nocifs, autrement appelé hyperalgésie (Zhang et al., 2005). Une augmentation de l'expression de TRPV1 à la membrane plasmique nécessite donc un transport du canal depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à la surface. Il a été montré qu'une population importante de TRPV1 était localisée dans des vésicules intracellulaires. TRPV1 interagit avec les protéines vésiculaires snapine et synaptotagmine IX, toutes deux interagissant avec les protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) et participent à l'exocytose  $Ca^{2+}$ -dépendante. L'interaction de TRPV1 avec ces protéines confirme la localisation du canal dans les vésicules et donc son adressage à la membrane plasmique (Planells-Cases et al., 2005). Xing et al. ont montré que la kinase Cdk5 (Cyclin-dépendant kinase 5) régule de manière positive la distribution de TRPV1 à la surface cellulaire. Cdk5 favorise le transport antérograde du canal, en permettant l'association du pull de TRPV1, contenu dans les vésicules, avec les protéines KIF13B (Kinesin-3 family member 13B). KIF13B est une protéine faisant partie de la famille des kinésines, des protéines capables d'interagir avec et de se déplacer le long des microtubules, une des structures majeures du cytosquelette impliquée dans le transport intracellulaire (Xing et al., 2012). Cette dernière protéine se charge de délivrer TRPV1 à la membrane plasmique. TRPV1 interagit également avec GABARAP ( $\gamma$ -amino butyric acid A-Type receptor associated protein) qui augmente l'expression du canal à la membrane plasmique. GABARAP favorise aussi l'interaction entre TRPV1 et la tubuline, la sous-unité des microtubules (Ferrandiz-Huertas et al., 2014).

Une activation prolongée de TRPV1 induit en revanche une internalisation du canal. Sanz-Salvador et al. (2012) ont montré que la CAPS induit de manière dose- et temps-

dépendant l'internalisation de TRPV1. Les canaux à la surface de la cellule sont ciblés pour une dégradation lysosomale, mais pas protéasomale. En effet, l'inhibition du protéasome par le MG132 n'empêche pas la dégradation de TRPV1. L'internalisation du canal se fait selon un mécanisme indépendant de la clathrine, et nécessite au préalable une entrée de  $Ca^{2+}$  via le pore du canal, mettant probablement en jeu la CaM, connue pour désensibiliser TRPV1 (Sanz-Salvador et al., 2012).

#### 2.1.3.5 *Implication de TRPV1 dans de nombreuses maladies*

Le tractus respiratoire chez les mammifères est densément innervé par des fibres sensorielles afférentes exprimant TRPV1. L'inhalation de CAPS provoque de multiples réflexes protecteurs chez l'homme, comme la toux, l'éternuement ou la sécrétion de fluides, et peut même provoquer des crises d'asthmes mortelles chez des patients asthmatiques (Kaneko and Szallasi, 2014). Trevisani et al. ont montré que les effets provoqués par le sulfure d'hydrogène, un gaz connu pour provoquer une irritation et des blessures dans les poumons suite à l'inhalation, étaient fortement diminués suite à un traitement avec la CPZ, ou une désensibilisation de TRPV1 par la CAPS (Trevisani et al., 2005). Les patients atteints de toux chronique présentent une augmentation de l'expression de TRPV1 dans les nerfs des voies respiratoires et sont beaucoup plus sensibles à l'inhalation de CAPS que les individus sains (Groneberg et al., 2004).

TRPV1 est également impliqué dans les troubles de la vessie. Le GRC6211, un antagoniste de TRPV1, diminue l'hyperactivité de la vessie induite par le LPS (lipopolysaccharide) chez le rat. En revanche, chez des patients ayant un dysfonctionnement urinaire, la CAPS permet d'augmenter la capacité de la vessie, diminuant ainsi l'envie d'uriner. La RTX est une alternative à la CAPS et possède l'avantage d'être moins douloureux et mieux supporté par les patients (Kaneko and Szallasi, 2014; Mistretta et al., 2014).

TRPV1 est aussi exprimé dans le tractus digestif où il joue un rôle dans le goût, la motilité gastro-intestinale, et possède des fonctions absorbatives et sécrétoires. Une augmentation de l'expression de la protéine a été observée dans différentes maladies telles que le reflux gastro-œsophagien et le syndrome de l'intestin irritable (Kaneko and Szallasi, 2014).

TRPV1 est fortement exprimé dans les nerfs sensoriels innervant la peau et une inhibition du canal entraîne une diminution des démangeaisons induite par l'histamine chez la

souris. Il a aussi été montré qu'une activité dérégulée de TRPV1 était impliquée dans les diabètes de type 1 et 2 (Kaneko and Szallasi, 2014).

Concernant le lien entre les canaux TRP et le cancer, ce sujet reste très controversé. Si certains chercheurs soutiennent que les canaux TRP sont impliqués dans la prolifération et la migration de cellules cancéreuses, d'autres estiment que l'expression de ces protéines ne reste qu'un épiphénomène et ne contribuent pas à l'évolution de la maladie.

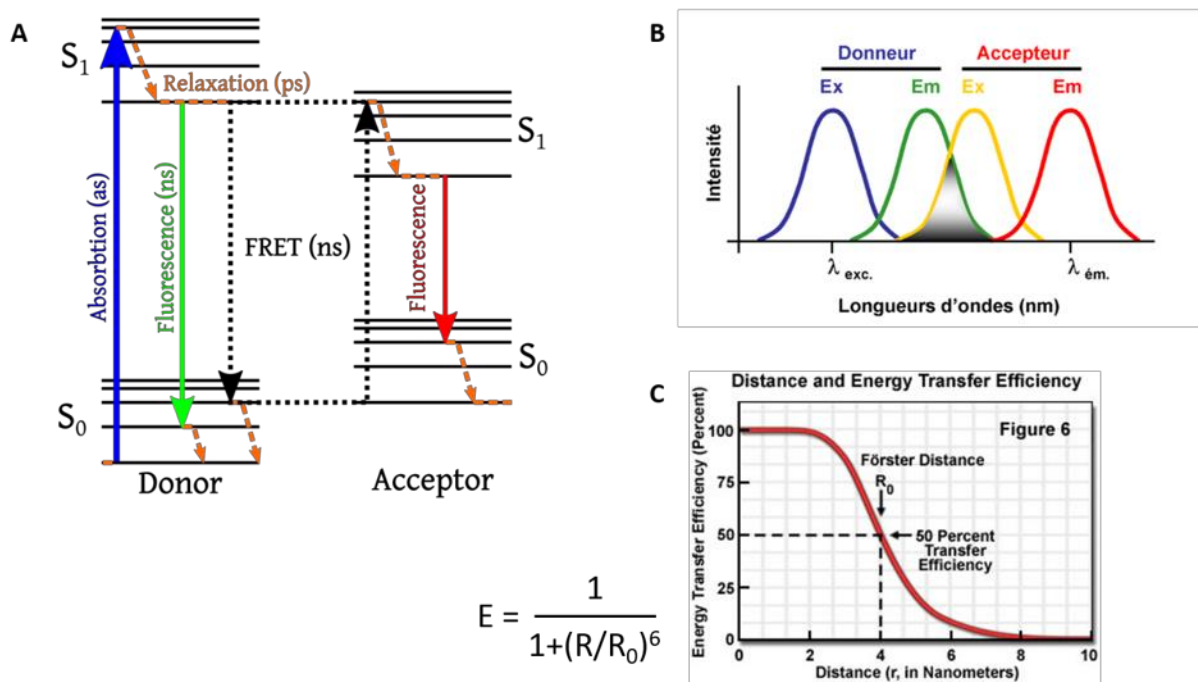
## **2.2 Transfert d'énergie en résonance**

L'activation de TRPV1, que ce soit par la température, des agents chimiques, ou le pH, entraîne l'ouverture du canal et un réarrangement du pore du canal (Cao et al., 2013). Ces changements de conformations, ainsi que l'interaction avec différentes protéines nécessaires à l'activation du canal, sont susceptibles de produire des changements de conformations au niveau des extrémités N- et C-terminales. Ce genre de modifications conformationnelles a été montré pour les canaux Kv2.1, structurellement liés aux TRP (Kobrinisky, 2006). L'activation de TRPV1 entraîne une entrée de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme, capté par la CaM, ce qui provoque une association entre le complexe CaM- $Ca^{2+}$  et TRPV1. Les interactions protéines-protéines ainsi que les changements de conformation des protéines peuvent être observés grâce à des techniques de transfert d'énergie en résonance (RET). Une partie de notre travail portant sur l'activation de TRPV1 à l'aide de la technique du Transfert d'Énergie en Résonance de Bioluminescence (BRET), dans ce qui suit, nous introduirons le principe du transfert d'énergie en résonance ainsi que son utilisation en biologie cellulaire à l'aide de protéines de fusion.

### **2.2.1 Le principe du transfert d'énergie en résonance**

Le RET est un phénomène biophysique dont le principe a été décrit pour la première fois en 1948 par Théodore Förster, et qui permet d'étudier l'interaction entre deux protéines, ou les changements de conformations au sein d'une même protéine, en temps réel. Le RET 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 d'énergie (Förster, 1948). 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 (Figure 13A). Cette propriété implique que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (Figure 13B). 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 en fonction de son rendement quantique (Figure 13A). Le rendement quantique correspond au nombre de photons émis par nombre de photons absorbés. Il est communément décrit que ce transfert d'énergie ne peut avoir lieu que si le donneur et l'accepteur sont distants de moins de 10 nm. Förster a pu démontrer que l'efficacité du transfert d'énergie est inversement proportionnel à la puissance six de cette distance, autrement dit, une faible variation de la distance séparant le donneur de l'accepteur induit un grand changement dans le transfert d'énergie entre ces dipôles (Figure 13C) (Cardullo, 2007). Le RET peut se calculer en faisant le ratio de l'intensité de lumière émise à la longueur d'onde de l'accepteur sur l'intensité de lumière émise à la longueur d'onde du donneur.



**Figure 13.** *Transfert d'énergie par résonance.* (A) Schéma représentant un transfert d'énergie non radiatif entre un donneur et un accepteur. (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

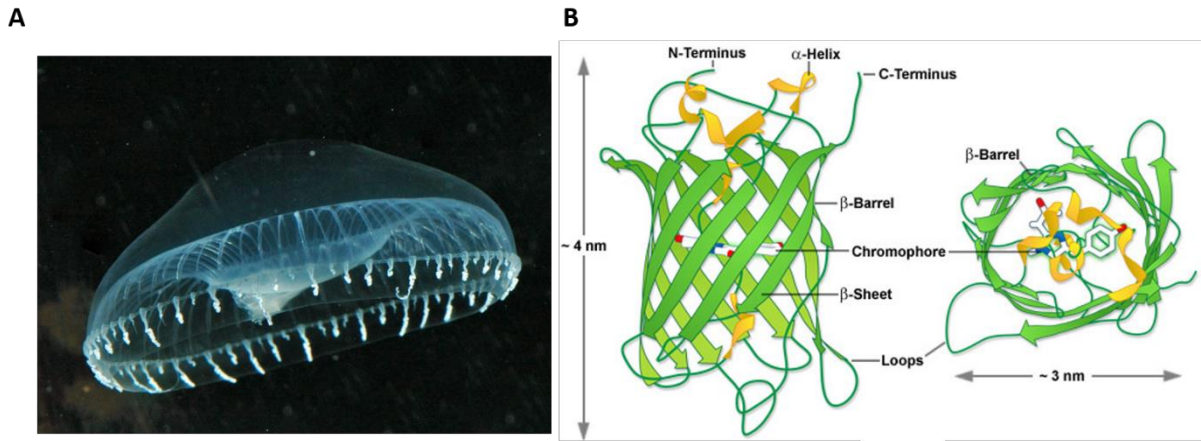


d'énergie  $E$ .  $R_0$  est la distance de Förster définie, pour un couple accepteur-donneur donné, comme la distance permettant 50 % de l'efficacité maximale du transfert.

### 2.2.2 Green fluorescent protein

Les différentes techniques de RET aujourd'hui utilisées sont souvent basées sur l'utilisation de protéines de fusion ; la protéine d'intérêt ayant été fusionnée à une protéine fluorescente. La protéine fluorescente sert ainsi de marqueur optique à la protéine d'intérêt. La première protéine fluorescente découverte, et la plus utilisée à ce jour, est la protéine fluorescente verte GFP (Green Fluorescent Protein). La GFP est issue d'*Aequorea victoria*, une méduse aux propriétés bioluminescentes (Figure 14A). Cette bioluminescence est le résultat d'un transfert d'énergie entre l'aequorine, une photoprotéine dépendante du calcium, et la protéine fluorescente GFP. La GFP fut clonée pour la première fois en 1992 (Prasher et al., 1992), ce qui a permis par la suite à d'autres études de démontrer que les propriétés de fluorescence de cette protéine étaient directement liées à sa structure et que la GFP n'avait nullement besoin des cofacteurs pour émettre de la lumière par fluorescence. Autrement dit, la GFP peut être exprimée dans d'autres organismes et d'autres cellules sans que sa fluorescence en soit altérée.

La GFP est une protéine de 238 résidus possédant une structure quaternaire particulière appelée « tonneau  $\beta$  », composée de 11 feuillets  $\beta$  protégeant le chromophore en son centre, et entourant une hélice  $\alpha$  centrale. Le chromophore provient de la cyclisation spontanée des résidus Ser 65 (ou Thr 65), Tyr 66 et Gly 67, et de l'oxydation de la Tyr 66, ces trois résidus se situant au milieu de la structure en tonneau, ce qui le protège du milieu environnant. Toutes ces étapes sont nécessaires au bon fonctionnement du chromophore. Son encapsulation est très probablement responsable du faible déplacement de Stoke, du rendement quantique élevé, de l'incapacité de l'oxygène à diminuer son état excité, et de la résistance au pH (Figure 14B) (Ormö et al., 1996; Tsien, 1998). Le repliement et la maturation de la GFP doit se faire à des températures basses, ce qui n'est pas un problème pour *A. victoria*, qui vit dans les eaux froides du Pacifique. Une température trop élevée est donc délétère pour la maturation de la protéine. En revanche, une fois mature et correctement repliée, la GFP reste stable et fluorescente jusqu'à 65 °C (Tsien, 1998).



**Figure 14.** La GFP d'*Aequorea victoria*. (A) La méduse *Aequorea victoria*. (B) Structure quaternaire de la GFP<sup>4</sup>. On observe ici les 11 feuillets  $\beta$  formant le tonneau contenant le chromophore.

La GFP d'*A. victoria* possède un spectre d'excitation et d'émission complexe. En effet, la protéine possède un premier pic d'excitation à 395 nm, d'une amplitude 3 fois supérieure à un second pic à 475 nm, donnant respectivement un pic d'émission à 508 et 503 nm (Figure 15). La présence de deux pics d'excitation provient de l'état de protonation du chromophore. Une GFP contenant un chromophore déprotoné est excitée à 475 nm, et est excitée à 395 nm si celui-ci est protoné (Heim et al., 1994).

<sup>4</sup> <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>

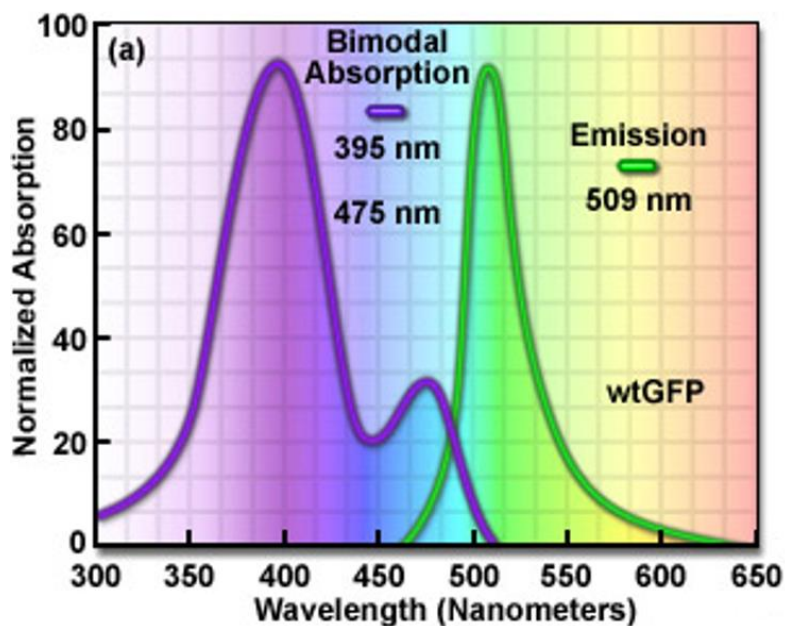


Figure 15. Spectres d'excitation et d'émission de la GFP<sup>5</sup>.

La présence de deux pics d'excitation et le mauvais repliement de la GFP à 37 °C sont deux problèmes majeurs pour l'utilisation du fluorochrome dans des tests biologiques. C'est pour cette raison que de nombreuses formes mutées de la GFP ont vu le jour. La mutation S65T est la plus connue. Elle permet de supprimer le pic d'excitation à 395 nm, et de décaler le pic à 475 nm vers 489-490 nm, en augmentant de six fois son amplitude. Il en est de même pour la triple mutation F64M, S65G et Q69L, aussi connue sous le nom de RSGFP4 et trouvée par mutagenèse aléatoire. Quant à la triple mutation F99S, M153T, V163A, ou la simple mutation F64L, elles permettent un meilleur repliement de la protéine à 37 °C (Cormack et al., 1996). L'addition des mutations F64L et S65T donne la EGFP (pour Enhanced Green Fluorescent Protein), une GFP améliorée.

D'autres mutations de résidus présents soit dans le chromophore soit dans l'auxochrome permettent de changer la longueur d'onde d'émission et donc la couleur. Notamment les mutations Y66H et Y66W permettent respectivement une fluorescence dans le bleu (BFP pour Blue Fluorescent Protein) et cyan (CFP pour Cyan Fluorescent Protein). T203Y donne

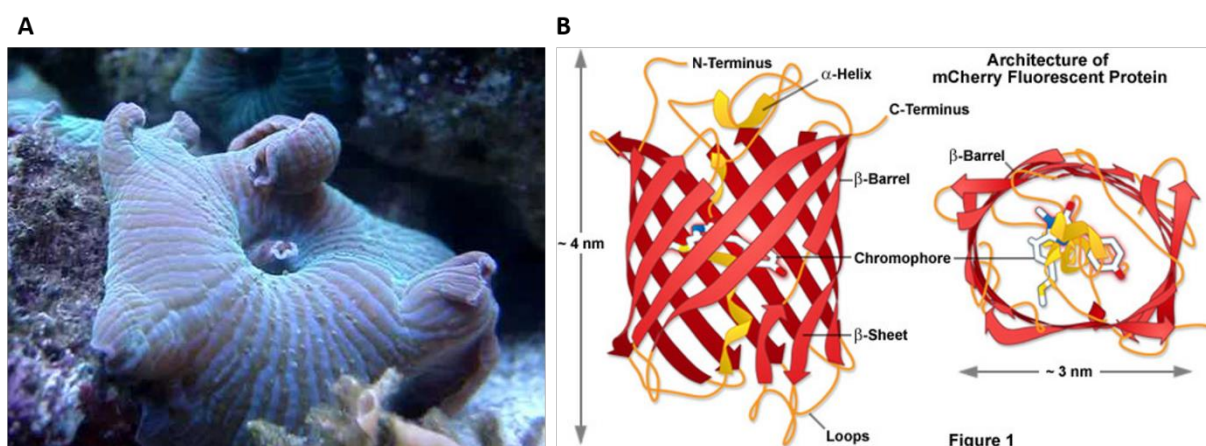
<sup>5</sup> <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>

naissance à la YFP (Yellow Fluorescent Protein) qui possède une longueur d'onde d'émission à 527 nm. D'autres mutations ont permis de créer un grand nombre de variants à partir de la GFP native d'*A. victoria*.

### 2.2.3 DsRed

La GFP a permis à différents variants, émettant du bleu au jaune, de voir le jour, mais présente des limites en ce qui concerne la création de fluorochromes émettant dans l'orange et le rouge.

La DsRed est une protéine fluorescente rouge (RFP pour Red Fluorescent Protein) issue du corail *Discosoma striata*, un anthozoaire (Figure 16A). La DsRed a été isolée pour la première fois par Matz et al. (Matz et al., 1999). Cette protéine possède un poids moléculaire de 28 kDa, et possède des pics d'excitation et d'émission de 558 et 583 nm respectivement. La structure quaternaire forme un tétramère, et chaque monomère est, comme la GFP d'*A. victoria*, constitué de 11 feuillets  $\beta$  disposés en tonneau (Figure 16B). Le chromophore est également formé par des modifications post-traductionnelles de la séquence Gln 66-Tyr 67-Gly 68. La maturation de la DsRed change sa couleur du vert au rouge et est très lente. Elle possède des propriétés de rendement quantique comparable à celle de la GFP, mais est stable dans une plus grande gamme de pH (5,0 – 12) et 5 fois plus résistante au photoblanchiment que cette dernière (Shrestha and Deo, 2006).



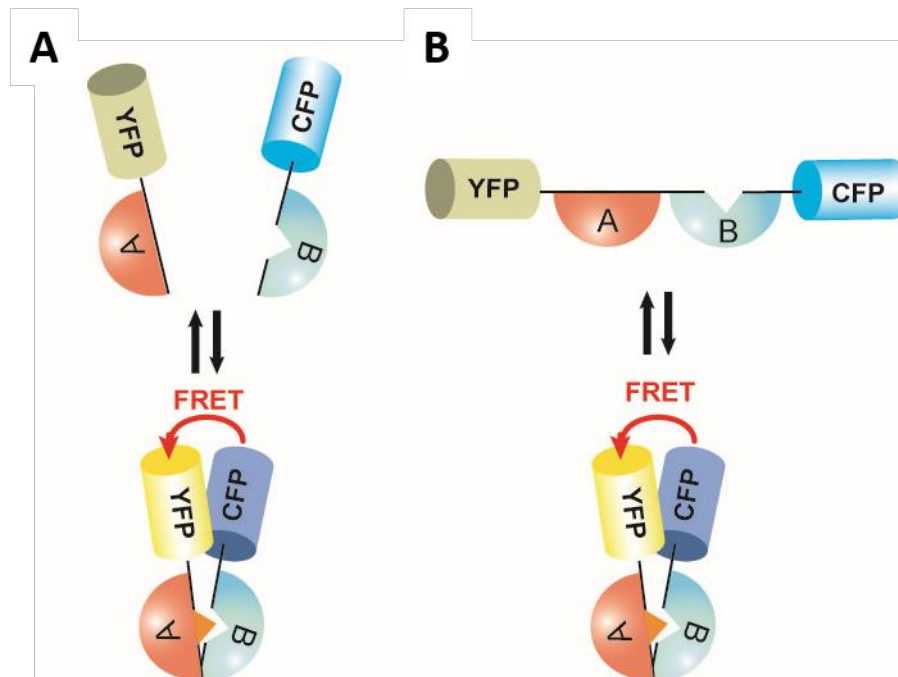
**Figure 16.** La DsRed de *Dicosoma striata*. (A) L'anthozoaire *Discosoma striata*. (B) Structure quaternaire de la DsRed similaire à celle de la GFP.

Comme pour la GFP, des recherches ont été menées afin de trouver de nouveaux mutants à partir de la DsRed native, et ont notamment ciblées le problème de la lente maturation de la protéine. Deux mutants, les DsRed2 et DsRed.T1 (ou DsRed-Express sous le nom commercial), ont vu le jour et possèdent des temps de maturation plus courts, 6.5h et 0.7h respectivement). La tétramérisation de la protéine a également été ciblée. En effet, conserver la fluorescence tout en empêchant la tétramérisation de la DsRed permet d'obtenir une protéine plus petite et donc plus intéressante dans le but d'une utilisation comme outil moléculaire. Obtenir une protéine monomérique était également d'importance pour éviter le rapprochement artéfactuel de protéines de fusion n'existant que sous une forme monomérique. La plupart des mutations de la DsRed native ont mené à des variants monomériques avec beaucoup moins d'intensité de fluorescence. Cependant, Roger Y. Tsien et son équipe ont réussi à mettre au point un variant monomérique nommé mRFP1 (monomeric Red Fluorescent Protein 1), obtenu à la suite de 33 mutations. Malgré le fait que cette protéine possède une photostabilité et un rendement quantique plus faible que la forme native, elle subit une maturation 10 fois plus rapide et avec une intensité de fluorescence égale après expression dans des cellules vivantes. De plus, les pics d'excitation et d'émission sont décalés de 25 nm dans le rouge par rapport à la DsRed, 584 et 607 nm respectivement, ce qui lui confère une meilleure pénétration tissulaire par rapport aux protéines dérivées de la GFP et une bonne séparation spectrale (Campbell et al., 2002; Shrestha and Deo, 2006).

#### **2.2.4 Le transfert d'énergie en résonance de fluorescence**

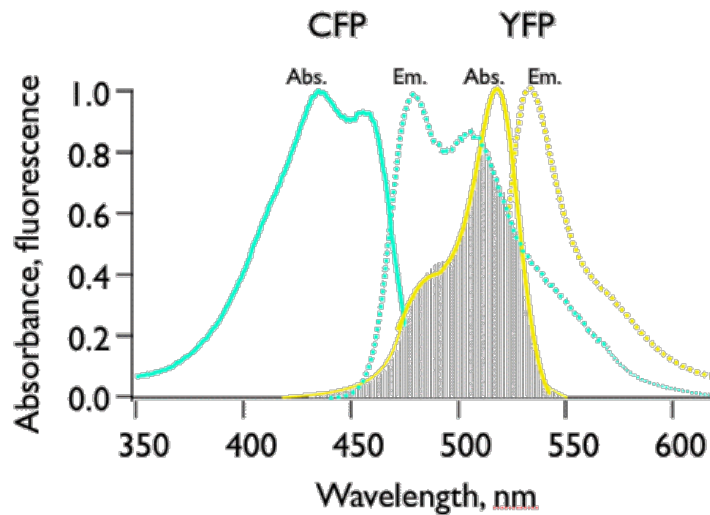
Le transfert d'énergie en résonance de fluorescence (FRET, pour Fluorescence Resonance Energy Transfer), technique basée sur le principe physique décrit par Théodore Förster en 1948 (Figure 13), permet d'étudier les changements de conformations d'une protéine, ou l'interaction entre deux protéines. Cela est possible en fusionnant, à l'aide de la biologie moléculaire, le donneur et l'accepteur sur deux protéines distinctes afin d'étudier leur interaction (FRET intermoléculaire, Figure 17A), ou en fusionnant le couple de fluorochromes donneur/accepteur sur les extrémités N- et C-terminales d'une même protéine afin d'observer des changements de conformations (FRET intramoléculaire, Figure 17B). Les protéines fluorescentes ayant un poids moléculaire relativement important, les couples donneur/accepteur

sont généralement fusionnés aux extrémités N- et C-terminales des protéines d'intérêts afin de ne pas perturber la structure interne.



**Figure 17.** *Sondes FRET.* Deux exemples de sondes FRET intermoléculaire (A) et intramoléculaire (B).

La CFP possède un spectre d'émission, avec des pics d'excitation et d'émission à 433 et 475 nm, qui recouvre partiellement le spectre d'excitation de la YFP, laquelle possède un pic d'excitation à 515 nm et un pic d'émission à 528 nm (Figure 18). En conséquence, un transfert d'énergie peut intervenir entre la CFP et la YFP dans des conditions de proximités et d'orientation des dipôles, tel que défini précédemment (chapitre 2.2.1), ce qui en fait le couple donneur/accepteur le plus utilisé en FRET. D'autres couples peuvent également être utilisés en FRET, comme décrit dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).



**Figure 18.** Spectres d'excitation et d'émission de la CFP et de la YFP. Le spectre d'émission de la CFP recouvre partiellement le spectre d'excitation de la YFP, permettant un transfert d'énergie de la CFP vers la YFP.

Donneur	Excitation	Emission	Accepteur	Excitation	Emission
EBFP	380	460	EGFP	488	509
CFP	435	485	YFP	515	528
T-Sapphir	395	510	YFP	515	528
T-Sapphir	395	510	mOrange	548	562
YFP	515	528	mCherry	587	610

**Tableau 1.** Les couples donneur/accepteur couramment utilisés en FRET.

L'avantage principal de la technique du FRET est que, l'excitation du donneur d'énergie étant réalisée à l'aide de laser, l'intensité des signaux de FRET est élevée. Il est donc facile d'observer des interactions inter- et intramoléculaires même si celles-ci sont faibles. En revanche, l'excitation du donneur étant obtenue à l'aide d'une source de lumière intense, celle-ci peut provoquer un photoblanchiment des fluorochromes, un bruit de fond important dû à

l'autofluorescence des tissus et support plastiques, et peut également engendrer un stress cellulaire, voir la mort cellulaire.

Le FLIM-FRET (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy-FRET) est une technique basée sur le FRET permettant de s'affranchir du photoblanchiment. Cette méthode consiste à mesurer le déclin de fluorescence du donneur au cours du temps. La base physique de cette approche repose sur le fait que la durée de vie d'une molécule fluorescente dépend notamment de l'efficacité du processus de FRET. Par conséquent, plus le transfert d'énergie entre les deux molécules fluorescentes est efficace, plus le déclin de fluorescence du donneur est rapide.

### **2.2.5 Transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET)**

Le transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET) met en jeu un transfert d'énergie entre un donneur d'énergie bioluminescente, la luciférase, et une protéine acceptrice fluorescente. L'avantage de cette technique par rapport au FRET est qu'elle n'engendre pas de bruit de fond et ne provoque pas de stress cellulaire dû à l'utilisation d'un laser. Avant d'être une technique utilisée en biologie cellulaire, le BRET est avant tout un phénomène naturel que l'on peut retrouver chez certaines bactéries, les lucioles, les dinoflagellés et certains types de vers mais aussi chez des Cnidaria (Coelenterates), dont la méduse *Aequorea victoria* et *Renilla reniformis*, une pensée de mer.

*R. reniformis* est l'anthozoaire dans lequel ce phénomène a été le plus étudié. Cet organisme exprime la protéine bioluminescente luciférase (Rluc, pour *Renilla* luciférase). La Rluc est une protéine de 35 kDa, qui, en présence de son substrat, la coelentérazine (Clz) (ou luciférine chez d'autres organismes) va permettre l'émission de bioluminescence d'une couleur bleuté. Cette émission de bioluminescence est déclenchée en présence d'ions calcium et implique quatre protéines. Tout d'abord, une sulfokinase retire le groupement sulfate du précurseur de la Clz, stocké sous cette forme. Ensuite, la Clz se fixe à la Luciferin Binding Protein (LBP), une protéine liant le calcium, mais qui relâche le substrat en présence de  $Ca^{2+}$ . Enfin, la Clz est oxydée, une réaction catalysée par la Rluc. La 4<sup>ème</sup> protéine entrant en jeu est la *Renilla* GFP. Lorsqu'elle est à proximité de la Rluc, on n'observe plus une émission de lumière bleue à 480 nm, mais une lumière verte à 509 nm (Wilson and Hastings, 1998). Il s'agit d'un transfert d'énergie de la Rluc bioluminescente vers la *Renilla* GFP fluorescente, la base

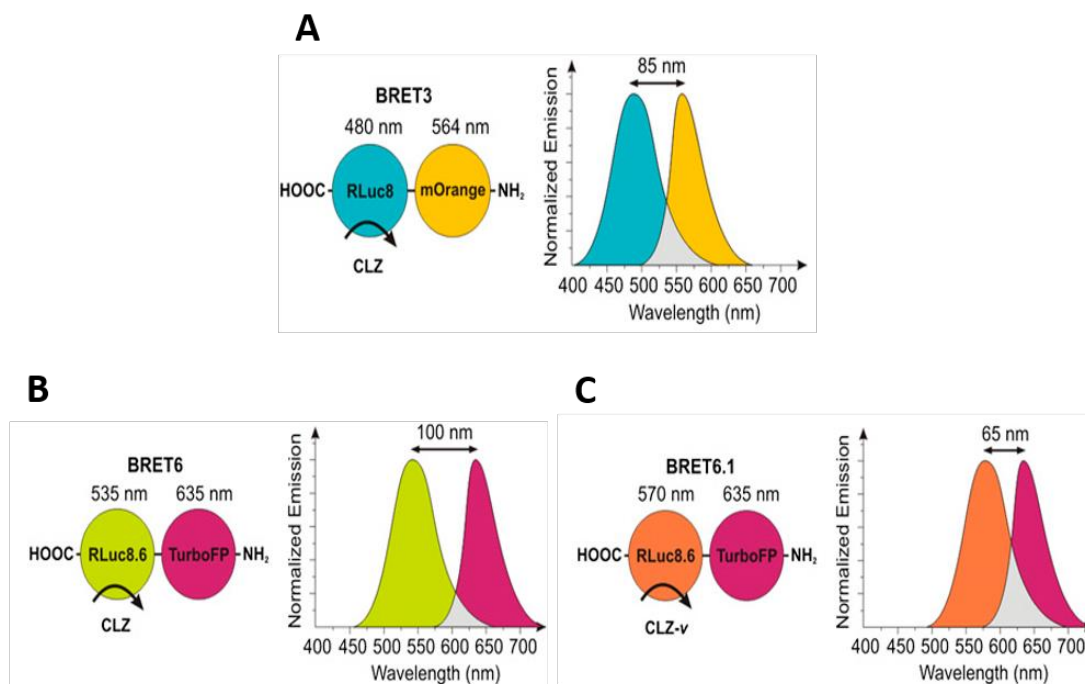


de la technologie BRET. Le même phénomène est observé chez *A. victoria*, à la différence près que la méduse exprime une aequorin comme protéine bioluminescente et permet un BRET avec la protéine fluorescente *Aequorea* GFP, avec l'émission d'une lumière verte à 508 nm. Il est à noter que les luciférases et les GFP de *R. reniformis* et *A. victoria* ne sont pas proche du point de vue de l'évolution (Wilson and Hastings, 1998).

Il existe différentes configurations de BRET. La première, appelée BRET de première génération ou BRET<sup>1</sup>, utilise la Rluc comme donneur d'énergie avec la Clz-h comme substrat, et la YFP comme accepteur d'énergie. La bioluminescence produite par la Rluc en présence de Clz-h possède un maximum d'émission à 480 nm, et permet le transfert d'énergie à la YFP, qui réémet à 530 nm environ. Les spectres d'émission de la Rluc et d'excitation de la YFP ne se recouvrent que partiellement, ce qui résulte en un transfert d'énergie moins efficace, ce qui peut être problématique pour observer des interactions protéines-protéines faibles ou de petits changements de conformations au sein d'une même protéine. Fort de ce constat, la compagnie Packard a développé un nouveau substrat, la Clz-400a, aussi appelé DeepBlueC<sup>TM</sup>, qui permet d'obtenir un pic maximal d'émission à 400 nm. En utilisant la GFP<sup>2</sup> comme accepteur, qui possède un pic maximal d'excitation aux alentours de 400 nm, le recouvrement spectral est quasi parfait et permet d'avoir un très bon transfert d'énergie. De plus, la GFP2 possède un très grand déplacement de Stokes avec une longueur d'onde maximale de son émission à 510 nm. Les maximums d'émission du donneur et de l'accepteur sont donc bien distincts, ce qui facilite la mesure du BRET. Il s'agit du BRET de 2<sup>ème</sup> génération ou BRET<sup>2</sup>. La contrepartie du test de BRET2 est que la Clz-400a présente une décroissance rapide du signal et la production de lumière par la Rluc est bien moins importante qu'avec la Clz-h.

Les Rluc2 et Rluc8, deux mutants de la Rluc native, permettent d'augmenter la quantité de lumière recueillie avec de la Clz-400a. La Rluc2 possède deux mutations par rapport à la forme native (C124A et M185V). La mutation C124A avait été déterminée auparavant par Liu et Escher, qui ont montré qu'elle augmentait la résistance à l'inactivation (Liu and Escher, 1999). L'ajout d'une seconde mutation M185V accroît l'activité de la Rluc. La protéine Rluc8 comporte 8 mutations, incluant celles de la RLuc2 (A55T, C124A, S130A, K136R, A143M, M185V, M253L, S287L) et voit ses propriétés augmentées par rapport à la Rluc, avec une émission de lumière plus importante avec des analogues de la coelentérazine, et une meilleure stabilité à 37 °C (De et al., 2007; Kocan et al., 2008; Loening, 2006).

Il existe également un BRET de 3<sup>ème</sup> génération (BRET<sup>3</sup>, Figure 19A) qui met en jeu la RLuc8 comme donneur bioluminescent ( $\lambda_{em} \sim 480$  nm avec la Clz-h comme substrat) et mOrange comme accepteur fluorescent ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 548/564$  nm) (De et al., 2009). Ce test de BRET est utilisé pour effectuer des mesures *in vivo*, ce qui nécessite non seulement une excellente résolution spectrale et un rendement quantique élevé du donneur bioluminescent, mais aussi un accepteur émettant une fluorescence rouge, ce qui est le cas de mOrange. En effet, les YFP et GFP voient leur émission fortement absorbée par le sang dans les tissus vivants très vascularisés, ce qui diminue grandement le signal de BRET. Toujours dans le but d'améliorer l'efficacité et l'intensité de lumière émise dans le rouge des systèmes BRET, la RLuc8.6 est utilisée avec la TurboFP635 comme accepteur, avec la Clz-h ou l'analogue Clz-v comme substrat. Ces nouvelles configurations de BRET sont appelées BRET<sup>6</sup> et BRET<sup>6.1</sup> (Figure 19B et Figure 19C) et possèdent un grand potentiel pour les applications *in vivo* de par leur grande efficacité de transfert d'énergie, une émission de fluorescence très décalée dans le rouge (640 nm), et une très bonne résolution spectrale (100 et 65 nm respectivement) (Dragulescu-Andrasi et al., 2011).



**Figure 19.** Tests de BRET utilisés pour des analyses *in vivo*. (A) Test BRET<sup>3</sup> impliquant la RLuc8 comme donneur et mOrange comme accepteur. Le substrat utilisé est la Clz-h. (B et C) Tests BRET<sup>6</sup> et BRET<sup>6.1</sup> utilisant tous deux la RLuc8.6 comme donneur et la TurboFP635 comme accepteur. Le BRET<sup>6</sup> utilise la Clz-h (B) et le BRET<sup>6.1</sup> la Clz-v (C) comme substrat.

## **2.2.6 Combinaison des techniques de RET permettant d'étudier l'interaction entre plusieurs protéines**

Basée sur la fluorescence, la bioluminescence ou le RET, il existe d'autres techniques permettant d'étudier les interactions entre deux voir même plusieurs protéines.

Les essais de complémentation protéique (PCA, pour Proteic Complementation Assay) de protéines rapporteuses de fluorescence ou de luminescence biomoléculaire (BiFC et BiLC respectivement) permettent de mettre en évidence l'interaction entre deux protéines. Cette technique est basée sur l'association de deux fragments d'une même protéine fluorescente (BiFC) ou luminescente (BiLC) fusionnés aux composants d'un complexe moléculaire. Deux protéines fusionnées respectivement à chaque moitié du fluorochrome ou de l'enzyme luminescente pourront, en cas de rapprochement, permettre la reconstruction de la protéine fluorescente ou bioluminescente et la restauration d'un signal lumineux. En couplant la technique du BRET avec le BiFC (Rluc en donneur et deux fragments de YFP en accepteur), l'équipe du Dr. Bouvier a pu observer l'interaction entre 3 partenaires (Heroux et al., 2007). Il est également possible de coupler le FRET et le BiFC.

L'utilisation séquentielle des techniques de RET a aussi permis d'observer des complexes protéiques à trois partenaires. Le 3-FRET combine les couples CFP-YFP et YFP-mRFP. Le groupe du Dr. Sorkin a mis en évidence le transfert séquentiel à l'intérieur d'une protéine de fusion CFP-YFP-mRFP (Galperin et al., 2004). Carriba et al. a utilisé une technique appelée SRET (Sequential Resonance Energy Transfer) qui couple le BRET entre la luciférase et la GFP<sup>2</sup> et le FRET entre la GFP<sup>2</sup> et la YFP (Carriba et al., 2008).

Les combinaisons RET/PCA nécessitent la présence de tous les partenaires et ne permettent pas la mesure d'événements moléculaires indépendants en même temps.

Une partie de cette thèse a été consacrée à la mise en place d'une méthode permettant l'étude simultanée de trois événements moléculaires en un seul test à l'aide du BRET et d'une décomposition spectrale des signaux obtenus. La mesure de spectres de BRET permet de s'affranchir de l'utilisation de filtres de détections qui ne permettent qu'une lecture séquentielle des signaux de BRET.

## **2.3 Etudes des effets des radiofréquences sur l'activation du canal TRPV1**

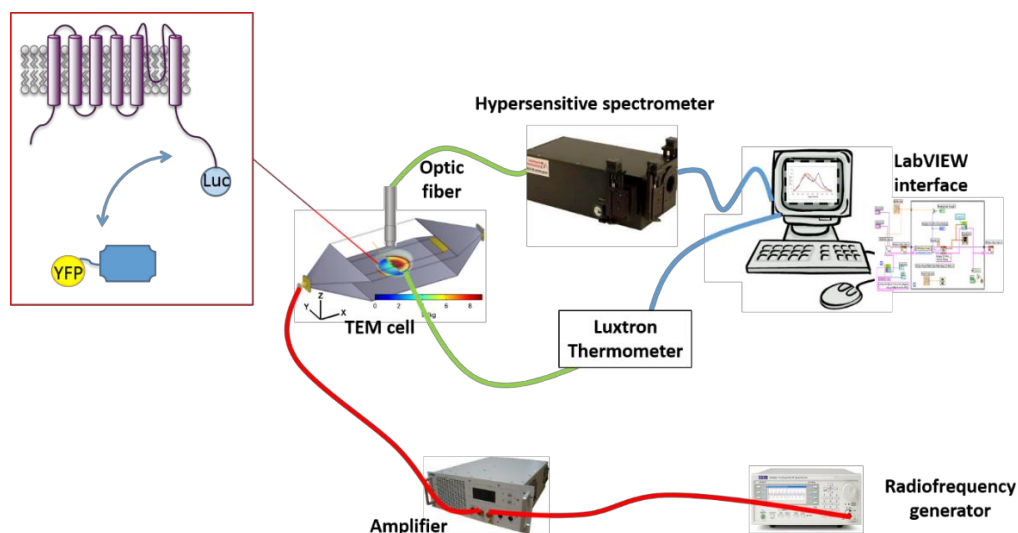
Tel que présenté en introduction, les effets biologiques et sanitaires de l'exposition aux champs électromagnétiques ont été étudiés très activement au cours des deux dernières décennies, guidées principalement par des préoccupations sociétales concernant les effets potentiels sur la santé des lignes électriques et des systèmes de communication sans fil. Alors que les effets des champs électromagnétiques de très basse fréquence sur l'excitation des cellules nerveuses et musculaires ont été bien caractérisés, les seuls effets bien décrits des champs radiofréquences sur les systèmes biologiques concernent l'échauffement diélectrique des tissus. Pour autant, l'existence de potentiels effets « non-thermiques » des champs RF, qui ne seraient pas causés par l'élévation de la température au sein des tissus vivants, anime toujours les débats au sein de la communauté scientifique et au sein de la population. L'étude de tels mécanismes a été entravée par l'absence d'effets robustes, fiables et répétables résultant d'une exposition à bas niveau et pour laquelle une absence d'élévation de la température a été parfaitement caractérisée. En outre, aucune hypothèse mécaniste plausible n'a été donnée concernant les effets thermiques ou non thermiques des expositions aux CEM de faible niveau (Foster and Repacholi, 2004; SCENIHR, 2015; Sheppard et al., 2008), rendant difficile de tirer des conclusions sur la base des résultats expérimentaux disponibles (Vecchia et al., 2009). Certains auteurs ont alors suggéré d'étudier les effets des champs RF au niveau moléculaire en ciblant les thermorécepteurs biologiques connus, tels que les canaux thermoTRPs dont la conformation pourrait être modifiée par interaction avec les RF (Glaser, 2005).

### **2.3.1 Caractérisation des sondes BRET ciblant les canaux TRP et mise en place de la lecture spectrale des signaux de BRET – Article 1**

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 20. 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. Le développement d'une acquisition spectrale des signaux de BRET revêtait de multiples avantages qui dépassaient 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, reproduite dans les pages qui suivent. Les innovations réalisées dans ce travail ont conduit au dépôt de deux brevets internationaux par la SATT Aquitaine dont je suis co-auteur et la publication d'un article dans la lettre de l'innovation du CNRS, également en Janvier 2017.



**Figure 20.** *Système expérimental en boucle ouverte permettant simultanément l'exposition des cellules aux RF et l'acquisition du signal de BRET.* Les cellules exprimant les sondes BRET sont déposées au centre d'une cellule d'exposition TEM (Transverse Electromagnétique). Les cellules sont exposées aux différents signaux RF à l'aide d'un générateur de RF. Les signaux de BRET émis sont captés par une fibre optique reliée à un spectromètre ultra-sensible. En parallèle, la température du milieu de culture est mesurée. Les données BRET et température sont ensuite analysées par une interface Labview.

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

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

<sup>1</sup>Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5218, Talence, France; <sup>2</sup>Université de Bordeaux, Talence, France; <sup>3</sup>Institut des Sciences Moléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5255, NSYSA Group, ENSCBP, Pessac, France; <sup>4</sup>Paris Sciences et Lettres Research University, Paris, France; and <sup>5</sup>Institut 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 Ca<sup>2+</sup>-bound CaM but not Ca<sup>2+</sup>-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](mailto: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 Ca<sup>2+</sup>-bound Calmodulin (CaM) but not Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-insensitive mutant form of CaM (CaM1234), in which point mutations within all four EF hands eliminate Ca<sup>2+</sup> 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  
TACCTGCTCGTTCCTCAGCACTCTCTCC  
Luc\_ *Eco*RI\_ATG\_C-term sense, GTGTACCGGTGAATTCTGGTGGGA  
GGCGGATCTATGACCAGCAAGGTGTACGACCCCGAGC  
Luc\_ *Xho*I\_Stop\_C-term antisense, ATCTAGTCTAGACTCGAGCGGT  
TACTGCTCGTTCCTCAGCACTCTCTCC  
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  
GCGGATCTATGAAGAAATGGAGCAGCACAGACT  
hTRPV1\_ *Eco*RI\_Fus\_antisense, CACCAGAATTCACCGGTACCTTC  
TCCCCGGAAGCGGCAGGACTC  
hTRPV1\_ *Hind*III\_ATG\_Sense, TGCTAAGCTTGGTACCGCaCACC  
ATGAAGAAATGGAGCAGCACAGACT

**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  $\mu$ 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<sup>-1</sup> 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  $\mu$ g of the donor constructions and 1.75–1.9  $\mu$ 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  $\mu$ g) were transfected with a fixed amount of TRPV1-Luc (0.1  $\mu$ g). The amount of transfected DNA was completed to a total of 2  $\mu$ 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 10<sup>5</sup> 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 ( $I_{\text{acceptor}}$ ) over the emission intensity measured in the donor window ( $I_{\text{donor}}$ ), 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, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 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  $\lambda$  is the wavelength,  $a_i$  values are the peak heights of the Gaussian curves,  $\lambda_{max_i}$  values are the wavelengths of their peaks, and  $\sigma_i$  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  $k_{\text{probe}}$  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  $k_{\text{probe}}$  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  $\mu\text{M}$  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;  $\text{Bottom}$  is the  $Y$  value at the bottom plateau;  $\text{Top}$  is the  $Y$  value at the top

plateau; and  $\text{LogEC50}$  is the  $X$  value when the response is halfway between  $\text{Bottom}$  and  $\text{Top}$ .

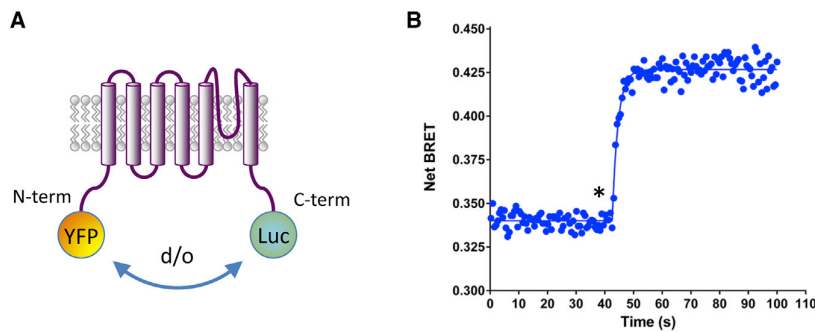
## RESULTS

### 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).

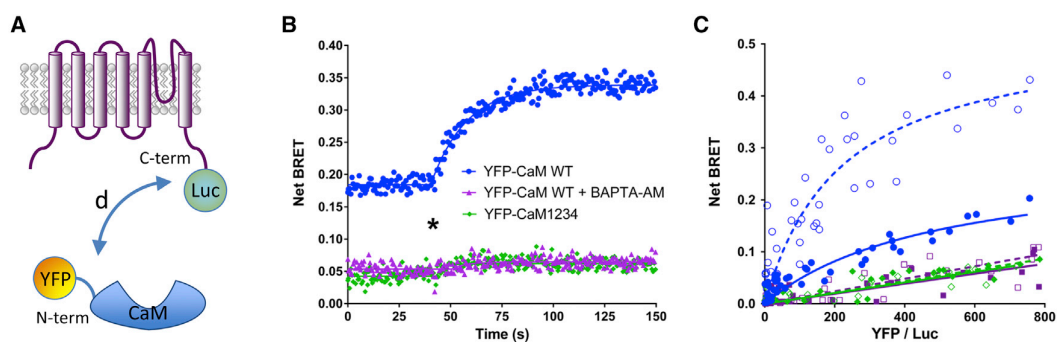
The increase in basal BRET, measured using the intramolecular TRPV1 BRET probe, probably reflected the changes in the various modes of energy transfer between Luc and YFP inside the TRPV1 tetrameric organization of the channel during channel opening (18–20). However, the increase in basal BRET between 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 ( $\tau$ ) of the BRET increase induced by CAPS is  $2.01 \pm 0.29$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $218 \pm 58$  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

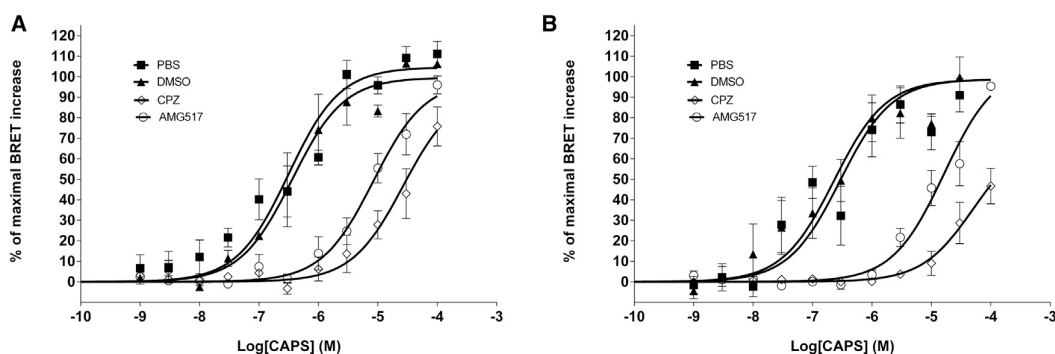


FIGURE 3 Dose-response curves of CAPS-induced BRET changes measured in HEK293T cells expressing the YFP-TRPV1-Luc BRET probe (A) or the TRPV1-Luc/YFP-CaM constructs (B). Before CAPS activation, the cells were preincubated with either PBS, DMSO (vehicle), 1  $\mu$ M CPZ, or 1  $\mu$ M AMG517. In the presence of CPZ or AMG517, but not in the presence of the vehicle alone, the dose-response curve shifted to higher values and the EC<sub>50</sub> 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.

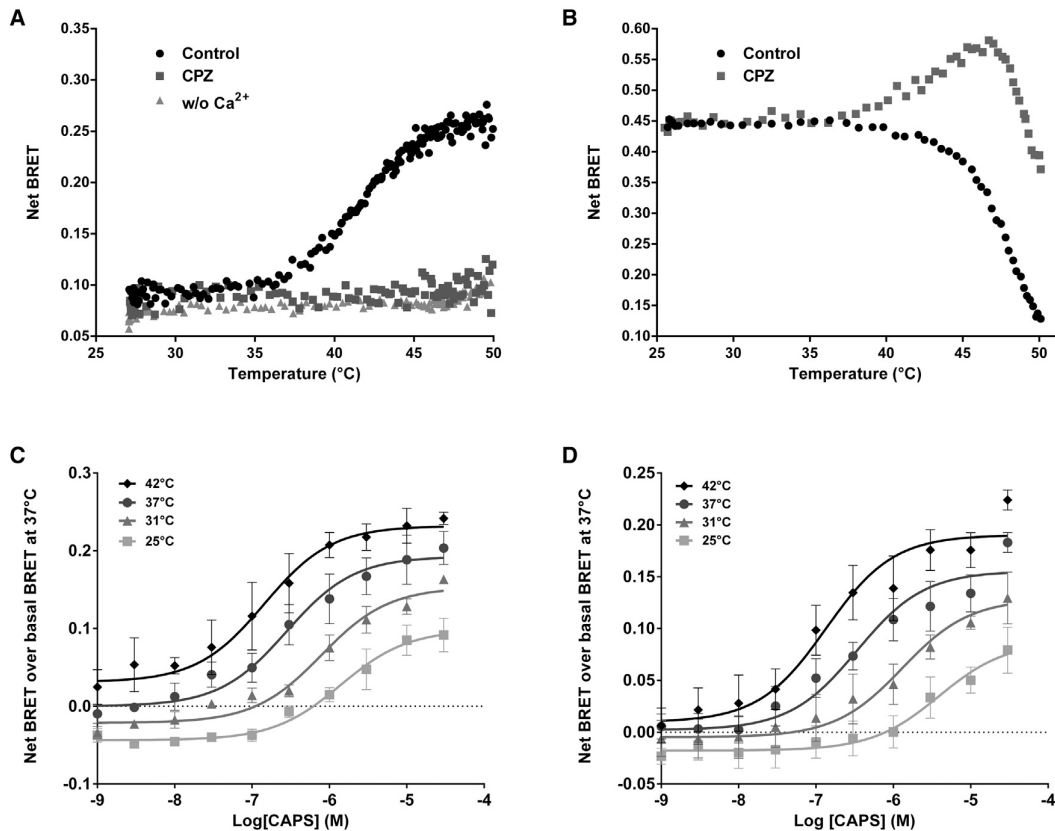


FIGURE 4 Effect of temperature on the pharmacological properties of TRPV1 and its activation, measured by BRET. (A and B) BRET ratios of HEK293T cells expressing either the TRPV1-Luc/YFP-CaM constructs (A) or the YFP-TRPV1-Luc BRET probe (B) were recorded in real time while the cell-culture medium was heated from 25 to 50°C using a Peltier plate. The effects of calcium-free extracellular medium (A) or preincubation of cells with 1  $\mu$ 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 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  $\mu$ 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.

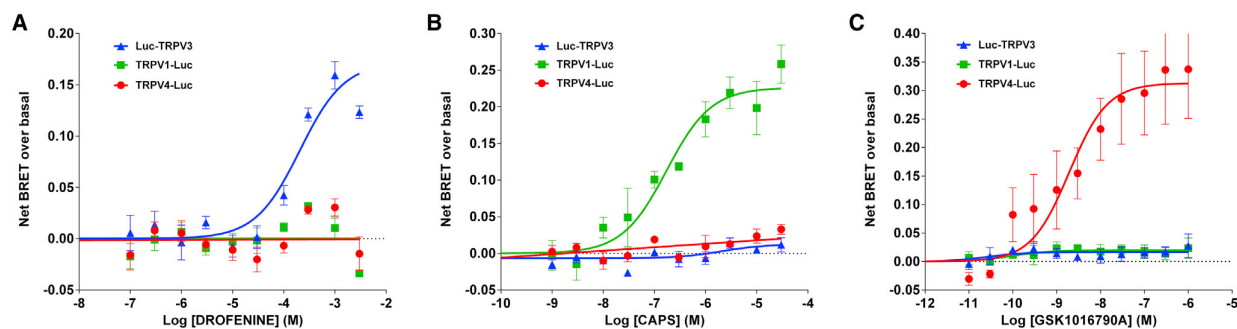


FIGURE 5 Dose-response curve of the effect of Drogenine (A), CAPS (B), and GSK1016790A (C) on HEK293T cells coexpressing YFP-CaM and Luc-TRPV3 (*triangle*), TRPV1-Luc (*square*), or TRPV4-Luc (*circle*). Results are expressed as the difference between the net BRET measured in each condition and the basal BRET measured without any agonist. Basal BRETs of  $0.221 \pm 0.004$ ,  $0.202 \pm 0.003$ , and  $0.275 \pm 0.008$  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

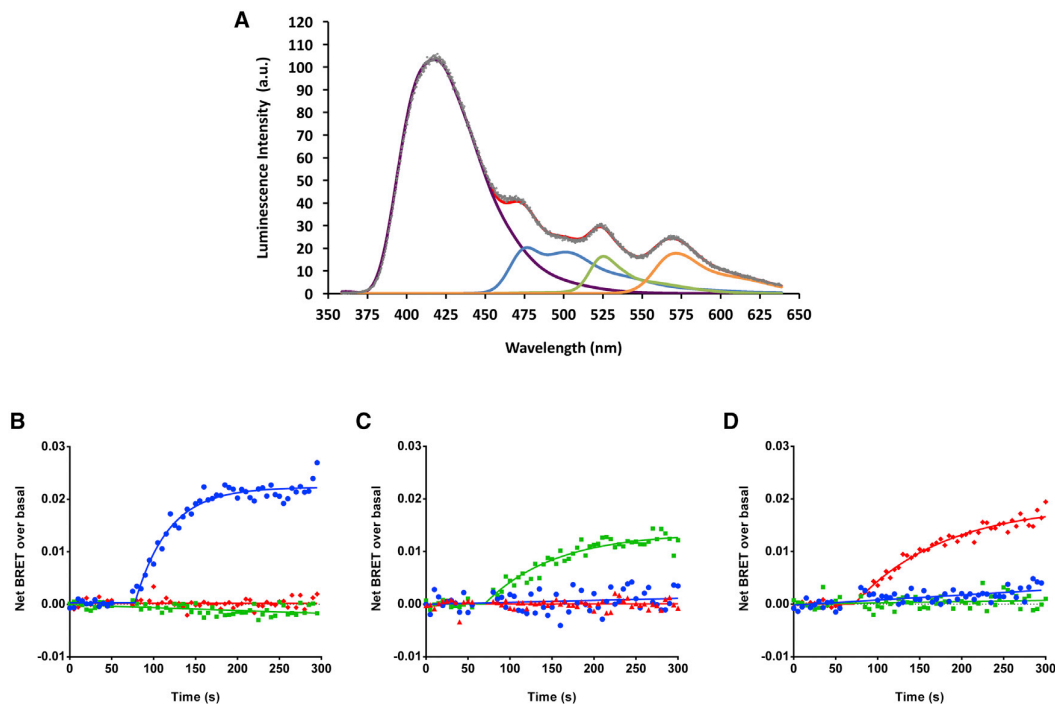


FIGURE 6 Multiplexing measurements of TRPV activity using multicolor BRET. (A) Example of a three-color BRET spectrum and its decomposition, measured in a coculture containing three HEK293T subpopulations transfected with aquamarine-Luc, mAmetrine-Luc, or LSSmOrange-Luc. (Gray dots) Experimental data. (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  $0.027 \pm 0.002$ ), TRPV1-Luc/mAmetrine-CaM (green line, basal BRET of  $0.015 \pm 0.001$ ), and TRPV4-Luc/LSSmOrange-CaM (red line, basal BRET of  $0.017 \pm 0.001$ ) constructs. One mM Drofenine (B), 20  $\mu$ 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup>-bound CaM, but not Ca<sup>2+</sup>-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<sup>2+</sup>. Our TRPV1-Luc/YFP-CaM intermolecular BRET assay demonstrated that TRPV1 and Ca<sup>2+</sup>-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<sup>2+</sup>-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),  $\beta$ -Arrestin-2 (54), AKAP79/150 (55), and PKC $\beta$ 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. Ca<sup>2+</sup>/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  $\beta$ 1- and  $\beta$ 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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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 spatiotemporal organization in live cell membranes. *PLoS One.* 10:e0116900.
54. Por, E. D., S. M. Bierbower, ..., N. A. Jeske. 2012.  $\beta$ -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 $\beta$ 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.

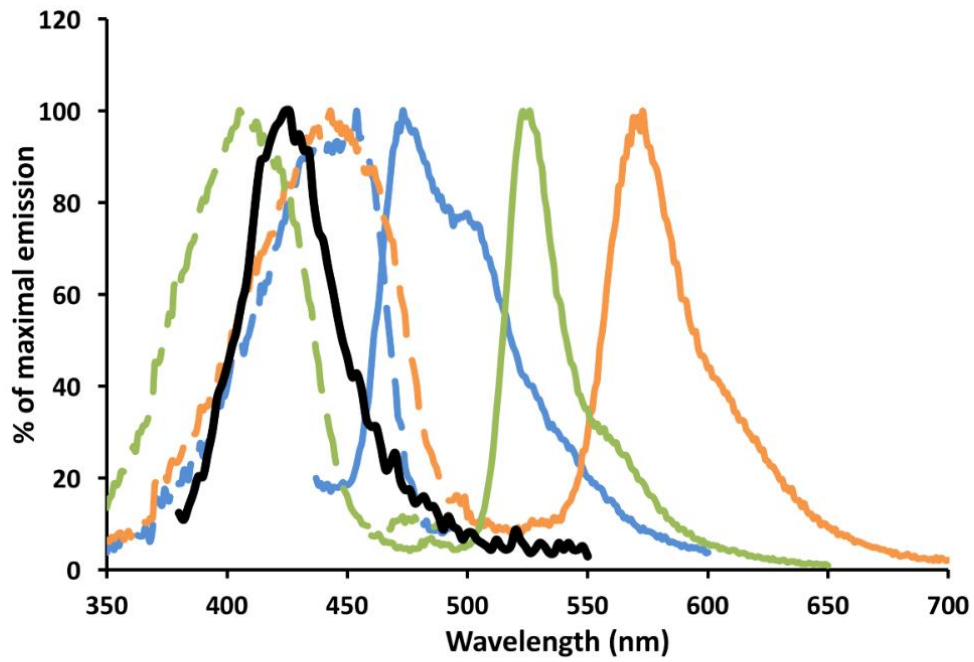


FIGURE S1 Compatibility of the emission spectrum of Luc (in the presence of purple coelenterazine substrate, black line) and the absorption (dotted lines) and emission spectra (full lines) of aquamarine (blue lines), mAmetrine (green lines), and Lss-mOrange (orange lines).

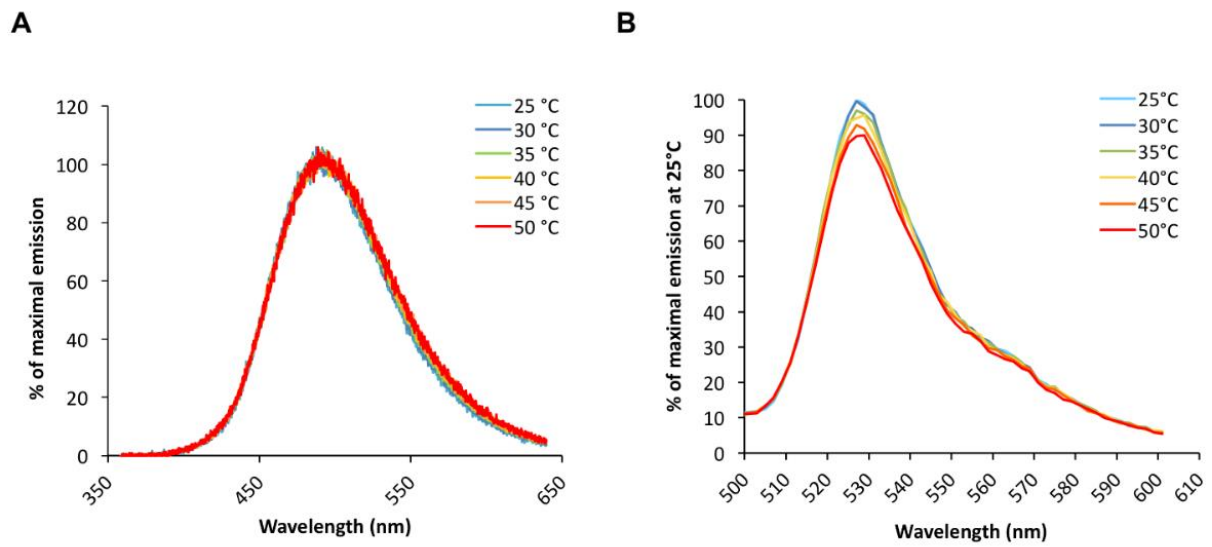


FIGURE S2 Emission spectra of Luc (in presence of Coelenterazine H) (A) and YFP (B) at temperatures ranging from 25 to 50 °C.

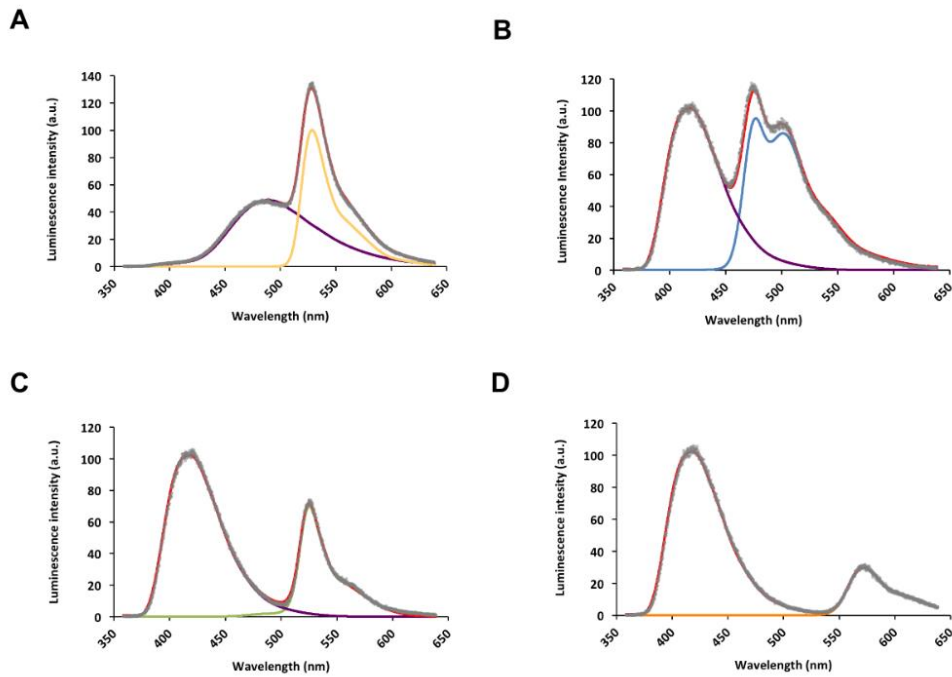


FIGURE S3 Signal decomposition of the bioluminescent spectra measured from HEK293T cells expressing YFP-Luc (A), aquamarine-Luc (B), mAmetrine-Luc (C), or LSSmOrange-Luc (D). Based on the experimental data (red line), the LabVIEW interface was used to calculate the shape of the BRET signal and separate the Luc emission spectrum (purple line) from those of YFP (yellow line, A), aquamarine (blue line, B), mAmetrine (green line, C), and LSSmOrange (orange line, D). The BRET ratio was then calculated by dividing the area under the acceptor spectrum by that under the donor spectrum, thus assuring its independence from any contamination by that of the donor or other acceptors. Net BRET for each FP-Luc is as follow: 0.82 for YFP-Luc, 1.09 for CFP-Luc, 0.43 for mAmetrine-Luc and 0.24 for LssmOrange-Luc. Coelenterazine H was used as a substrate in A, while purple coelenterazine was used as a substrate in B-D.

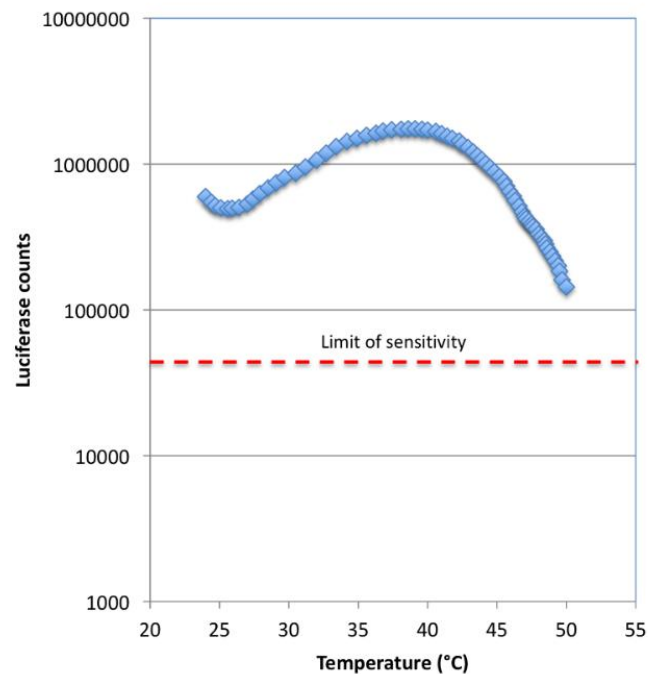


Figure S4 Effect of temperature on bioluminescence measured from live and adherent HEK293T cells expressing TRPV1-Luc. The total luciferase counts from the Luc spectra were measured after addition of 5  $\mu\text{M}$  of Coelenterazine H. The measurement was performed using the Acton Spectrapro2300i. The limit of sensitivity of the spectrometer, e.g. lower number of counts below which the Luc spectra is not efficiently decomposed, is indicated as a red dashed line.

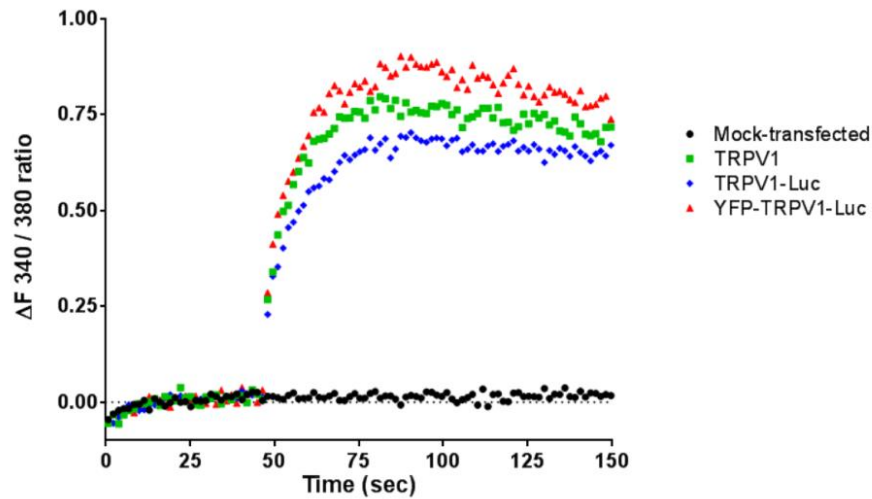


FIGURE S5  $\text{Ca}^{2+}$  influx was induced by  $20 \mu\text{M}$  capsaicin stimulation of human embryonic kidney (HEK) cells, mock-transfected or transiently expressing TRPV1, TRPV1-Luc, or YFP-TRPV1-Luc.  $\text{Ca}^{2+}$  entry was measured as a change in fluorescence intensity, before and after addition of the agonist (applied at 45 sec). The plotted signal corresponds to the difference between the 340/380 nm ratio for each dot, and the basal ratio measured in the absence of stimulation. Data represent the average of three independent experiments. Analysis yielded similar time constants under all TRPV1 transfected conditions with  $\tau = 4.71 \pm 0.44$  sec for TRPV1,  $\tau = 6.38 \pm 0.43$  sec for TRPV1-Luc, and  $\tau = 5.02 \pm 0.51$  sec for YFP-TRPV1-Luc.

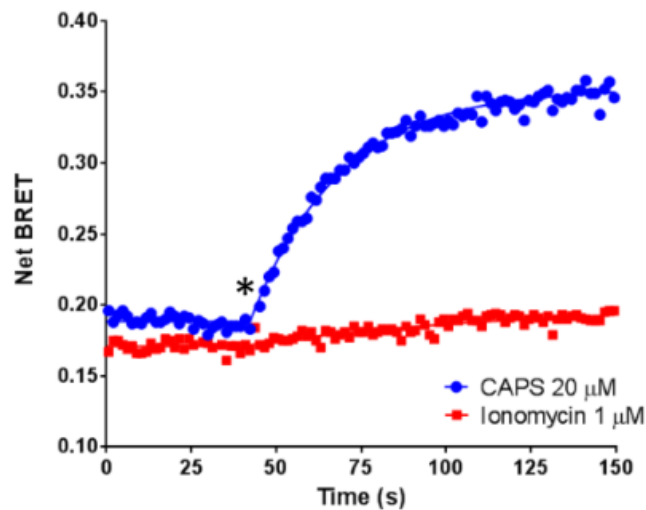


FIGURE S6 Kinetic measurement of the effect of  $20 \mu\text{M}$  CAPS or  $1 \mu\text{M}$  Ionomycin on cells expressing the TRPV1-Luc/YFP-CaM constructs. Compounds were injected at the time indicated by a star. Data represent one out of five independent experiments. The time-constant ( $\tau$ ) of the BRET increase induced by CAPS is  $26.28 \pm 0.95$  s,  $n=5$ .

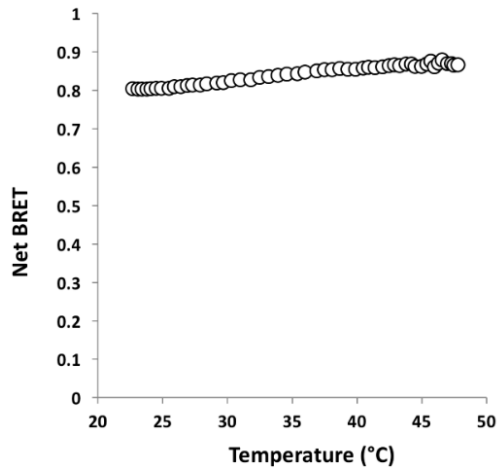
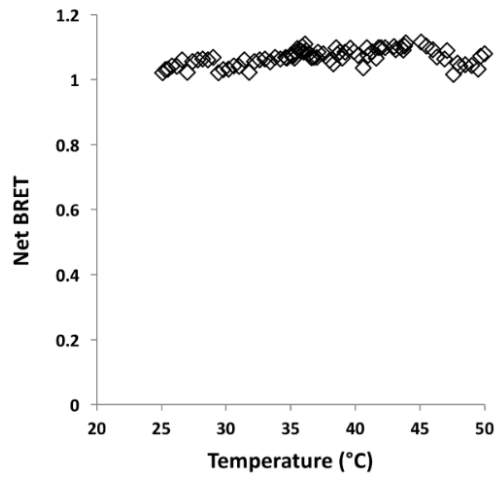
**A****B**

FIGURE S7 Effect of temperature on Net BRET measured on HEK293T cells transfected with YFP-Luc (A) or CD95-Luc/CD95-YFP (B).

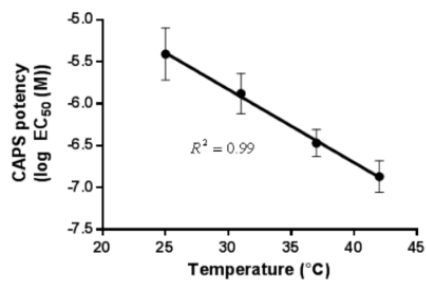
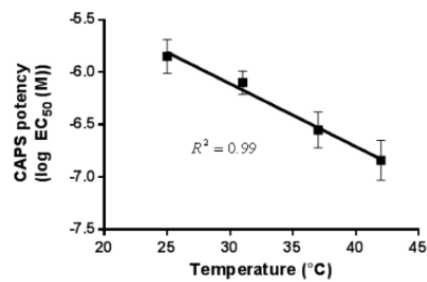
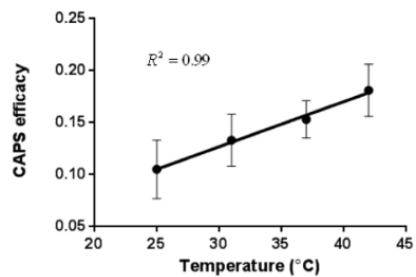
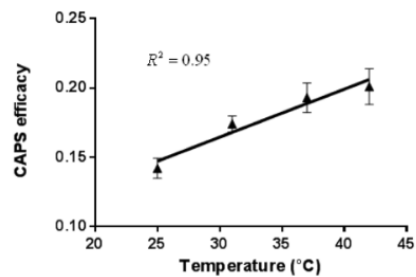
**A****B****C****D**

FIGURE S8 Pharmacological parameters derived from CAPS-dose response curves carried out at different temperatures in HEK293T cells expressing either YFP-TRPV1-Luc (A and C) or TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probes (B and D). CAPS Potency (A and B) is expressed as Log  $EC_{50}$  (M) and CAPS efficacy (B and D) is expressed as the net BRET variation between the minimum and maximum BRET values derived from sigmoidal dose-response curve fitting. Values represent the mean  $\pm$  standard error of five independent experiments performed in duplicate. For each set of data, a linear regression has been performed between either CAPS potency or efficacy and the temperature. The goodness of the fit,  $R^2$ , is indicated.

	Inhibitors			
	None (CAPS alone)	Vehicle	AMG517	CPZ
YFP-TRPV1-Luc	-6.50 ± 0.11	-6.44 ± 0.11 <sup>ns</sup>	-5.07 ± 0.10 <sup>***</sup>	-4.57 ± 0.16 <sup>**</sup>
TRPV1-Luc/YFP-CaM	-6.53 ± 0.16	-6.64 ± 0.14 <sup>ns</sup>	-4.78 ± 0.09 <sup>****</sup>	-4.29 ± 0.19 <sup>**</sup>

**Table S1** CAPS potency derived from BRET assays carried out in HEK293T expressing either YFP-TRPV1-Luc or TRPV1-Luc/YFP-CaM, activated with increasing doses of CAPS, with or without inhibitors (vehicle, CPZ 1 $\mu$ M, or AMG517 1 $\mu$ M). BRET assays were analyzed by nonlinear regression using the GraphPad-Prism software. Potency, expressed as Log EC<sub>50</sub> (M), was derived from sigmoidal dose-response curve fitting. Values represent the mean  $\pm$  standard error of four independent experiments performed in duplicate. Data were analyzed against the control condition (no inhibitors) for significance using unpaired Student's t test analysis with Prism software. Asterisks indicate statistical significance of the difference between the inhibitors conditions and control condition with \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . "ns" indicates no significant differences with the no inhibitor group ( $p > 0.05$ ).

### **2.3.2 Etude de l'effet des RF sur le canal TRPV1 – Article 2**

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

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 (Cao et al., 2014; Voets et al., 2004). 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 températures physiologiques.

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

## Activation of the TRPV1 Thermoreceptor Induced by Modulated or Unmodulated 1800 MHz Radiofrequency Field Exposure

Hermanus J. Ruigrok,<sup>a,b</sup> Delia Arnaud-Cormos,<sup>c</sup> Annabelle Hurtier,<sup>a,b</sup> Emmanuelle Poque,<sup>a,b</sup> Florence Poulletier de Gannes,<sup>a,b</sup> Gilles Ruffié,<sup>a,b</sup> Fabrice Bonnaudin,<sup>a,b</sup> Isabelle Lagroye,<sup>a,b,e</sup> Neso Sojic,<sup>b,d</sup> Stéphane Arbault,<sup>b,d</sup> Philippe Lévêque,<sup>c</sup> Bernard Veyret<sup>a,b</sup> and Yann Percherancier<sup>a,b,1</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5218, Talence, France; <sup>b</sup> Université de Bordeaux, Talence, France; <sup>c</sup> Université de Limoges, CNRS, XLIM, UMR 7252, F-87000 Limoges, France; <sup>d</sup> ISM, CNRS UMR 5255, NSYSA Group, ENSCBP, Pessac, France; and <sup>e</sup> Paris Sciences et Lettres Research University, Paris, France

---

**Ruigrok, H. J., Arnaud-Cormos, D., Hurtier, A., Poque, E., Poulletier de Gannes, F., Ruffié, G., Bonnaudin, F., Lagroye, I., Sojic, N., Arbault, S., Lévêque, P., Veyret, B. and Percherancier, Y. Activation of the TRPV1 thermoreceptor induced by modulated or unmodulated 1800 MHz radiofrequency field exposure. *Radiat. Res.* **189**, 000–000 (2017).**

The existence of effects of radiofrequency field exposure at environmental levels on living tissues and organisms remains controversial, in particular regarding potential “nonthermal” effects produced in the absence of temperature elevation. Therefore, we 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. 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, TRPV1 channels were activated by the heat produced by radiofrequency field exposure of transiently-transfected HEK293T cells, but found no evidence of TRPV1 activation in the absence of temperature elevation under radiofrequency field exposure. There was no evidence either that, at fixed temperature, radiofrequency exposure altered the maximal efficacy of the agonist Capsaicin to activate TRPV1. © 2017 by Radiation Research Society

---

*Editor's note.* The online version of this article (DOI: 10.1667/RR14877.1) contains supplementary information that is available to all authorized users.

<sup>1</sup> Email address for correspondence: yann.percherancier@ims-bordeaux.fr.

### INTRODUCTION

The biological and health effects of electromagnetic field (EMF) exposure have been very actively studied 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 well-described effects of radiofrequency (RF) fields on biological systems are caused by dielectric-relaxation heating. In contrast, “nonthermal” RF-EMF effects refer to other potential biological effects that are not caused by temperature elevation of living tissue or cell culture medium.

The investigation of underlying 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 (1–3), making difficult to draw conclusions on the basis of available experimental results (4). In contrast, there are nonthermal effects reported in the static and ELF-EMF frequency ranges (3). The existence of nonthermal RF-EMF biological effects to be considered when setting safety limits is therefore of primary importance: guidelines and standards have so far been set to protect solely from the known health risks associated with the thermal effects of RF-EMF exposures.

A new approach has been discussed by Roland Glaser (5) who suggested a study on the effects of RF EMF at the molecular level on known biological thermoreceptors. Based on this hypothesis for the detection of nonthermal effects, we have designed an experimental setup to assess how thermoreceptors in mammalian cells respond to RF-EMF exposure at the molecular level, in terms of both specific and thermal responses.

A very important class of such thermally sensitive molecules are the so-called transient receptor potential



vanilloid (TRPV) ion channel, which are found in membranes of various cells including neurons, keratinocytes and aorta endothelial cells (6, 7). 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 the TRPV1 (formerly VR1) channel exhibits a potent activation by capsaicin (CAPS), the pungent alkaloid of red pepper and by noxious heat, with a thermal threshold of 42°C (8). Importantly, the temperature response threshold of TRPV1 was shown to be shifted to more physiological temperature (32–37°C) under several experimental conditions including cell depolarization (6), presence of agonist, divalent cation or low-pH and following transient expression in cell lines (9, 10).

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 (11). 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 exposure to wireless communication-related RF-EMF signals (CW, GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi and WiMAX) using a 1,800-MHz carrier wave at a maximum SAR of 32 W/kg.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmids

pcDNA3.1-hTRPV1-Luc and pcDNA3.1-YFP-CaM constructions have been described by Ruigrok *et al.* (11).

### Reagents

Capsaicin and capsaizepine were acquired from Tocris (Bristol, UK). Coelenterazine H (Nanolight Technology, Pinetop, AZ) was added to a final concentration of 5  $\mu$ M.

### Cell Culture and Transfections

Embryonic kidney HEK293T cells (ATCC, Rockville, MD) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units ml<sup>-1</sup> 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 polyethylenimine (PEI, linear, Mr 25,000; Polysciences, Warrington, PA) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as explained in (11). Typically, transient transfections were performed using 8  $\mu$ g PEI, 0.25  $\mu$ g of the donor TRPV1-Luc and 1.75  $\mu$ g of the acceptor YFP-CaM. After overnight incubation, cells were then detached, and replated at a density of 10<sup>6</sup> cells onto glass coverslips (12 mm diameter, Knittel Glass, Braunschweig, Germany) treated with poly-L-lysine (0.1 g/L). Transfection efficiency reached 50–70%.

### 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, Acton, MA).

The glass coverslips containing the cells were placed into a white opaque measurement chamber made of Teflon and containing 1.5 ml of saline solution (NaCl 0.145 M, KCl 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, Glucose 10 mM). Coelenterazine H was added to the cells and full BRET spectra were acquired every 3 s and analyzed as described elsewhere (11). Results are expressed as  $\Delta$ BRET variations, i.e., differences between the BRET measured at the indicated time and the basal BRET measured at  $t_0$ . The basal BRET of the TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probe was  $0.166 \pm 0.040$ . When necessary, capsaicin was injected in the culture media, at the indicated concentrations and times, to activate TRPV1.

### RF-EMF Exposure System

The Teflon chamber hosting the HEK 293T cells was placed on the ground plane inside a transverse electromagnetic (TEM) cell in which the RF-EMF signal was propagating (Figs. 1 and 2) (12–14). Two 10-mm diameter holes were drilled in the septum and top ground plate of the TEM cell to insert the optic fiber for BRET signal measurements. The 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, respectively; RFPA, Artigues-Près-Bordeaux, France). The cell culture medium temperature was regulated using a Thermostat Plus microplate Peltier heater (Eppendorf, Hamburg, Germany) placed underneath the TEM ground plane and monitored using a fiber optic temperature monitoring system (Luxtron-812, Lumasense Technologies, Santa Clara, CA). Temperatures were recorded in real time along with the BRET data using a custom LabView interface described elsewhere (11). 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 (15, 16). Figure 2 shows the simulated structure. Due to the large size of the TEM cell and the small dimensions of the Teflon chamber, a nonuniform spatial discretization was used with a 100- $\mu$ m fine-mesh screen. The SAR distribution provided by FDTD simulations illustrated that higher SAR values were localized at the chamber bottom, i.e., at the level of the exposed biological cells (Fig. 3). The normalized SAR value within the cells layer was  $6.2 \pm 1.4$  W/kg/W (mean  $\pm$  SD), and the whole-volume mean SAR was  $5.2 \pm 1.9$  W/kg/W at 1,800 MHz (CW signal). The effect of the holes on field distribution was weak as shown in Supplementary Fig. S1 (<http://dx.doi.org/10.1667/RR14877.1.S1>) where the Ex and Ez-field components are plotted with and without holes. The holes and the BRET probe induce less than 5% variation in SAR level.

### Experimental Dosimetry

SAR evaluation was performed using a nonperturbing 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 signal at 1,800 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 EMF ON state ( $t = t_0$ ), temperature measurements were performed 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 Eq. (1):

BRET probe expressed in HEK293T cells

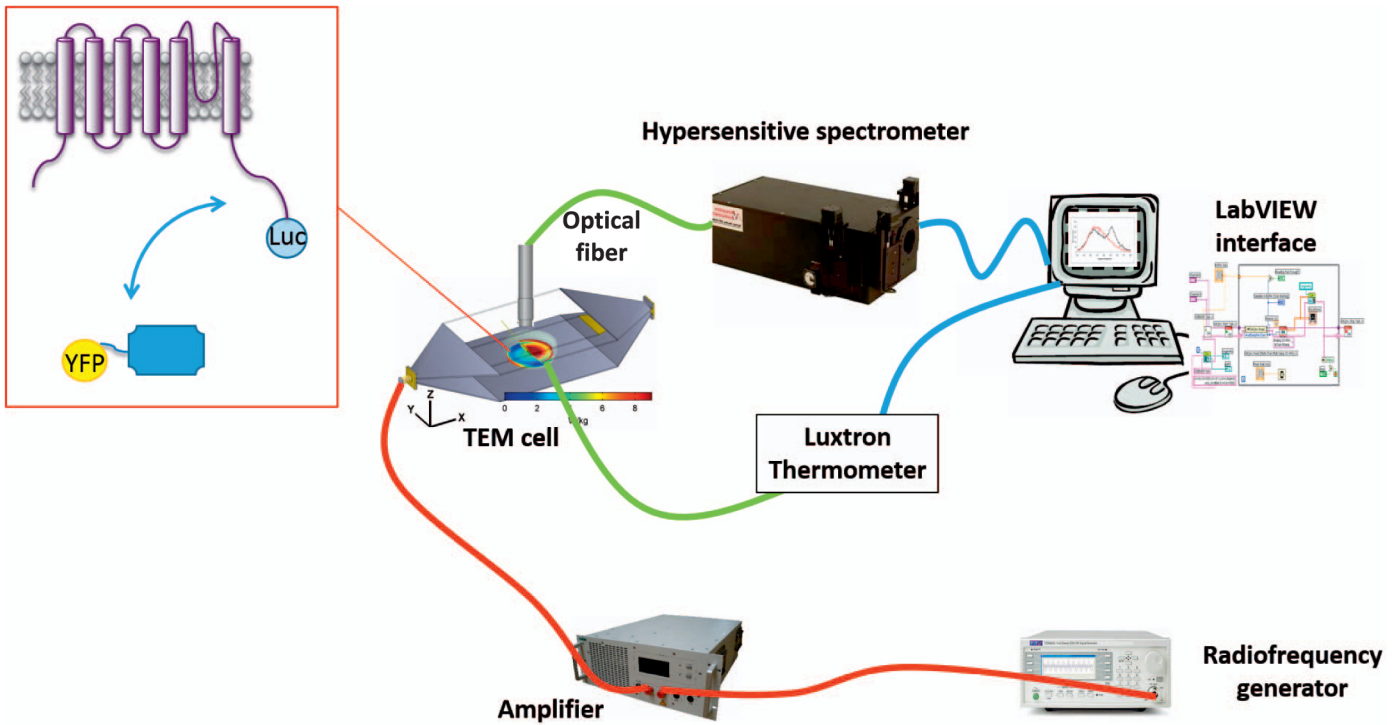


FIG. 1. Experimental design used to simultaneously expose cell cultures to RF EMF, measure temperature and acquire BRET signals.

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

where the term  $c$ , equal to 0.95, is the specific heat scale factor, 4186 is the sample specific heat expressed in  $J/(kg \text{ K})$ ,  $\Delta T$  is the change in temperature (in K) for time change  $\Delta t$  (in s).

Two temperature probe positions have been selected to assess the SAR values from the temperature measurement. For measurements carried out with the probe no. 1 position (Fig. 3), the Luxtron probe was tilted and inserted in the corner of the chamber, perpendicular to the longest axis of the TEM cell, through a hole made in the Teflon cylinder (Fig. 2). For the probe no 2 position, it was positioned vertically, along the cylinder axis, through the hole provided for optic fiber BRET signal measurement. A significant temperature increase is required to allow experimental SAR assessment. Therefore, a CW input power of 5 W was used giving SAR values of  $19.5 \pm 2.0 \text{ W/kg}$  and  $27.5 \pm 4.0 \text{ W/kg}$ , for two different probe positions. 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 agreement (Table 1). The simulated values may overestimate the SAR. This could be explained by some losses that are not precisely considered in the numerical modelling and simulations.

#### RF-EMF Generator Settings

Exposure conditions at various SAR levels between 8 and 32 W/kg were used in the experiments using a carrier wave of 1,800 MHz. 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 was measured using a power meter and a wideband power sensor (N1912A and N1921A, Agilent, Santa Rosa, CA). 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 amplification and losses, the TEM cell input powers were 1.25 and 5 W when the signal generator was set to  $-16.7 \text{ dBm}$  and  $-10.7 \text{ dBm}$ , respectively, using a CW signal.

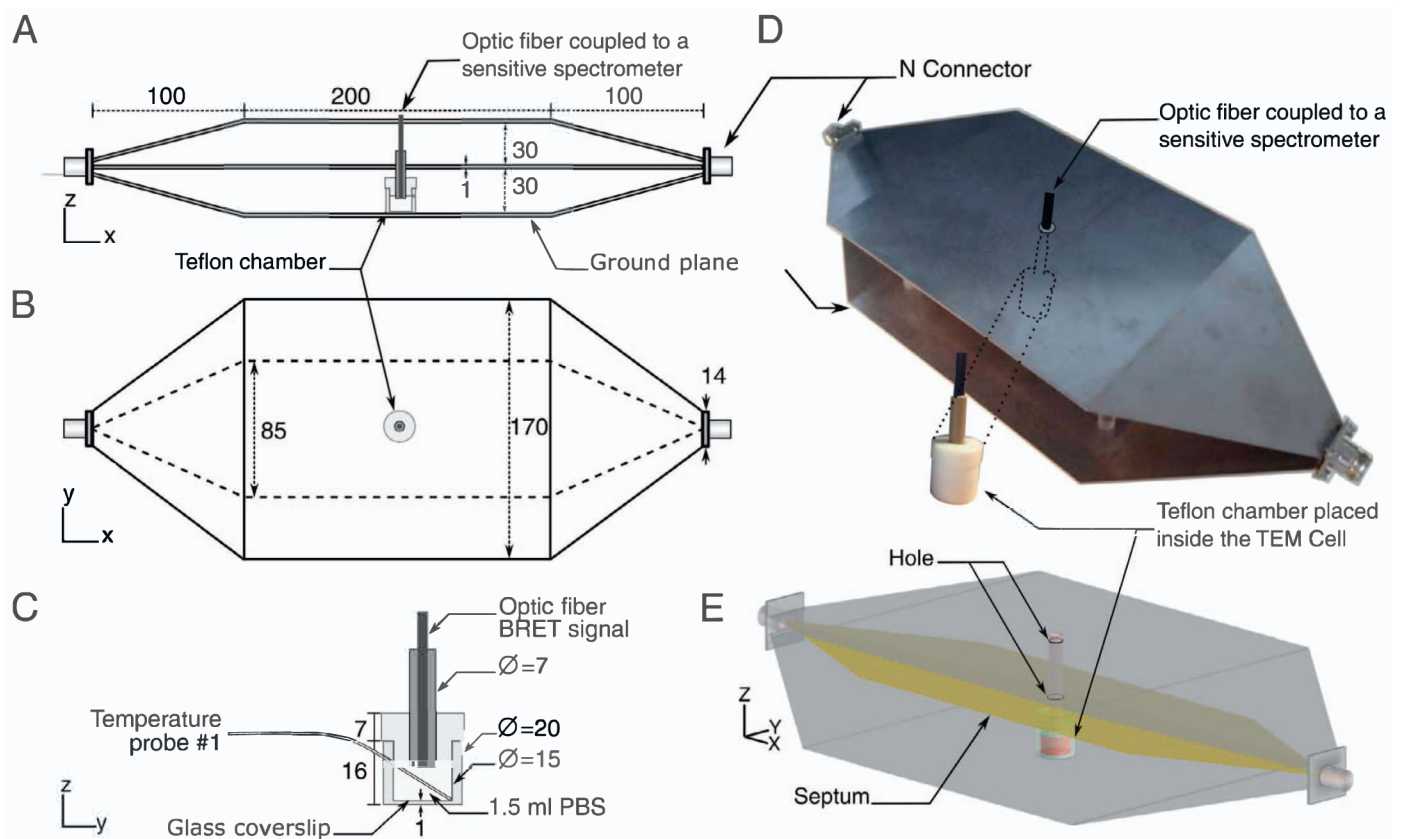
#### Statistical Analysis

Data were plotted using the Prism 6.01 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). Statistical analysis was performed using the Anstats software [Rilly sur Vienne, France (<http://www.anstats.fr/>)]. For amplitude comparison of effects among more than two groups, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used. When positive, the Mann-Whitney test was used to compare each group against the no-field or control group. For comparison between two groups, the Mann-Whitney test was used. Probabilities of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### TRPV1: Calmodulin BRET Probes Characterization

The hypothesis that RF EMF may specifically activate TRPV1 channels in live cells was tested using our recently developed TRPV1-CaM-BRET-based assay (Fig. 4A) (11). In that protocol, HEK 293T cells were transfected with TRPV1 and CaM constructs fused to Luciferase (Luc) as the bioluminescent energy donor, and Yellow Fluorescent Protein (YFP) as the compatible energy acceptor, respec-



**FIG. 2.** TEM-cell-exposure system and the Teflon chamber. Panels A and B: TEM-cell front and top views with the optic fiber coupled to spectrometer. Panel C: The chamber with the temperature probe at location number no. 1 and the glass coverslip containing the cells placed at the bottom. Panel D: 3D view of the stainless steel TEM cell with its copper septum, and the Teflon chamber with the optic fiber coupled to the spectrometer used for BRET measurement. Panel E: Numerical model of the Teflon chamber filled with 1.5 ml PBS inserted in the TEM cell. Two 10-mm diameter holes had been drilled in the septum and in the top of the TEM cell to insert the optic fiber for BRET signal measurement. (Dimensions are in mm.)

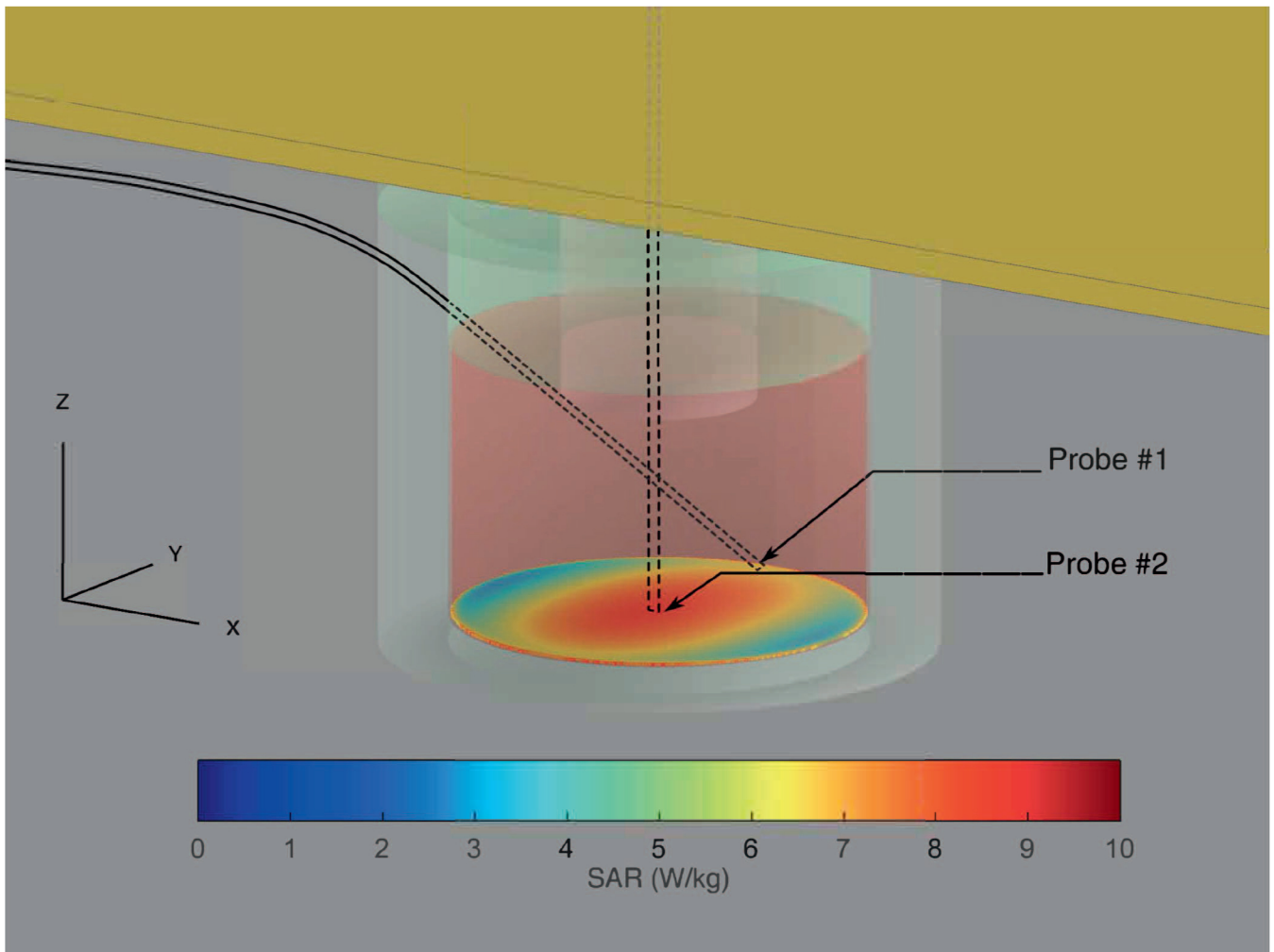
tively. Following TRPV1 activation by either heat or agonist, an increase in BRET signal was observed. Such BRET increase reflects both the formation of more TRPV1-CaM complexes and a conformational change in these complexes as a consequence of TRPV1 channel activation and gating (11). BRET signals are usually assessed using ultra-sensitive luminometers where the bioluminescent signal from the cell sample is measured in a microplate in a devoted dark chamber. These commercial devices are currently not suitable for real-time studies under RF-EMF exposure since, 1. no RF-EMF exposure system can be fitted inside the microplate reader and 2. 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, in order to measure both the BRET signal and the cell-culture medium temperature, while exposing the cell culture to RF EMF (Fig. 1; Materials and Methods).

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 27–45°C (Fig. 4B). 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 the temperature rise 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 (11).

#### *Effect of RF Exposure on TRPV1 Activation*

Based on the temperature response shown in Fig. 4B, HEK 293T cells expressing TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probes were exposed to a CW 1,800 MHz RF EMF at an initial temperature of 35°C. As seen in Fig. 4B, our TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probe was partially activated at 35°C, so that both directions of the potential effect of exposure on TRPV1 activity could be monitored. Temperature of the cell medium and BRET signal were simultaneously recorded before and during RF-EMF exposure. Immediately after the onset of RF exposure, we observed an increase in BRET signal indicating that TRPV1 was activated when raising the temperature using the RF-EMF source (Fig. 5A). A final



**FIG. 3.** SAR distribution provided by FDTD simulations within the cells layer for 1 W CW-input power at 1,800 MHz, with probe positions in the chamber for temperature measurements. The TEM mode propagates along the x axis.

temperature increase of ca. 5°C was observed under exposures at a whole volume SAR around 26.1 W/kg for 23 min (Fig. 5B). This corresponds to a SAR of 31.1 W/kg at the level of the cell layer.

In such experiments, direct nonthermal TRPV1 activation by RF-EMF exposure may have been hidden by the effect of RF heating. In order to discriminate a nonthermal TRPV1 activation from the thermal activation during RF-EMF exposure, the same experiment was thus performed using the Peltier plate to counteract RF-EMF heating in real-time. Stabilizing the cell-culture medium at 35°C under exposure at 31.1 W/kg dramatically modified the BRET signal that

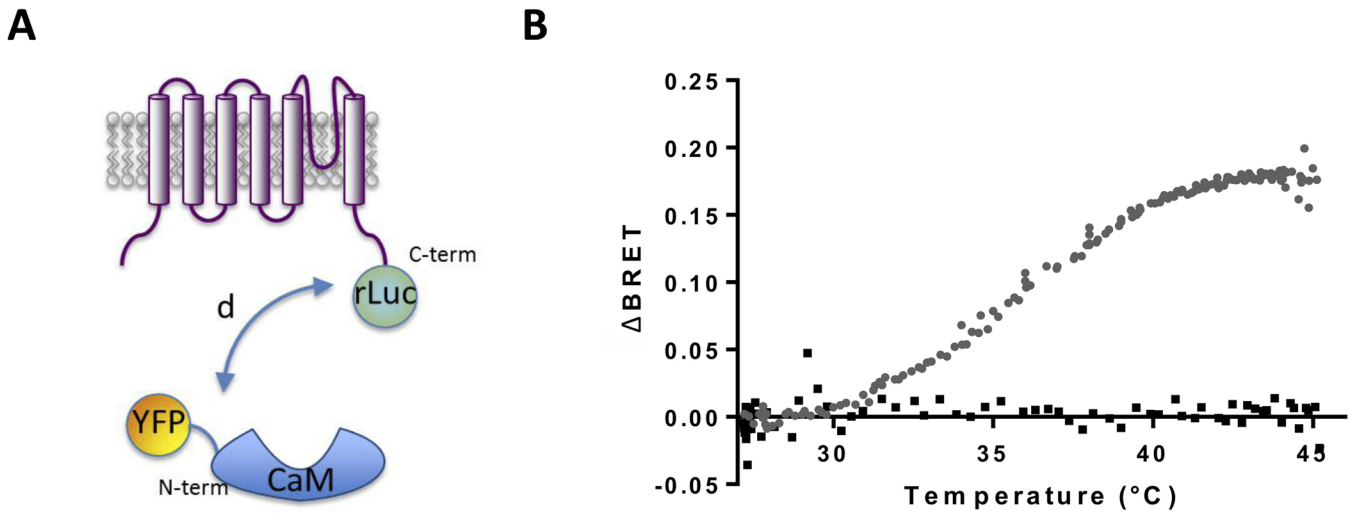
increased only weakly under CW RF-EMF exposure (Fig. 5A and B). This evolution of the BRET signal was not different from the no-EMF control condition meaning that the interaction of the TRPV1 with the CaM BRET probe did not vary under RF-EMF exposure at stable temperature.

**TABLE 1**  
Normalized SAR (W/Kg) Values Obtained from Numerical Simulations and Experimental Measurements for 1 W CW Input Power at 1,800 MHz

	Volume	Cell layer	Probe no. 1	Probe no. 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

**TABLE 2**  
Settings and Measurements of the Signal Generator Output Power for the Various 1,800 MHz RF-EMF Signals and for Different SAR Levels

Signal	Average power level (dBm)	SAR (W/kg) mean ± SD	
		1.5-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
	-16.6	6.9 ± 2.5	8.2 ± 1.9
UMTS	-10.6	27.4 ± 9.8	32.5 ± 7.7
	-16.9	6.7 ± 2.4	8.0 ± 1.9
LTE	-10.9	26.7 ± 9.6	31.8 ± 7.4
	-12.9	17.3 ± 6.2	20.5 ± 4.8
Wi-Fi	-8.9	16.1 ± 5.7	19.2 ± 4.5

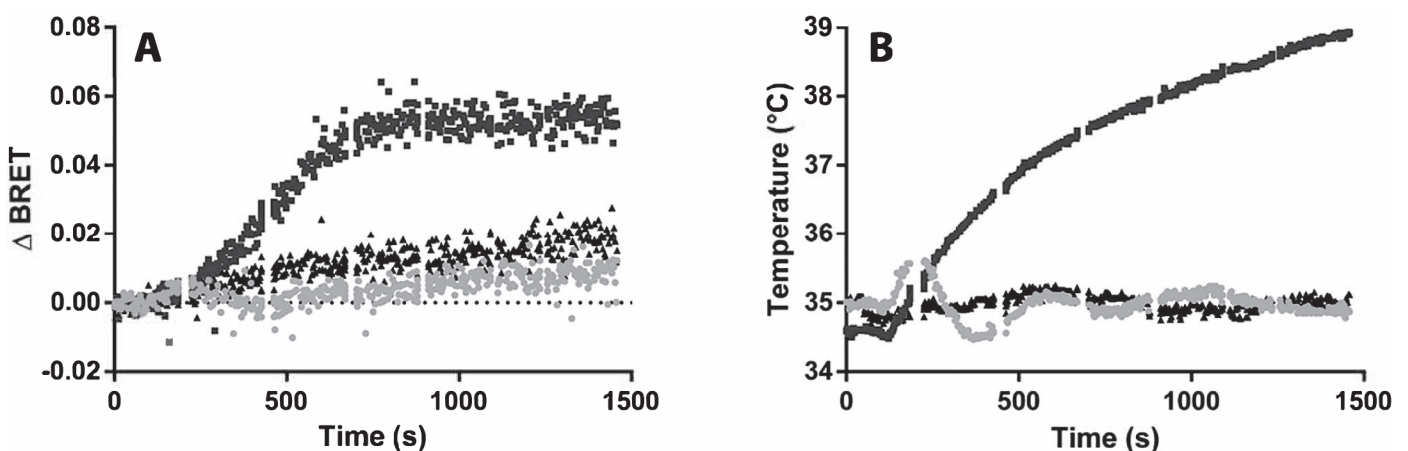


**FIG. 4.** TRPV1-Luc and YFP-CaM BRET probes construction and characterization. Panel A: Construction of the TRPV1-Luc and YFP-CaM BRET probes. cDNA of Luc and YFP were fused to the C-ter of TRPV1 and the N-ter of CaM, respectively. Panel B: Evolution of the BRET signal as a function of temperature in the cell culture medium. HEK 293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were heated from 25–45°C using a Peltier apparatus in the absence (gray circles) or presence (black squares) of the TRPV1 antagonist capsazepine. One representative experiment out of three is presented.

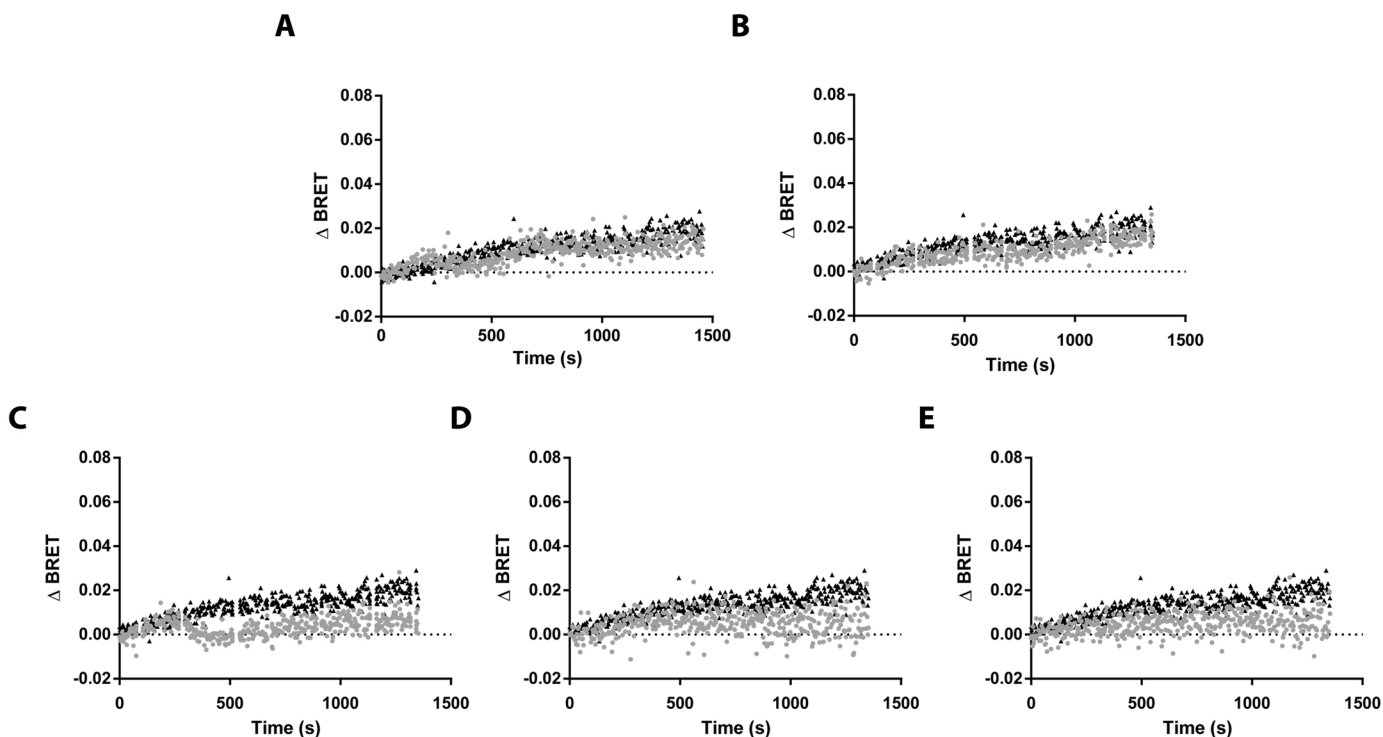
The effects of GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi and WiMAX signals emitted at levels between 19 and 38 W/kg (see Table 2) on TRPV1 activation were also assessed while maintaining the temperature at 35°C. No differences were found between RF-EMF-exposed and the no-EMF control conditions (Fig. 6). The experiments using CW, UMTS and LTE modulations at 1,800 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 (Supplementary Fig. S2; <http://dx.doi.org/10.1667/RR14877.1.S1>).

#### *Effects of Capsaicin and RF-EMF Exposures on TRPV1 Activation*

Given the polymodal and synergistic modes of activation of TRPV1, the sensitivity of TRPV1 to a chemical agonist is acutely tuned by experimental conditions such as temperature, membrane potential, extracellular pH and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (17). We therefore assessed the potential effect of RF-EMF exposure on the chemical mode of TRPV1 activation, using CAPS, a well-known TRPV1 agonist. We had previously confirmed that CAPS increased the TRPV1/CaM BRET probe signal in a dose-dependent



**FIG. 5.** Effects of CW 1,800 MHz on TRPV1 activation. HEK 293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were exposed to CW 1,800 MHz at  $31.1 \pm 7.3$  W/kg, starting at 120 s, and BRET (panel A) and temperature (panel B) were monitored in real time. Dark gray squares: Temperature was allowed to rise under RF exposure up to 40°C; light gray circles: temperature was stabilized at 35°C using a Peltier apparatus; black triangles: control without RF-EMF exposure at 35°C. One representative experiment out of four is presented.



**FIG. 6.** Exposure of cells to high level of modulated 1,800 MHz radiofrequency fields at 35°C. HEK 293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were exposed to (panel A) GSM-modulated at  $38.2 \pm 9.0$  W/kg ( $n = 2$ ); panel B: UMTS modulated at  $32.5 \pm 7.7$  W/kg ( $n = 2$ ); panel C: LTE-modulated at  $31.8 \pm 7.4$  W/kg ( $n = 2$ ); panel D: Wi-Fi modulated at  $20.5 \pm 4.8$  W/kg ( $n = 3$ ); and panel E: WiMAX modulated at  $19.2 \pm 4.5$  W/kg ( $n = 2$ ), starting at 120 s. Light gray circles: RF-EMF exposure condition. Temperature was stabilized at 35°C using a Peltier apparatus; black triangles: control without RF-EMF exposure at 35°C. One representative experiment out of  $n$  is presented for each 1,800 MHz signal.

manner with a potency that is consistent with those reported in the literature (11).

HEK 293T cells expressing TRPV1-Luc/YFP-CaM BRET probes were next exposed to 1,800 MHz RF EMF for 15 min, while maintaining the temperature at 35°C, before BRET measurement started and CAPS was injected (Fig. 7). As shown in Fig. 7, whichever modulation was applied, RF-EMF exposure did not significantly ( $P > 0.05$ ) 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.

## DISCUSSION

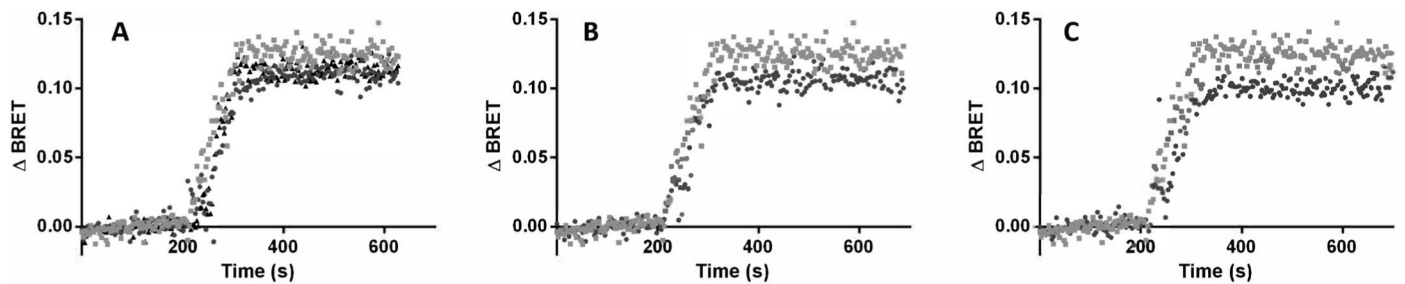
Taking advantage of our recently developed TRPV1/CaM-interaction BRET-based assay (11), we monitored TRPV1 activation in real time in live cells under chemical, heat, or RF-EMF exposure at 1,800 MHz with several modulations (CW, GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi and WiMAX) at various SAR levels ranging from 8 to 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-EMF exposure. Under those conditions, RF-EMF exposure did not change the activation state of TRPV1 (Fig. 5 and 6). 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. 7).

There have been only two studies by the same research group reporting effects of RF-EMF exposure that were attributed to TRPV1 processes (18, 19). In the former paper, it was shown that 1 h of pre-exposure to a 2.45 GHz Wi-Fi signal 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, 1,800 and 2,450 MHz. In both cases, TRPV1 activity was not measured in real time but more than 1 h after the end of the exposure. In view of the lack of proper dosimetry in those two studies, 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 (12, 14).

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 channels may be directly responding to RF EMF and not only to the heat produced by exposure. In that context, it was necessary to study the recent literature for information about the nature of the mechanisms of TRPVs activation.

Structural mechanisms underlying activation of the TRPV1 ion channel after capsaicin binding and heating have been described elsewhere, which involve distinct conformational



**FIG. 7.** Co-exposure of cells to 1,800 MHz RF and CAPS. HEK293T cells expressing TRPV1-Luc and YFP-CaM were exposed to 1,800 MHz RF signals for 15 min before coelenterazine H was injected and BRET signal was monitored each 3 s. At 200 s after Coelenterazine H injection, 30  $\mu$ M CAPS was injected to the cells. Results represent the average Kinetic response of CAPS effect on the TRPV1-Luc/YFP-CaM probes under CW exposure (panel A) at  $7.8 \pm 3.0$  W/kg (dark gray circle) or  $31.1 \pm 7.3$  W/kg (black triangle), GSM exposure (panel B) at  $38.2 \pm 9.0$  W/kg (dark gray circle) or Wi-Fi exposure (panel C) at  $20.5 \pm 4.8$  W/kg (dark grey circle). In each panel, Sham (light gray square) was performed without RF exposure. Results represent the average of 4 independent experiments.

changes (20, 21). 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 affects 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 (17), but RF-EMF exposure in the GHz range cannot alter membrane potential as ELF-EMF exposure does (3).

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 0.1–0.3 mW/kg (22, 23). Since some thermally activated TRP ion channels are known to detect warmth (TRPV3 and TRPV4) and coolness (TRPM8 and TRPA1) (24, 25), we plan to investigate the potential interaction of these ionic channels with RF EMF in a near future. In that respect, the BRET technique represents an innovative and powerful approach to monitor these molecular mechanisms in real time and on live cells under exposure.

Our underlying hypothesis was that some thermoreceptors may be directly sensitive to RF exposure, in parallel to their intrinsic response to the heat produced by RF. In this study, we found no evidence of such nonthermal mechanism on the activity of the TRPV1 thermoreceptor. Further studies on other TRPs, and other families of ionic channels, will be performed to strengthen this conclusion. However, with respect to the knowledge in basic physics, it is likely that there are no nonthermal receptors specific to the RF-spectrum range, within which there are no electronic resonant absorptions, as opposed to the visible range (e.g., the visual pigment).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-

2013) under grant agreement no. 603794 (the GERONIMO project), from the "Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie" (ADEME) and the "Conseil Régional d'Aquitaine".

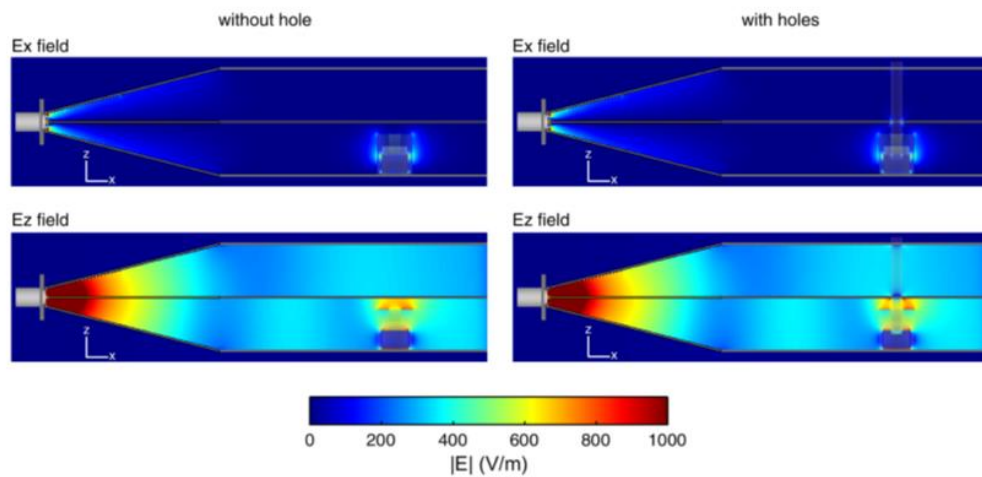
Received: July 3, 2017; accepted: September 20, 2017; published online: Month 00, 2017

#### REFERENCES

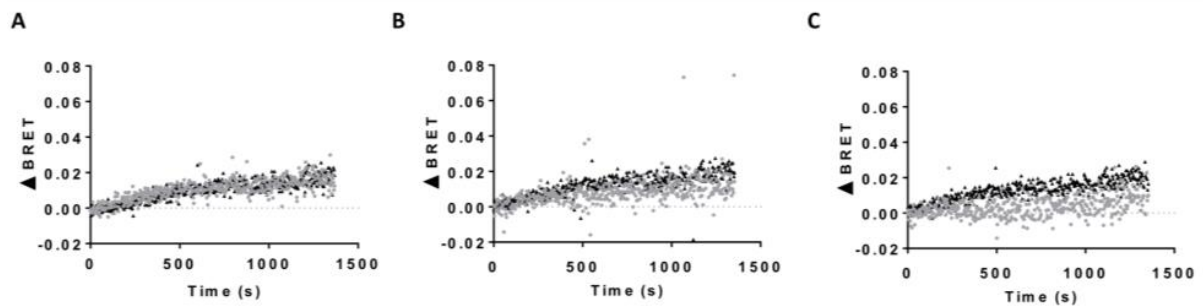
1. Foster KR, Repacholi MH. Biological effects of radiofrequency fields: does modulation matter? *Radiat Res* 2004; 162:219–25.
2. Sheppard AR, Swicord ML, Balzano Q. Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. *Health Phys* 2008; 95:365–96.
3. SCENIHR. Potential Health Effects of Exposure to Electromagnetic Fields (EMF). January 27, 2015. (<http://bit.ly/2xtvKHi>)
4. Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz). Vecchia P, Matthes R, Lin JC, Saunders RD, Ziegelberger G, Swerdlow A, editors. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 2009. (<https://www.emf-portal.org/en/article/17358>)
5. Glaser, R. Are thermoreceptors responsible for "non-thermal" effects of RF fields? *Wissenschaft* 2005; 21:3–13. (<http://bit.ly/2yaIdPg>)
6. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 2004; 430:748–54.
7. Wetsel WC. Sensing hot and cold with TRP channels. *Int J Hyperthermia* 2011; 27:388–98.
8. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389:816–24.
9. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 2004; 430:748–54.
10. Ruigrok HJ, Shahid G, Goudeau B, Poulletier de Gannes F, Poque-Haro E, Hurtier A, et al. Full-spectral multiplexing of bioluminescence resonance energy transfer in three TRPV channels. *Biophys J* 2017; 112:87–98.
11. Cao X, Ma L, Yang F, Wang K, Zheng J. Divalent cations potentiate TRPV1 channel by lowering the heat activation threshold. *J Gen Physiol* 2014; 143:75–90.
12. O'Connor RP, Madison SD, Leveque P, Roderick HL, Bootman MD. Exposure to GSM RF fields does not affect calcium homeostasis in human endothelial cells, rat pheochromocytoma cells or rat hippocampal neurons. *PLoS One* 2010; 5:e11828.
13. Tanvir S, Thuróczy G, Selmaoui B, Silva Pires Antonietti V, Sonnet P, Arnaud-Cormos D, et al. Effects of 3G cell phone

- exposure on the structure and function of the human cytochrome P450 reductase. *Bioelectrochemistry* 2016; 111:62–9.
14. Kohler S, Ticaud N, Iordache M-M, Moisescu MG, Savopol T, Leveque P, Arnaud-Cormos D. Setup for simultaneous microwave heating and real-time spectrofluorometric measurements in biological systems. *Pro Electromag Res* 2014; 145:229–40.
  15. Leveque P, Reineix A, Jecko B. Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas: application of FDTD method. *Electronics Letters* 1992; 28:539–41.
  16. Taflove A, Hagness SC. *Computational electrodynamics: the finite-difference time-domain method*. Boston: Artech House; 1995.
  17. Zheng J. Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol* 2013; 3:221–42.
  18. Ghazizadeh V, Nazıroğlu M. 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* 2014; 29:787–799.
  19. Çiğ B, Nazıroğlu M. 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* 2015; 1848:2756–65.
  20. Yang F, Xiao X, Cheng W, Yang W, Yu P, Song Z, et al. Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol* 2015; 11:518–24.
  21. Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG. Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. *Sci Rep* 2016; 6:33112.
  22. Pelletier A, Delanaud S, Décima P, Thuroczy G, de Seze R, Cerri M, et al. Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy balance in developing rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20:2735–46.
  23. Pelletier A, Delanaud S, de Seze R, Bach V, Libert JP, Loos N. Does exposure to a radiofrequency electromagnetic field modify thermal preference in juvenile rats? *PLoS One* 2014; 9:e99007.
  24. Tan CH, McNaughton PA. The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 2016; 536:460–3.
  25. Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals. *Nature Reviews Neuroscience* 2014; 15:573–89.





**Supplementary figure 1.** Electric field distribution provided by FDTD simulations within the TEM cell for 1 W CW input power at 1800 MHz. The distributions  $E_x$  and  $E_z$  are plotted along the vertical  $xOz$  plane in the middle of the TEM cell (symmetry plane).  $E_y$  component is zero in the symmetry plane. Only part of the structure is drawn.



**Supplementary figure 2.** 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 (Panel A) CW-modulated 1800 MHz at  $7.8 \pm 3.0$  W/kg ( $n=2$ ), (Panel B) UMTS 1800 MHz at  $8.2 \pm 1.9$  W/kg ( $n=3$ ), and (Panel C) LTE 1800 MHz at  $8.0 \pm 1.9$  W/kg ( $n=3$ ), starting at 120 s. **Light grey circles:** RF EMF exposure condition. Temperature was stabilized at 35 °C using a Peltier apparatus; **Black triangles:** control without RF exposure at 35 °C. One representative experiment is presented for each signal.

### **3 Deuxième approche : analyse globale du comportement cellulaire sous exposition RF**

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. Dans ce contexte, 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, appelées en anglais label-free, a révolutionné les activités de recherches liées au criblage de substances actives.

Après avoir introduit plus en avant les techniques sans marquage de l'étude du comportement cellulaire, nous exposerons comment nous avons adapté la mesure du comportement cellulaire à l'aide de l'impédancemétrie à l'étude des effets cellulaires des RF.

#### **3.1 Introduction aux techniques sans-marquages**

Afin de comprendre le fonctionnement d'une cellule, laquelle représente l'unité basique fonctionnelle de la vie, la manipulation de cibles moléculaires (protéines, ADN...) est réalisée en routine dans les laboratoires. Or, la surexpression d'une protéine ou son inhibition (afin de mieux observer son rôle), le marquage d'une protéine à l'aide d'un fluorochrome (pour étudier sa localisation cellulaire), place la cellule dans des conditions non naturelles et peut engendrer un biais dans l'analyse. De plus, ces méthodes ne permettent d'observer qu'un seul événement cellulaire à la fois. Depuis quelques années, l'apparition de techniques dites « sans-marquages » ou « label-free » en anglais, rendent possible l'étude d'une cellule ou d'une population cellulaire dans son ensemble, de manière non-invasive et en temps réel.

Les technologies sans-marquages utilisent des capteurs ou biocapteurs capables de convertir une réponse cellulaire induite par un stimulus en un signal quantifiable. La plupart

des techniques utilisées pour l'étude comportementale d'une population cellulaire sont basées soit sur l'optique, soit sur l'électronique.

### 3.1.1 Biocapteurs optiques

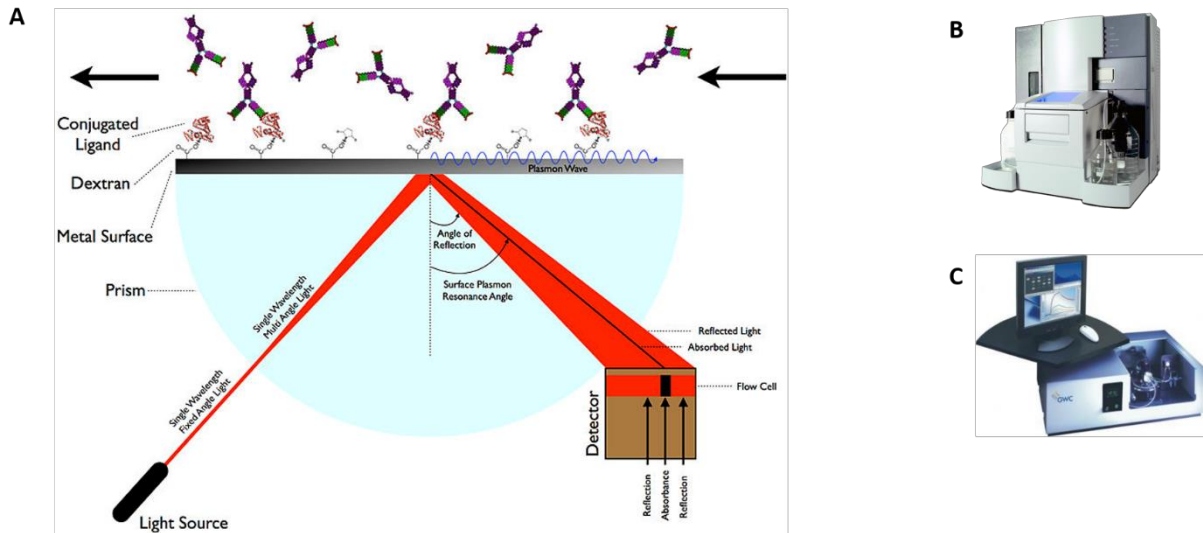
Les biocapteurs optiques se basent principalement sur deux méthodes très utilisées dans les technologies label-free : la résonance plasmonique de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance en anglais), et le réseau de guide d'onde résonant (RWG pour Resonant waveguide grating en anglais).

La SPR utilise des plasmons de surface, qui sont des ondes électromagnétiques liées à une surface, provenant d'une interaction entre la lumière et des charges de surfaces mobiles dans un métal. Ces ondes se propagent le long de l'interface entre des matériaux possédant des permittivités négatives et positives (par exemple, une interface métal/milieu diélectrique), produisant un champ électromagnétique dont l'amplitude décroît de manière exponentielle avec la distance à l'interface. Ces ondes sont très sensibles à toutes modifications au niveau de la surface et peuvent détecter l'adsorption de molécules sur le métal (Figure 21A). Le faisceau de lumière qui permet d'exciter les plasmons de surface, traverse un prisme et est réfléchi par la surface métallique. Une partie de la lumière réfléchie est absorbée, phénomène causé par les plasmons de surfaces. L'ensemble de la lumière réfléchie et absorbée est capté par un détecteur et converti en un signal quantifiable (Fang, 2011). Si, initialement, la SPR ne permettait que d'étudier des affinités de liaisons ou des cinétiques d'interactions, cette technique est aujourd'hui utilisée pour faire de l'imagerie, mais ne permet pas de faire du criblage à haut débit. La compagnie GE Healthcare commercialise plusieurs séries de SPR dont le Biacore T200<sup>6</sup> (Figure 21B), et la compagnie GWC instruments commercialise le SPR imager II<sup>7</sup> (Figure 21C).

---

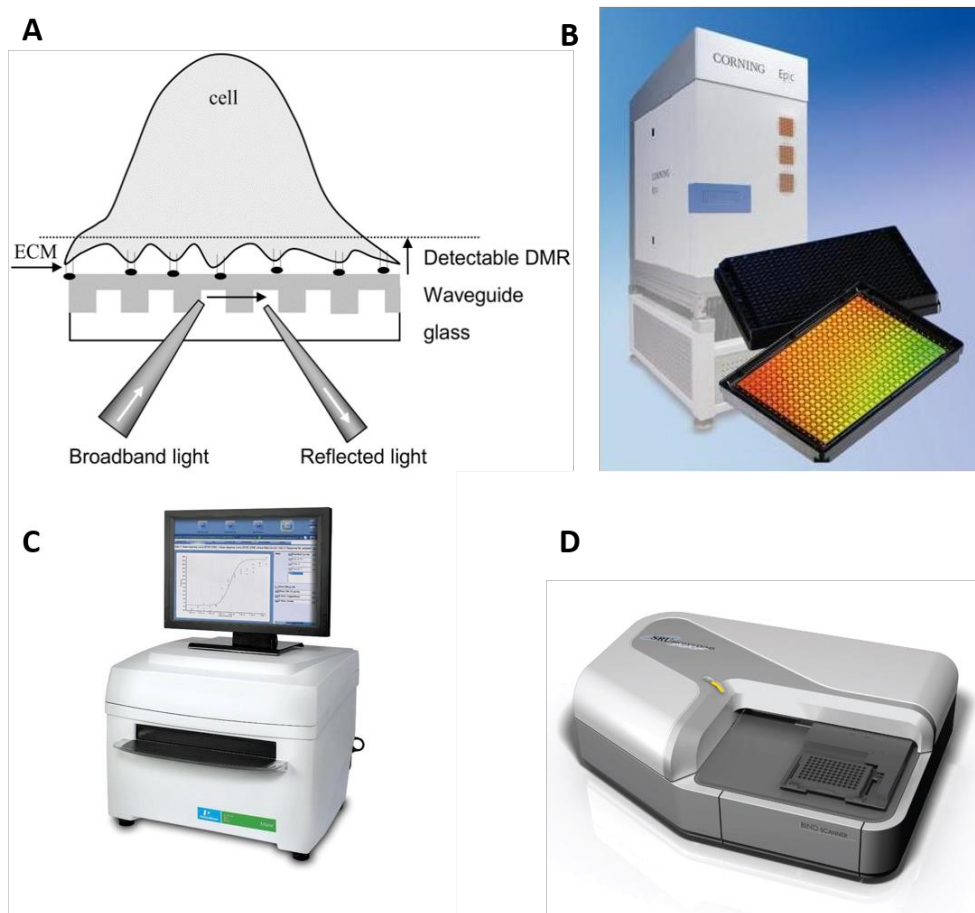
<sup>6</sup> <http://proteins.gelifesciences.com/products-for-proteins/spr-systems/biacore-t200/>

<sup>7</sup> <http://www.gwctechnologies.com/gwcsprimager.htm>



**Figure 21.** La résonance de plasmons de surface. (A) Fonctionnement du SPR. (B) Le Biacore T200 de chez GE Healthcare. (C) Le SPRImager II de chez GWC.

La RWG utilise un réseau de guide d'ondes nano-structuré sur lequel sont déposées les cellules. Quand le fond du puits de mesure est excité sous un angle précis à l'aide d'une source de lumière polarisée et large spectre, la plupart de la lumière est transmise mais le réseau de guide d'onde permet le couplage et la propagation de certaines longueurs d'ondes qui entrent en résonance avec le guide d'onde (Figure 22A). Ces longueurs d'onde résonantes sont dépendantes de l'indice de réfraction locale, près de la surface du capteur, à savoir l'espace au-dessus du fond du puits sur une épaisseur d'environ 150 nm. En effet, une petite partie de l'onde propagée dans le guide d'onde va pouvoir se propager dans la partie inférieure du puits de mesure sous forme d'onde évanescente. Dans cette zone dite « sensible », les cellules, en modifiant l'indice de réfraction entre la surface du guide d'onde et le fond du puits, vont modifier les propriétés de l'onde réfléchi par le réseau de guide d'onde. Les cellules vivantes étant dynamiques par nature, leur masse intracellulaire va se redistribuer lors d'une réaction cellulaire. Cette modification de la répartition de la masse cellulaire (en anglais, Dynamic Mass Redistribution (DMR)) va de fait entraîner une modification de l'onde réfléchi sur le réseau de guide d'onde. La mesure de l'onde réfléchi donne de fait une indication sur l'état des cellules déposées sur le capteur optique (Figure 22A).



**Figure 22.** Réseau de guide d'onde résonant. (A) Structure du biocapteur optique utilisant un réseau de guide d'onde résonant. (B) Le système Epic de chez Corning. (C) Le système EnSpire de chez Perkin Elmer. (D) Le système BIND de chez SRU BioSystems.

Aujourd'hui, le système RWG est la première plateforme commerciale pour le criblage à haut-débit de tests biochimiques et cellulaires. Les produits commerciaux incluent le système Epic<sup>8</sup> de chez Corning (Figure 22B), le lecteur multimodal EnSpire<sup>9</sup>, qui contient par ailleurs une technologie Epic, de chez PerkinElmer (Figure 22C), et le système BIND de chez SRU BioSystems (Figure 22D).

<sup>8</sup> <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/label-free-detection.html>

<sup>9</sup> <http://www.perkinelmer.com/product/enspire-base-unit-2300-0000>

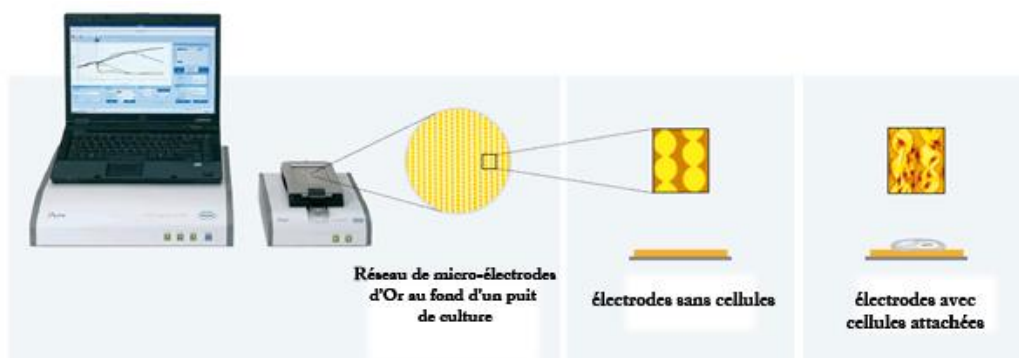
### 3.1.2 Biocapteurs électriques

Les biocapteurs électriques utilisent principalement des mesures d'impédance pour quantifier la réponse cellulaire, en particulier des cellules adhérentes.

L'impédance est une généralisation de la loi d'Ohm pour les circuits électriques en courant alternatif et mesure l'opposition du système au passage du courant appliqué. L'impédance apparente, notée  $Z$ , se mesure en ohm et est définie comme le rapport de la tension (volt) sur l'intensité (ampère), et est fonction de la fréquence :

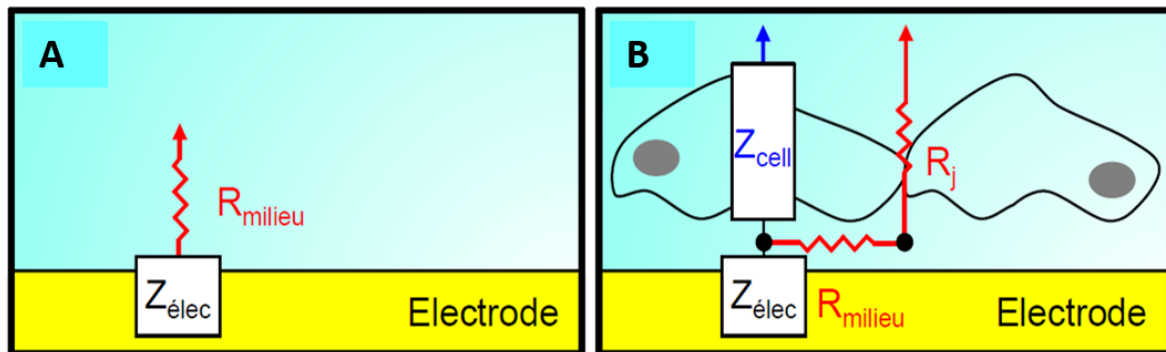
$$Z(f) = V(f) / I(f)$$

Dans les appareils utilisant des biocapteurs électriques, des microélectrodes en or formant un réseau interdigité co-planaire tapissent le fond de puits de cultures sur lequel des cellules sont déposées et se fixent (Figure 23). L'or est un très bon conducteur possédant une faible résistance. Il est chimiquement inerte et est compatible dans des conditions physiologiques avec des modifications de surface (traitement de surface de type poly-L-ornithine, poly-lysine, etc.). Le réseau d'électrodes d'or forme un condensateur aux bornes duquel une tension alternative est appliquée à une gamme de fréquences  $V(f)$ , et les courants électriques résultants  $I(f)$  sont mesurés. Le milieu de culture cellulaire ajouté dans les puits de la microplaque joue le rôle d'« électrolyte » en permettant au courant de circuler d'une électrode à une autre. La présence de cellules sur les électrodes va avoir pour effet d'affecter localement l'environnement ionique (à l'interface électrodes/solution) en induisant une augmentation de l'impédance. Tout changement dans les propriétés physiologiques des cellules conduit donc à une variation de la mesure d'impédance cellulaire.



**Figure 23.** Représentation schématique du système XCELLigence (ACEA) et des cellules sur le réseau de microélectrodes tapissant le fond des puits de mesure.

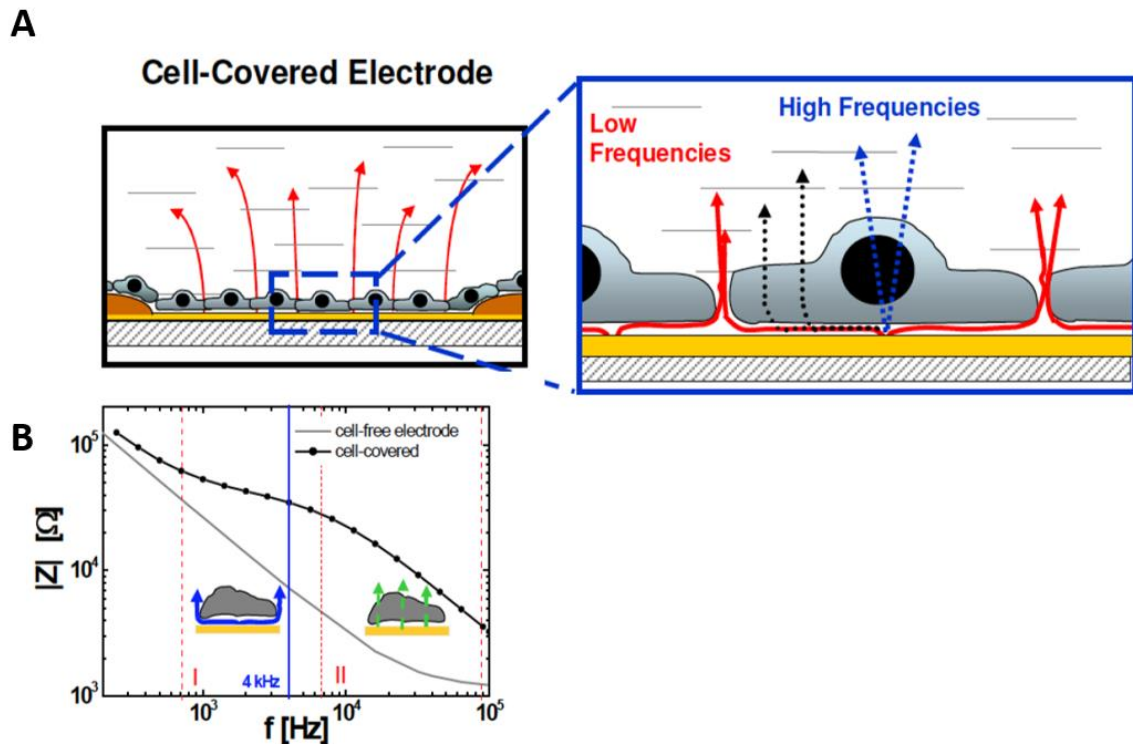
De manière simplifiée, le système peut être modélisé par un circuit électrique (Figure 24).



**Figure 24.** Modélisation simplifiée du système xCELLigence au niveau de l'interface électrode/cellule. (A) En l'absence de cellules, l'impédance a principalement deux composantes : l'impédance à l'interface électrodes/milieu ( $Z_{\text{élec}}$ ) et la résistance du milieu extracellulaire ( $R_{\text{milieu}}$ ). (B) En présence de cellules, l'impédance présente les mêmes composantes que précédemment auxquelles se rajoutent l'impédance des cellules ( $Z_{\text{cell}}$ ) représentées majoritairement par la capacitance membranaire et la résistance membranaire.  $R_j$  correspond à la résistance au niveau des contacts intercellulaires. Flèche rouge : circulation majoritaire du courant à basse fréquence. Flèche bleue : circulation majoritaire du courant à haute fréquence.

Dans le système représenté dans la Figure 24B, la circulation du courant au sein du puits dépend de la fréquence utilisée. Ce paramètre est important car en fonction de la fréquence utilisée, l'impact de la monocouche cellulaire sur la valeur d'impédance sera différent. Pour des courants de fréquence faible (en dessous de 2-4 kHz), le courant se déplace préférentiellement autour et entre les cellules (Figure 24B et Figure 25). A ces basses fréquences, la membrane plasmique agit comme un isolant et le courant n'est pas en mesure de traverser la cellule. La mesure de la variation d'impédance dans cette gamme de fréquence donne principalement des informations sur les modifications intervenant au niveau des contacts intercellulaires et des

contacts entre les cellules et le support (adhésion)<sup>10</sup>. Pour des courants de plus hautes fréquences (supérieures à 10 kHz), le courant se déplace principalement au travers des cellules (Figure 24B et Figure 25). Dans cette gamme de fréquence, la valeur d'impédance est principalement affectée par l'état des cellules incluant le nombre de cellules, la morphologie cellulaire et l'adhésion des cellules aux électrodes (Figure 25).



**Figure 25.** Illustration du déplacement du courant en fonction de la fréquence utilisée au niveau de l'interface électrode/cellule. (A) À de basses fréquences, le courant se déplace principalement autour et entre les cellules (flèches rouges). À de hautes fréquences, le courant se déplace principalement au travers des cellules (flèches bleues). À des fréquences intermédiaires le courant peut utiliser les deux voies en fonction de la fréquence (flèches noires). (B) Diagramme de Bode représentant l'influence de la fréquence du courant sur l'impédance en présence ou non de cellules. Dans ce système, l'impédance des courants

<sup>10</sup> L'appareillage ECIS® développé par la société Applied BioPhysics permet de réaliser ce type d'analyse en ajustant la fréquence appliquée au système : <http://www.biophysics.com/index.php>



extracellulaires domine entre 1 – 10 kHz (section I) alors qu'à partir de 10 kHz ce sont les courants transmembranaires qui influencent la mesure (section II) (Stolwijk et al., 2015).

Différents instruments utilisent la mesure d'impédance des cellules, parmi lesquels l'ECIS<sup>11</sup> (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) de Applied Biophysics (NY, USA) (Figure 26A), l'xCELLigence<sup>12</sup> de Roche/Acea Biosciences (San Diego, CA, USA) (Figure 26B) (cette technologie sera décrite de façon plus détaillée dans le chapitre 3.2.1), et le Cellkey<sup>13</sup> de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) (Figure 26C) (Fang, 2011).



**Figure 26.** *Biocapteurs électriques.* (A) Système ECIS de chez Applied Biophysics. (B) Système xCELLigence de chez Roche/ACEA Biosciences. (C) Système Cellkey de chez Molecular Devices.

### 3.1.3 Étude des fonctions cellulaires à l'aide des techniques label-free

Les premières versions des technologies label-free étaient limitées à l'étude de l'adhésion cellulaire et la cytotoxicité. Giaever et Keese avaient initialement découvert que des fibroblastes déposés sur des électrodes d'or sous un champ électrique alternatif à 4 kHz avaient un effet sur l'impédance des biocapteurs et que cette impédance variait avec le temps et la croissance des cellules (Giaever and Keese, 1984). Cette étude a été d'une grande importance pour le développement du système commercialisé ECIS. D'autres auteurs ont utilisé la SPR

---

<sup>11</sup> <http://www.biophysics.com/>

<sup>12</sup> <https://www.aceabio.com/>

<sup>13</sup> <https://www.moleculardevices.com/>

afin d'étudier l'adhésion de cellules endothéliales bovines sur une surface en or recouverte d'alkanéthiولات (Fang, 2011). La mesure d'impédance cellulaire et la RWG ont été utilisées avec succès pour la caractérisation des fonctions de barrières cellulaires, telles que les barrières formées par les cellules épithéliales ou la barrière hémato-encéphalique. Ces techniques ont aussi permis d'étudier les mécanismes d'actions de drogues et la signalisation au travers des récepteurs couplés aux protéines G (Fang et al., 2005), ou via des canaux ioniques (Pänke et al., 2011), mais également l'activité cytotoxique de composés chimiques, les effets cytopathiques causés par un virus (McCoy and Wang, 2005; Owens et al., 2009), la prolifération et la différenciation cellulaire ou encore la chimiotaxie<sup>14</sup>. Concernant l'impédancemétrie plus particulièrement, il a été montré récemment que cette technique permettait de caractériser l'activité de composés particulièrement 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 les banques de composés potentiellement actifs.

Les techniques sans-marquages permettent de mesurer des cinétiques en temps réel sur plusieurs jours avec une résolution temporelle et une sensibilité élevée. Les techniques sans-marquages ont rendu possible l'étude de la signalisation cellulaire sur des cellules natives ou encore l'étude de l'action de drogues sur cellules entières en intégrant tous les processus cellulaires et pas seulement sur une cible moléculaire. Toutefois, ces techniques sans-marquages restent complémentaires des techniques de marquage. En effet, elles ne possèdent pas de résolution spatiale intracellulaire. Les techniques de marquages sont aujourd'hui toujours nécessaires pour déterminer la localisation d'une molécule ou l'interaction d'une protéine avec d'autres partenaires.

---

<sup>14</sup> <https://aceabio.com/real-time-cell-analysis-applications/>

## 3.2 Analyse globale du comportement cellulaire sous exposition RF à l'aide de l'impédancemétrie

### 3.2.1 Utilisation de l'impédancemétrie en bioélectromagnétisme

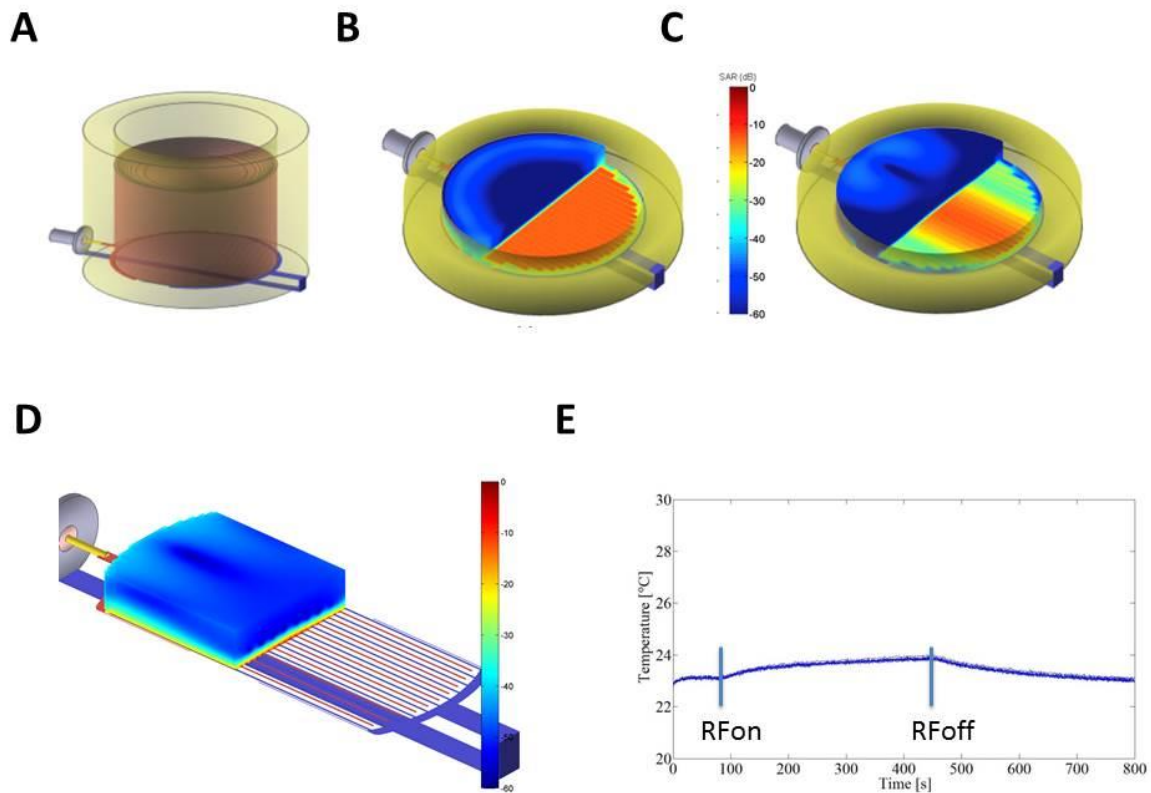
Nous avons proposé d'utiliser la mesure d'impédance pour intégrer l'ensemble des réactions cellulaires potentiellement causées par l'exposition aux différents types de signaux RF et de cribler grâce à cette technique les paramètres des champs efficaces. L'impédancemétrie s'est avérée être une technique 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 système xCELLigence (Figure 23) pour non seulement enregistrer la mesure de l'impédance mais également pour émettre les RF au plus près des cellules avec un DAS théoriquement important. Différentes étapes ont été nécessaires à l'équipe de Philippe Lévêque (Laboratoire XLIM, UMR 7252, Université de Limoges), 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 (Figure 27A).
- 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 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 2 kW/kg par watt incident (Figure 27B-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 (Figure 27E).

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 (Figure 27), ce qui permet d'envisager des expérimentations avec des puissances incidentes faibles (de l'ordre de quelques mW à quelques dizaines de mW).

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue IEEE Trans. Biomed. Engineering en 2016 (M. Á. García-Fernández et al., 2016).



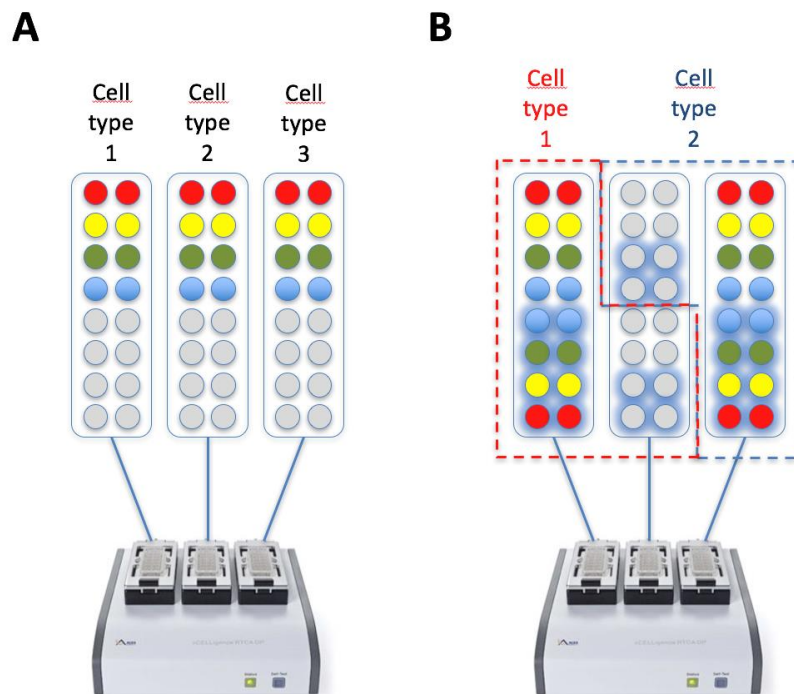
**Figure 27.** Dispositif développé et caractérisé à partir de la plaque 16 puits de l'appareil d'impédancemétrie xCELLigence. (A) modélisation de la structure en considérant un seul puits. (B et C) distribution spatiale de DAS à 13.56 MHz (B), et à 1800 MHz (C) dans le plan des cellules et dans le milieu 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 environ 2400 W/kg.

Suite à ce travail préliminaire, l'équipe de recherche de Philippe Lévêque a pu transformer un système xCELLigence qui contient trois plateformes indépendantes (système DP) 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 (Figure 28).



**Figure 28.** *Vue de côté et de face du système xCELLigence modifié afin de permettre de délivrer des RF 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 (Figure 29). En utilisant le schéma expérimental de la Figure 29B, il est par exemple possible de mesurer en duplicata l'effet de 5 niveaux de DAS (dont le sham) sur deux types cellulaires différents avec ou sans co-exposition avec un chimique, soit vingt conditions testées en simultanément.



**Figure 29.** *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 : DAS maximal, Jaune : 47 % du DAS maximal, Vert : 31 % du DAS maximal, Bleu : 21 % du DAS maximal. Les puits ayant un éclat bleu sont ceux qui reçoivent un traitement à l'aide d'un chimique.

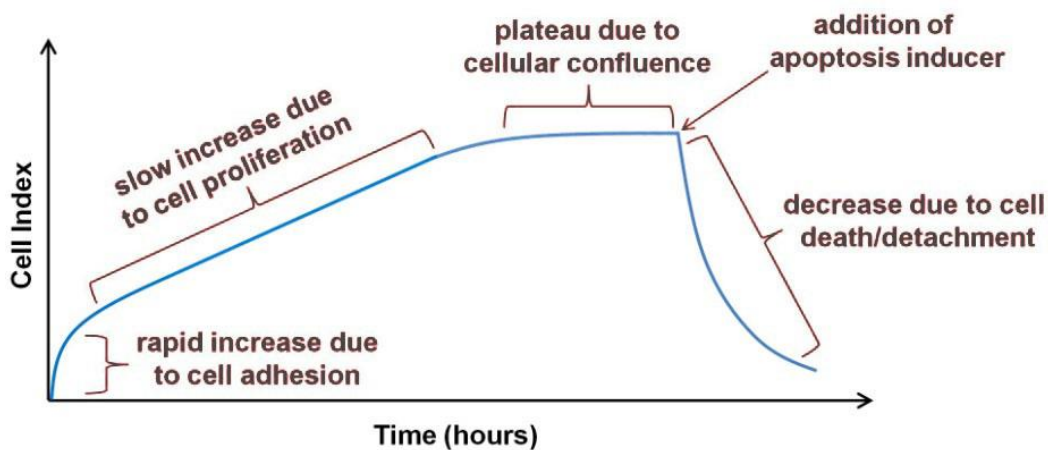
### 3.2.2 Résultats expérimentaux

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 des électrodes.

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 synonyme de confluence cellulaire (Figure 30).

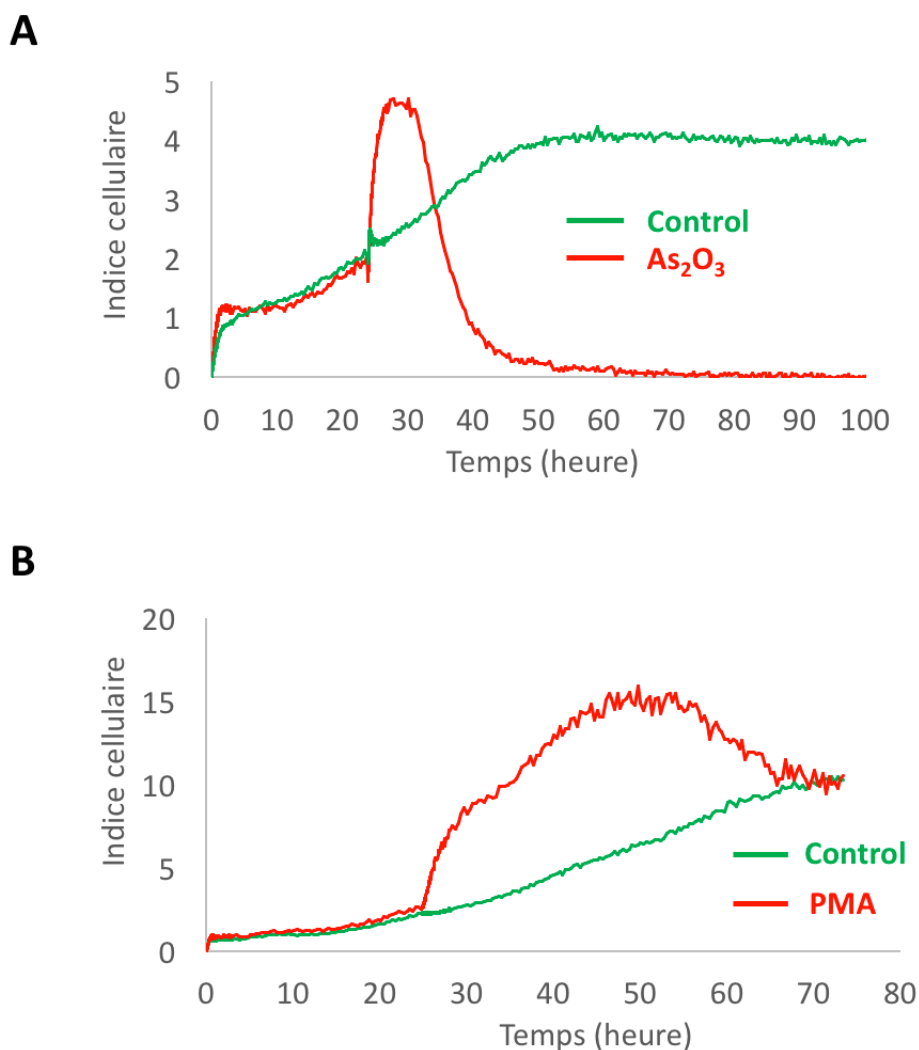


**Figure 30.** *Tracé modèle de l'évolution de l'indice cellulaire suite au dépôt des cellules dans les puits de mesure. L'addition d'un inducteur de l'apoptose sur les cellules confluentes entraîne la mort cellulaire et la chute de l'indice cellulaire (d'après <https://aceabio.com/product/rtca-dp/>).*

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 d'apoptose va entraîner une perte de l'indice cellulaire qui correspondra à la mort cellulaire (Figure 30). 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 temps<sup>15</sup>.

<sup>15</sup> <https://aceabio.com/publications/>





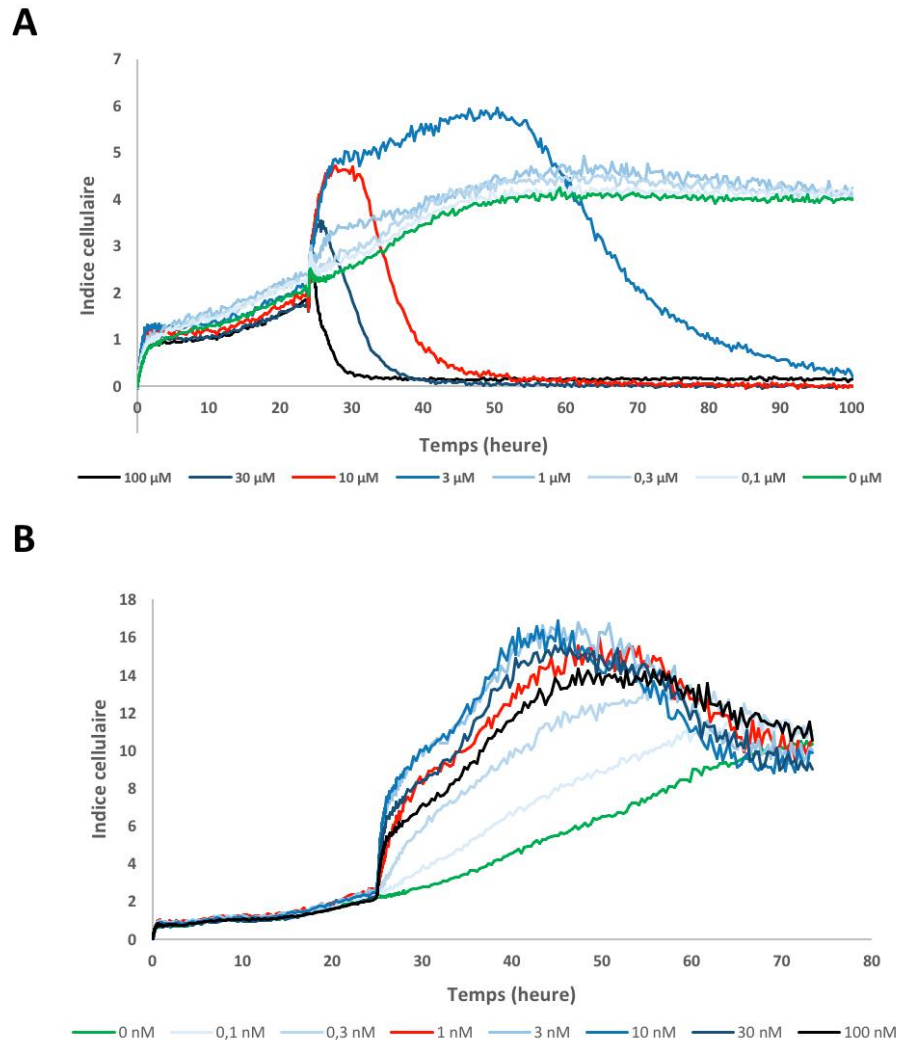
**Figure 31.** Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules SH-SY5Y et MCF-7 dans des conditions contrôles ou en présence d'une activation par un chimique. À  $t_0$ , 25000 cellules SH-SY5Y (A) ou 5000 cellules MCF-7 (B), maintenues dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium à haut taux de glucose, complété avec 10 % de sérum de veau fœtal, 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine, 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' $As_2O_3$  10  $\mu$ M et les cellules MCF-7 sont activées ou non en présence de PMA (sigma) 1 nM.

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 Figure 30 (tracés verts sur la Figure 31). Vingt-quatre heures après avoir débuté les expériences, la lignée SH-SY5Y a été activée à l'aide de trioxyde d'Arsenic ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) 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) (Figure 31). L'activation des cellules SH-SY5Y par l' $\text{As}_2\text{O}_3$  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 DAG. 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 (Figure 32). 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' $\text{As}_2\text{O}_3$ , en dessous de  $1 \mu\text{M}$ , il n'apparaît aucune variation significative de la mesure. Par contre, au-dessus de  $1 \mu\text{M}$ , 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  $0.1 \text{ nM}$  avec un effet maximal obtenu à partir de  $3 \text{ nM}$  de PMA. Sur la base de ces expériences, nous avons décidé d'utiliser dans le reste de nos expériences une dose de  $10 \mu\text{M}$  d' $\text{As}_2\text{O}_3$  sur

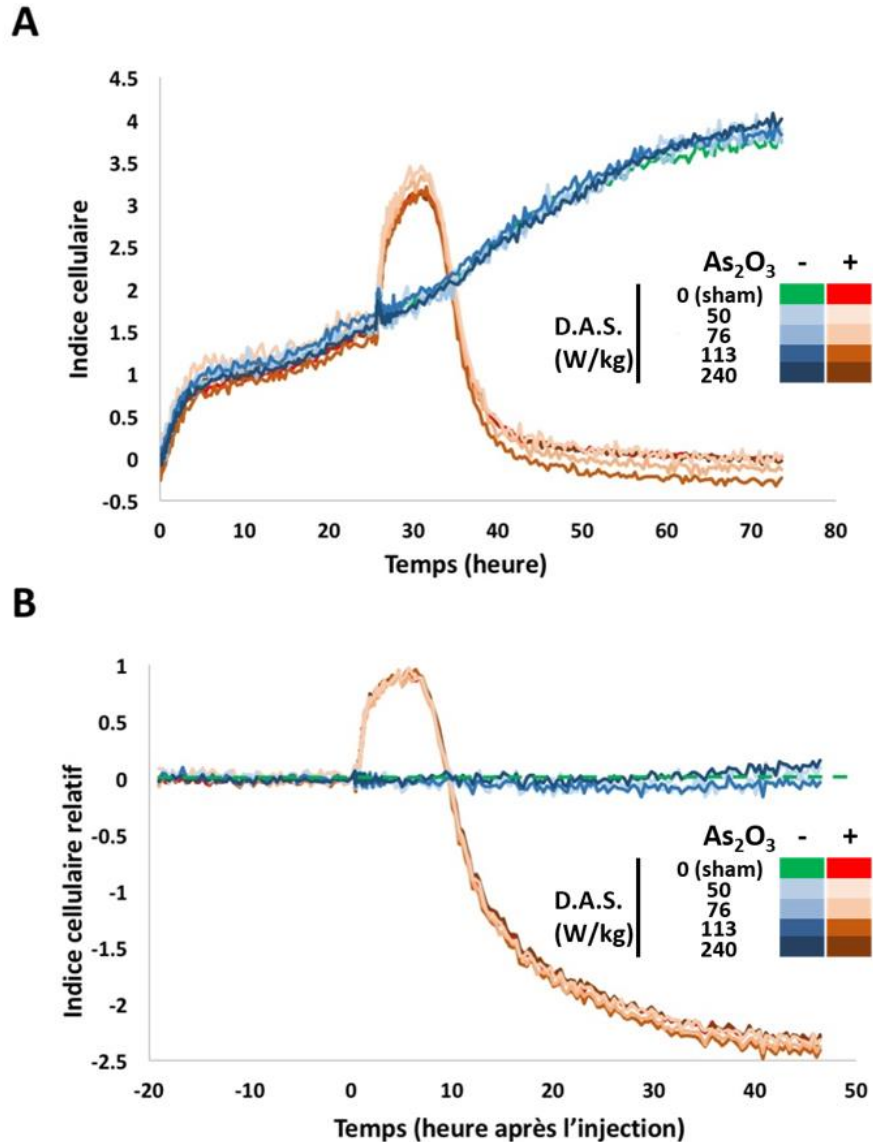
les cellules SH-SY5Y et 0,5 nM de PMA sur les cellules MCF-7, ces doses produisant des effets intermédiaires.



**Figure 32.** Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules SH-SY5Y et MCF-7 dans des conditions contrôles ou en présence d'une activation par différentes concentrations de produit chimique activateur. À  $t_0$ , 25000 cellules SH-SY5Y (A) ou 5000 cellules MCF-7 (B) 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.

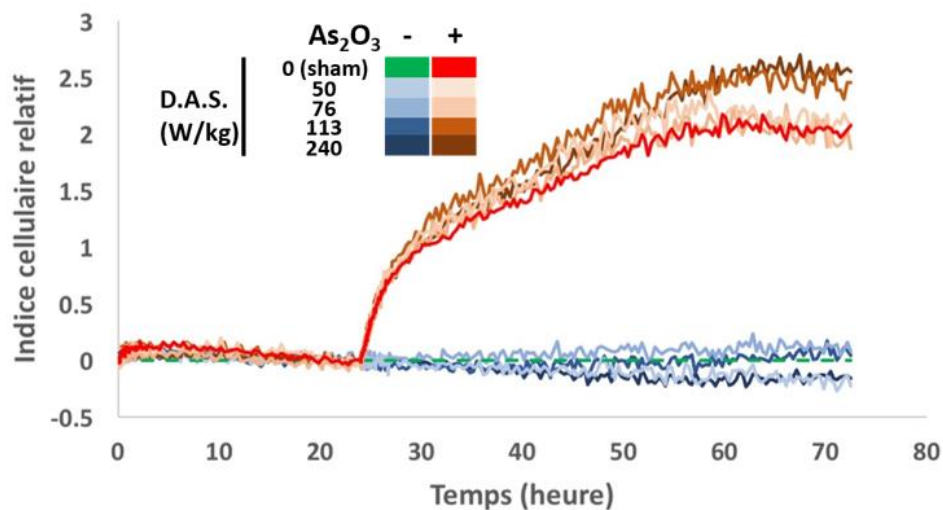
Ayant caractérisé la signature comportementale des deux lignées cellulaires humaines SH-SY5Y et MCF-7 dans des conditions de repos et suite à une stimulation chimique, nous avons pu entreprendre l'étude du comportement de ces deux lignées cellulaires sous exposition RF. Le comportement de ces deux lignées 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, LTE ou Wi-Fi) et émis à des DAS allant de 5 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 la Figure 27E où une exposition à environ 2400 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'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Figure 33).

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 Wi-Fi). Les RF n'ont pas non plus d'incidence sur la réponse des cellules SH-SY5Y à l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Afin d'illustrer notre propos, nous montrons en exemple le résultat obtenu en présence de la porteuse non modulée (signal CW) (Figure 33A). Afin de bien comparer les résultats obtenus dans les différentes conditions d'exposition, les résultats de la Figure 33A 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 obtenues à chaque temps sont normalisées en étant divisées 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 de l'indice cellulaire entre les différentes conditions testées et la condition contrôle. Il est clair au regard de la Figure 33B 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.



**Figure 33.** Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules SH-SY5Y exposées à un champ RF 1800 MHz dépourvu de modulation (signal CW), à différents DAS et co-exposées ou non avec de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. À t<sub>0</sub>, 25000 cellules SH-SY5Y, ont été déposées au fond des puits selon le schéma expérimental présenté dans la Figure 29B. Les cellules sont exposées au CW à 1800 MHz, à des DAS allant de 5 à 24 W/kg (voir Figure 29B). Un sham en absence d'exposition est réalisé sur la plaque de mesure centrale. La mesure de l'impédance et l'exposition sont lancées simultanément. 24h après, les cellules SH-SY5Y sont traitées avec 10 µM d'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pendant 48h. Les cellules SH-SY5Y non-exposées (sham) sont traitées avec de l'eau. (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.

Le résultat est le même lorsque nous utilisons les cellules MCF-7 activées ou non par le PMA. Aucune différence significative n'est observée dans les conditions non-activées entre le sham et les cellules exposées au signal CW à différents DAS allant jusqu'à 24 W/kg (la Figure 34 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 suboptimale de PMA, n'est pas significativement modifié par l'exposition au CW.



**Figure 34.** Caractérisation du tracé obtenu avec des cellules MCF-7 exposées à un champ RF 1800 MHz dépourvu de modulation (signal CW), à différents DAS et co-exposées ou non en présence de 0,5 nM de PMA. A T<sub>0</sub>, 5000 cellules MCF-7 ont été déposées au fond des puits selon le schéma expérimental présenté dans la Figure 29B. Les cellules sont exposées au signal CW comme expliqué dans la Figure 33. L'impédance est 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. Les cellules MCF-7 non-activées sont traitées avec du DMSO. Seul l'indice cellulaire relatif est représenté, ce qui permet une comparaison directe par rapport à la condition Sham non-activée.

### 3.2.3 Discussion

L'étude de l'activité de cibles moléculaires qui pourraient potentiellement être impactées par une exposition aux RF est importante pour la compréhension des mécanismes

d'interaction entre les ondes et le vivant. Mais étant donnée 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. Le but de cette approche était d'utiliser une technique label-free afin d'étudier le comportement cellulaire global sous exposition aux différents signaux RF sans se concentrer sur un mécanisme moléculaire précis, ce qui permettrait de cribler les paramètres des champs efficaces. Le système XCellRF, par la mesure de l'impédance, analyse le comportement cellulaire dans des puits au format 96-puits, ce qui permet de tester simultanément un grand nombre de conditions expérimentales. Un point important à souligner est que ce système ne provoque pas d'échauffement du milieu de culture de par le fait que l'exposition aux champs n'est concentrée qu'au niveau du tapis cellulaire. Ces caractéristiques en font une technologie de choix pour cette approche cellulaire.

Nous avons étudié les effets de différents signaux RF (CW, GSM, UMTS, LTE et Wi-Fi) à 1800 MHz, à des DAS allant de 0 à 24 W/kg sur les lignées de neuroblastomes SH-SY5Y et de cellules tumorales mammaires MCF-7. Dans un premier temps, avant de débiter les expériences d'exposition, nous avons pu déterminer une signature du comportement cellulaire de ces deux lignées en absence ou en présence de trioxyde d'arsenic et de PMA, des agents chimiques activateurs des lignées SH-SY5Y et MCF-7 respectivement (Figure 31). Ensuite, et seulement après avoir déterminé la concentration optimale de chaque agent chimique permettant d'activer la lignée cellulaire correspondante (Figure 32), nous avons pu exposer les cellules aux champs RF. Les résultats obtenus montrent que les champs RF ne modifient pas le comportement cellulaire de la lignée SH-SY5Y, que ce soit en absence ou en présence d'AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Figure 33). Concernant la lignée MCF-7, seule l'exposition au signal CW a pu être réalisée pour le moment. Comme pour les cellules SH-SY5Y, les résultats ont montré que ce signal ne modifiait pas le comportement cellulaire, que ce soit en absence ou en présence de l'agent activateur PMA (Figure 34). L'exposition des cellules MCF-7 aux autres signaux RF est actuellement en cours.

La lignée de neuroblastome SH-SY5Y a été largement utilisée en bioélectromagnétisme. Certaines études trouvent des effets des RF sur cette lignée alors que d'autres n'en trouvent pas. Par exemple, (Su et al., 2017) ont montré qu'une exposition des cellules SH-SY5Y aux RF 1800 MHz à 4 W/kg n'induisait pas de dommages à l'ADN et n'agissait pas sur le cycle, la prolifération ou la viabilité cellulaire. A l'inverse, l'exposition des cellules SH-SY5Y à un signal CW 872 MHz à 5 W/kg augmente la production de ROS induite chimiquement et

provoque une exacerbation des dommages causés de manière concomitante à l'ADN (Luukkonen et al., 2009). Notons que ce résultat n'a pas pu être confirmé par des études plus récentes (de Gannes et al., 2011; Kang et al., 2014).

Concernant les cellules MCF-7, Zeng et al. ont étudié l'impact d'une exposition de ces cellules au GSM 1800 MHz à des DAS allant jusqu'à 3,5 W/kg pendant 24h sur l'expression de gènes et de protéines. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'effet sur ces cellules suite à l'exposition aux RF (Zeng et al., 2006).

Aucune des études présentées ci-dessus n'utilise des techniques « sans-marquages ». À notre connaissance, une seule étude a utilisé le système xCELLigence pour observer les changements morphologiques cellulaires suite à une exposition aux CEM. Après avoir exposé des cellules épithéliales cornéennes humaines (HCE-T) à un CEM de 0.12 THz durant 24h, Koyama et al. ont analysé les variations de l'indice cellulaire suite au dépôt des cellules dans les puits de mesure du système xCELLigence (Koyama et al., 2016). Mais là encore, l'analyse des effets des champs RF est réalisée a posteriori de l'exposition. Notre travail est donc, à notre connaissance, le premier à étudier les effets des champs RF en utilisant une technique « sans-marquage » en temps réel au cours de l'exposition.



## 4 Conclusion et perspectives

L'exposition aux RF, émises par un nombre grandissant de sources et utilisées par nos systèmes de communication sans fil, provoque de nombreuses craintes sociétales liées aux effets potentiels sur notre santé. Si les effets thermiques d'une exposition des tissus aux RF à des niveaux élevés ont très bien été caractérisés, la question de possibles effets des RF de faibles niveaux sur la santé reste posée.

Grâce aux normes et recommandations établies, aucun échauffement n'est provoqué par une exposition aux RF utilisées par les communications sans fil. On ne peut cependant pas exclure l'existence d'effets non-thermiques des RF aux niveaux moléculaires et cellulaires au sein de la matière vivante. Malheureusement, aucune hypothèse mécanistique plausible de l'interaction des ondes à bas niveau avec la matière vivante n'est pour le moment disponible. De plus, la grande majorité des approches proposées pour l'étude des effets cellulaires et moléculaires consistent en des analyses a posteriori de la matière vivante, généralement sur des extraits cellulaires ou protéiques, ce qui peut engendrer un biais dans les résultats. Concernant les approches *in vitro*, nous avons souhaité entreprendre une approche temps réel et sur cellules vivantes ce qui permettrait d'obtenir des réponses au sujet des effets non-thermiques et de mieux comprendre les mécanismes d'interactions des ondes avec le vivant. Pendant ces 20 dernières années, de nombreuses techniques innovantes permettant des études en temps réel en biologie cellulaire ont vu le jour, mais aucune n'a été utilisée dans le domaine du bioélectromagnétisme. En partant de ces constatations, le but de ma thèse a été de mettre en place deux approches innovantes en bioélectromagnétisme permettant l'étude des champs RF à bas niveau aux niveaux moléculaires et cellulaires et en temps réel.

En 2005, Roland Glaser a émis l'hypothèse que, même lors d'expositions à de faibles niveaux, un échauffement très localisé, imperceptible au niveau de l'organisme entier, pouvait être détecté par des protéines thermosensibles (Glaser, 2005). Nous avons testé cette hypothèse dans notre première approche, qui consistait à étudier les effets de différents signaux RF (CW, GSM, UMTS, LTE, Wi-Fi et WiMAX) à 1800 MHz émis à différents DAS, sur l'activation du canal TRPV1. Pour cela, nous avons tiré profit de la technique du BRET. Les expériences que nous avons réalisées ont montré que l'activation de TRPV1 était induite par l'échauffement produit par les RF, mais aucun effet non-thermique n'a pu être observé. De plus, l'activation de TRPV1 par la CAPS n'était pas affectée par une exposition RF (Article 2, Figure 5).

La seconde approche consistait à utiliser l'impédancemétrie afin d'étudier le comportement de deux lignées cellulaires, les neuroblastomes SH-SY5Y et les cellules tumorales mammaires MCF-7, sous l'influence de différents signaux RF (CW, GSM, UMTS, LTE et Wi-Fi) à 1800 MHz, à des DAS allant de 0 à 24 W/kg, en présence ou en absence d'agents activateurs. L'utilisation du XCellRF, une technique label-free a permis une étude sur cellule entière en intégrant tous les processus cellulaires complexes et pas seulement un mécanisme moléculaire précis. Les résultats obtenus ont montré que les champs RF ne modifient pas le comportement cellulaire des deux lignées étudiées, que ce soit en absence ou en présence d'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et de PMA (Figure 33 et Figure 34).

Ces approches moléculaires et cellulaires en temps réel sont toutes deux innovantes dans le domaine du bioélectromagnétisme. Mis à part un effet thermique observé à l'aide de l'approche moléculaire, augmentant, de manière attendue, l'interaction entre TRPV1 et la CaM, aucun effet non-thermique n'a pu être trouvé, ni à l'aide du BRET, ni à l'aide de l'XCellRF. Ce travail constitue une première étape. Nous avons pu faire la preuve de concept que des approches en temps réel étaient tout à fait adaptées pour l'étude des effets des CEM sur des cellules vivantes. Ces approches pourront être par la suite étendues à d'autres types cellulaires et d'autres cibles moléculaires.

## **4.1 Perspectives : autres cibles moléculaires à étudier**

### **4.1.1 Autres canaux thermo-TRP**

L'absence d'effets non-thermiques sur TRPV1 ne signifie pas cependant que d'autres thermo-TRP ne sont pas sensibles aux CEM RF. Il a été montré qu'une exposition chronique à un champ RF CW à 900 MHz à des DAS allant de 0.1 à 0.3 mW/kg entraînait une sensation de froid chez des souris (Pelletier et al., 2013, 2014). Les canaux TRPA1 et TRPM8 sont tous deux sensibles au froid, et ont la capacité à interagir avec la CaM (Hasan et al., 2017; Sarria et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier à l'aide du BRET le comportement de ces protéines sous exposition aux champs RF.

#### 4.1.2 Le Heat Shock Factor-1 et les Heat Shock Proteins

D'autres protéines présentes dans notre organisme sont également sensibles à la température. Il s'agit des protéines et des facteurs de choc thermique (Hsp et HSF pour Heat shock protein et Heat Shock Factor). 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 conditions 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) (Åkerfelt et al., 2010; Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova, 2017; Hentze et al., 2016; Vihervaara and Sistonen, 2014), 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 celui qu'il était initialement supposé jouer, 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 (Åkerfelt 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 6 h par jour durant 3 jours à un DAS de 4 W/kg 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 DAS 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 indiquent sa localisation nucléaire même dans des conditions de repos. L'activation de HSF1 est réprimée par l'interaction avec des protéines chaperonnes 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 serait donc intéressant de mesurer cet équilibre à l'aide d'un test de BRET intermoléculaire sous l'influence d'un CEM RF.

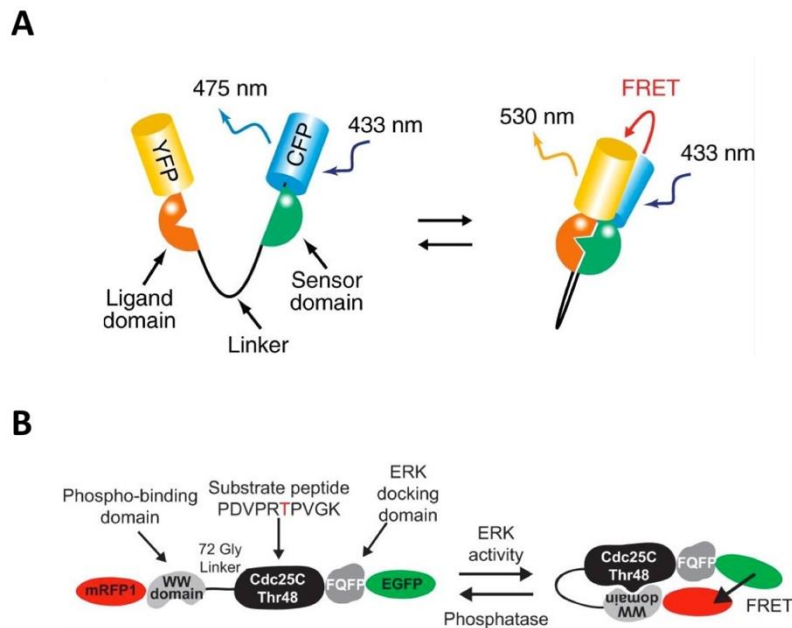
#### **4.1.3 Les MAPK PKC, Ras, ERK et JNK**

La capacité des ondes RF à provoquer un cancer est souvent questionnée. PKC, Ras, ERK et JNK, quatre MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) impliquées dans les grandes voies de signalisation cellulaire, sont souvent dérégulées dans de nombreux cancers et jouent un rôle critique dans leur développement (Dhillon et al., 2007). Au vu des craintes sociétales concernant l'implication des CEM RF dans la formation de tumeurs, il apparaît nécessaire d'étudier le comportement de ces kinases sous exposition. Toujours dans le but d'utiliser des

techniques de transfert d'énergie, il existe déjà plusieurs sondes moléculaires basées sur la technique du FRET, caractérisées dans la littérature, permettant la mesure de l'activité de ces kinases (Fosbrink et al., 2010; Harvey et al., 2008; Komatsu et al., 2011; Mochizuki et al., 2001; Violin et al., 2003). Parmi ces différentes sondes, celles réalisées par le groupe du Pr Matsuda à l'université de Kyoto au Japon apparaissent particulièrement intéressantes (Komatsu et al., 2011).

Les 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 (Figure 35A). 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 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 (Figure 35B). 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 en résulte un rapprochement des groupements donneurs et accepteurs d'énergie et une augmentation du signal de FRET.



**Figure 35.** 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 (Harvey et al., 2008).

En sélectionnant des séquences adéquates pour les domaines de liaison et des séquences substrats, il est 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 est donc possible de dériver ces sondes FRET en sondes BRET en remplaçant la séquence ADNc de la CFP par celle de la luciférase rLuc8.

## **4.2 Perspectives : l'impédancemétrie pour approfondir les connaissances sur le comportement cellulaire sous l'influence des CEM**

### **4.2.1 Etude d'autres lignées cellulaires et de cellules primaires**

Chaque lignée cellulaire possède une signature qui lui est propre, que ce soit en absence ou en présence d'un agent activateur, et pourrait potentiellement répondre différemment sous exposition à un champ RF. Le fait qu'aucun effet des champs n'ait été montré sur les lignées SH-SY5Y et MCF-7 ne prouve en aucun cas que d'autres types cellulaires ne puissent être sensibles aux CEM RF. Il serait également intéressant d'étudier les effets des champs RF environnementaux sur des cellules primaires, telles que des fibroblastes ou des astrocytes, issues de l'animal (rat, souris...).

### **4.2.2 Exploration des paramètres des champs électromagnétiques**

L'outil original qu'est l'XCellRF peut permettre de sortir du domaine des champs environnementaux et d'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 comme thérapie anticancéreuse (Breton and Mir, 2012). Lorsqu'une cellule est exposée à un champ électrique suffisamment intense, son potentiel transmembranaire 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.

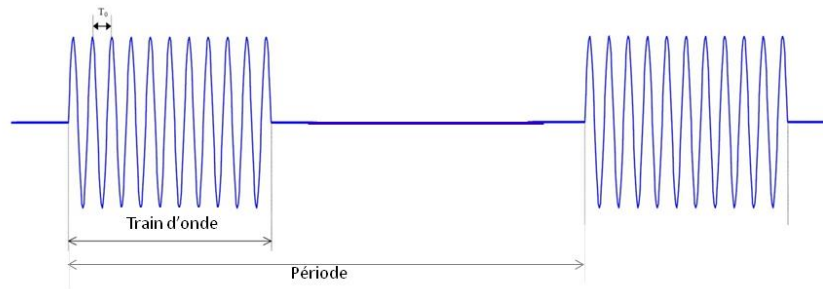
Parmi ces différentes techniques, l'électrochimiothérapie, développée initialement par Lluis Mir est une technique sûre, facile et efficace pour le traitement des tumeurs solides qui

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 (Mir et al., 1991). 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 (Figure 36) 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 pourrons 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 36.** 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.

Selon cette stratégie, 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.

## Bibliographie

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.

Åkerfelt, 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.

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

Arredondo, L., Nelson, H.B., Beckingham, K., and Stern, M. (1998). Increased Transmitter Release and Aberrant Synapse Morphology in a *Drosophila* Calmodulin Mutant. *Genetics* *150*, 265–274.

Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Islami, F., Galichet, L., and Straif, K. (2011). Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol.* *12*, 624–626.

Baez, D., Raddatz, N., Ferreira, G., Gonzalez, C., and Latorre, R. (2014). Gating of Thermally Activated Channels. In *Current Topics in Membranes*, (Elsevier), pp. 51–87.

Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., and Gereau, R.W. (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* *35*, 721–731.

Bhave, G., Hu, H.-J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., and Gereau, R.W. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 12480–12485.

Brauchi, S. (2006). A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels. *J. Neurosci.* *26*, 4835–4840.

Brauchi, S., Orio, P., and Latorre, R. (2004). Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15494–15499.

- 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.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7877–7882.
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., and Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504, 113–118.
- 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.
- Cardullo, R.A. (2007). Theoretical Principles and Practical Considerations for Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 479–494.
- Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., Cortés, A., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E.I., et al. (2008). Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* 5, 727–733.
- 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.
- Chaudhury, S., Bal, M., Belugin, S., Shapiro, M.S., and Jeske, N.A. (2011). AKAP150-mediated TRPV1 sensitization is disrupted by calcium/calmodulin. *Mol. Pain* 7, 34–34.
- Chuang, H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.-E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., and Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature* 411, 957–962.

- 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.
- Chung, M.-K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M.J. (2004). TRPV3 and TRPV4 Mediate Warmth-evoked Currents in Primary Mouse Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *279*, 21569–21575.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* *426*, 517–524.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* *173*, 33–38.
- Cosens, D., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a drosophila mutant. *224*, 285–287.
- Dai, Y. (2016). TRPs and pain. *Semin. Immunopathol.* *38*, 277–291.
- 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 Phys.* *11*, 585–591.
- Dayalan Naidu, S., and Dinkova-Kostova, A.T. (2017). Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J.* *284*, 1606–1627.
- De, A., Loening, A.M., and Gambhir, S.S. (2007). An Improved Bioluminescence Resonance Energy Transfer Strategy for Imaging Intracellular Events in Single Cells and Living Subjects. *Cancer Res.* *67*, 7175–7183.
- De, A., Ray, P., Loening, A.M., and Gambhir, S.S. (2009). BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J.* *23*, 2702–2709.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* *26*, 3279–3290.

- 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.* *108*, 12060–12065.
- Fang, Y. (2011). Label-free biosensors for cell biology. *Int. J. Electrochem.* *2011*, 1–16.
- Fang, Y., Li, G.G., and Peng, J. (2005). Optical biosensor provides insights for bradykinin B<sub>2</sub> receptor signaling in A431 cells. *FEBS Lett.* *579*, 6365–6374.
- Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., González-Muñiz, R., and Ferrer-Montiel, A. (2015). Pharmacology of TRP Channels. In *TRP Channels in Sensory Transduction*, R. Madrid, and J. Bacigalupo, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 41–71.
- Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C., Devesa, I., and Ferrer-Montiel, A. (2014). Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes* *4*, 525–564.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.* *437*, 55–75.
- 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.* *107*, 5459–5464.
- 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.
- Foster, K.R., and Repacholi, M.H. (2004). Biological effects of radiofrequency fields: does modulation matter? *Radiat. Res.* *162*, 219–225.
- Funk, R.H.W., Monsees, T., and Özkucur, N. (2009). Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. *Prog. Histochem. Cytochem.* *43*, 177–264.
- Galperin, E., Verkhusha, V.V., and Sorkin, A. (2004). Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nat. Methods* *1*, 209–217.

- de Gannes, F.P., Haro, E., Hurtier, A., Taxile, M., Ruffié, G., Billaudel, B., Veyret, B., and Lagroye, I. (2011). Effect of Exposure to the Edge Signal on Oxidative Stress in Brain Cell Models. *Radiat. Res.* *175*, 225–230.
- Gaudet, R. (2008). A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol. Biosyst.* *4*, 372.
- Gavva, N.R., Bannon, A.W., Hovland, D.N., Lehto, S.G., Klionsky, L., Surapaneni, S., Immke, D.C., Henley, C., Arik, L., Bak, A., et al. (2007). Repeated Administration of Vanilloid Receptor TRPV1 Antagonists Attenuates Hyperthermia Elicited by TRPV1 Blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *323*, 128–137.
- Giaever, I., and Keese, C.R. (1984). Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *81*, 3761–3764.
- Glaser, R. (2005). Are thermoreceptors responsible for “non-thermal” effects of RF fields ? *Ed. Wiss.* *21*, 1–14.
- Grandl, J., Kim, S.E., Uzzell, V., Bursulaya, B., Petrus, M., Bandell, M., and Patapoutian, A. (2010). Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nat. Neurosci.* *13*, 708–714.
- Groneberg, D.A., Niimi, A., Dinh, Q.T., Cosio, B., Hew, M., Fischer, A., and Chung, K.F. (2004). Increased Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Airway Nerves of Chronic Cough. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *170*, 1276–1280.
- Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., Guggino, W.B., and Germino, G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* *408*, 990–994.
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., et al. (2002). LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell* *9*, 163–173.
- 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.* *105*, 19264–19269.

Hasan, R., Leeson-Payne, A.T.S., Jaggar, J.H., and Zhang, X. (2017). Calmodulin is responsible for Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Sci. Rep.* 7, 45098.

Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12501–12504.

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, e11576.

Heroux, M., Hogue, M., Lemieux, S., and Bouvier, M. (2007). Functional Calcitonin Gene-related Peptide Receptors Are Formed by the Asymmetric Assembly of a Calcitonin Receptor-like Receptor Homo-oligomer and a Monomer of Receptor Activity-modifying Protein-1. *J. Biol. Chem.* 282, 31610–31620.

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.

Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T., and Montell, C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca<sup>2+</sup>-activated monovalent selective cation channel. *Curr. Biol.* 13, 1153–1158.

Hu, H.-Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C.K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L.-Y., Wood, J.D., and Zhu, M.X. (2004). 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Is a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J. Biol. Chem.* 279, 35741–35748.

Huang, J., Zhang, X., and McNaughton, P.A. (2006). Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 638–645.

IARC (2002). Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields (Lyon: IARC Press).

IARC (2013). Non-ionizing radiation. Radiofrequency electromagnetic fields. Part 2 (Lyon: International Agency for Research on Cancer).

- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., and Mori, Y. (2001). The Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP6 Is the Essential Component of Vascular  $\alpha_1$ -Adrenoceptor-Activated  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeable Cation Channel. *Circ. Res.* *88*, 325.
- Jara-Oseguera, A., and Islas, L.D. (2013). The Role of Allosteric Coupling on Thermal Activation of Thermo-TRP Channels. *Biophys. J.* *104*, 2160–2169.
- Jeske, N.A., Diogenes, A., Ruparel, N.B., Fehrenbacher, J.C., Henry, M., Akopian, A.N., and Hargreaves, K.M. (2008). A-Kinase Anchoring Protein Mediates TRPV1 Thermal Hyperalgesia through PKA Phosphorylation of TRPV1. *Pain* *138*, 604–616.
- Jeske, N.A., Patwardhan, A.M., Ruparel, N.B., Akopian, A.N., Shapiro, M.S., and Henry, M.A. (2009). A-kinase anchoring protein 150 controls protein kinase C-mediated phosphorylation and sensitization of TRPV1: *Pain* *146*, 301–307.
- Jordt, S.-E., and Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* *108*, 421–430.
- Jordt, S.-E., Tominaga, M., and Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 8134–8139.
- Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2010). Bioelectric effects of intense ultrashort pulses. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* *38*, 255–304.
- Kaneko, Y., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 2474–2507.
- Kang, K.A., Lee, H.C., Lee, J.-J., Hong, M.-N., Park, M.-J., Lee, Y.-S., Choi, H.-D., Kim, N., Ko, Y.-G., and Lee, J.-S. (2014). Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *55*, 265–276.
- Kobrinisky, E. (2006). Molecular Rearrangements of the Kv2.1 Potassium Channel Termini Associated with Voltage Gating. *J. Biol. Chem.* *281*, 19233–19240.
- Kocan, M., See, H.B., Seeber, R.M., Eidne, K.A., and Pflieger, K.D.G. (2008). Demonstration of Improvements to the Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Technology for the Monitoring of G Protein-Coupled Receptors in Live Cells. *J. Biomol. Screen.* *13*, 888–898.



- 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*, 4647–4656.
- Kowalczyk, C., Yarwood, G., Blackwell, R., Priestner, M., Sienkiewicz, Z., Bouffler, S., Ahmed, I., Abd-Alhameed, R., Excell, P., Hodzic, V., 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.
- Koyama, S., Narita, E., Shimizu, Y., Shiina, T., Taki, M., Shinohara, N., and Miyakoshi, J. (2016). Twenty Four-Hour Exposure to a 0.12 THz Electromagnetic Field Does Not Affect the Genotoxicity, Morphological Changes, or Expression of Heat Shock Protein in HCE-T Cells. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* *13*, 793.
- Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C., and Vargas, G. (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Calcium Channels Transp.* *42*, 427–438.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.-L., Scharenberg, A.M., Penner, R., and Kinet, J.-P. (2002). TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* *109*, 397–407.
- Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B., and Gaudet, R. (2007). The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron* *54*, 905–918.
- Liu, J., and Escher, A. (1999). Improved assay sensitivity of an engineered secreted Renilla luciferase. *Gene* *237*, 153–159.
- Liu, B., Hui, K., and Qin, F. (2003). Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophys. J.* *85*, 2988–3006.
- Loening, A.M. (2006). Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng. Des. Sel.* *19*, 391–400.
- Luukkonen, J., Hakulinen, P., Mäki-Paakkanen, J., Juutilainen, J., and Naarala, J. (2009). Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872MHz radiofrequency radiation. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *662*, 54–58.

- M. Á. García-Fernández, Y. Percherancier, I. Lagroye, R. P. O'Connor, B. Veyret, D. Arnaud-Cormos, and P. Leveque (2016). Dosimetric Characteristics of an EMF Delivery System Based on a Real-Time Impedance Measurement Device. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *63*, 2317–2325.
- Matta, J.A., and Ahern, G.P. (2007). Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels: Voltage-independent gating of TRPV1 and TRPM8. *J. Physiol.* *585*, 469–482.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., and Lukyanov, S.A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* *17*, 969–973.
- McCoy, M.H., and Wang, E. (2005). Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time. *J. Virol. Methods* *130*, 157–161.
- McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* *416*, 52–58.
- McNamee, J.P., and Chauhan, V. (2009). Radiofrequency Radiation and Gene/Protein Expression: A Review. *Radiat. Res.* *172*, 265–287.
- Messeguer, A., Planells-Cases, R., and Ferrer-Montiel, A. (2006). Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr. Neuropharmacol.* *4*, 1–15.
- Mir, L.M., Orłowski, S., Belehradek, J.J., and Paoletti, C. (1991). Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer* *27*, 68–72.
- Mistretta, F., Buffi, N.M., Lughezzani, G., Lista, G., Larcher, A., Fossati, N., Abrate, A., Dell'Oglio, P., Montorsi, F., Guazzoni, G., et al. (2014). Bladder Cancer and Urothelial Impairment: The Role of TRPV1 as Potential Drug Target. *BioMed Res. Int.* *2014*, 1–10.
- 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*, 1065–1068.

- Mohapatra, D.P., and Nau, C. (2003). Desensitization of Capsaicin-activated Currents in the Vanilloid Receptor TRPV1 Is Decreased by the Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* *278*, 50080–50090.
- Montell, C., and Rubin, G. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* *2*, 1313–1323.
- Montell, C., Jones, K., Hafen, E., and Rubin, G. (1985). Rescue of the *Drosophila* Phototransduction Mutation *tip* by Germline Transformation. *Science* *230*, 1040–1043.
- Moran, M.M., McAlexander, M.A., B?r?, T., and Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 601–620.
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E.H., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* *33*, 129–137.
- Neves, S.R. (2012). Modeling of spatially-restricted intracellular signaling. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* *4*, 103–115.
- Nieto-Posadas, A., Jara-Oseguera, A., and Rosenbaum, T. (2011). TRP channel gating physiology. *Curr. Top. Med. Chem.* *11*, 2131–2150.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., and Tominaga, M. (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 8002–8006.
- 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.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996). Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* *273*, 1392.

- Owens, R.M., Wang, C., You, J.A., Jiambutr, J., S.L. Xu, A., Marala, R.B., and Jin, M.M. (2009). Real-time quantitation of viral replication and inhibitor potency using a label-free optical biosensor. *J. Recept. Signal Transduct.* *29*, 195–201.
- Pänke, O., Weigel, W., Schmidt, S., Steude, A., and Robitzki, A.A. (2011). A cell-based impedance assay for monitoring transient receptor potential (TRP) ion channel activity. *Biosens. Bioelectron.* *26*, 2376–2382.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* *108*, 705–715.
- Pelletier, A., Delanaud, S., D'cima, 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.* *20*, 2735–2746.
- 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.
- Perálvarez-Marín, A., Doñate-Macian, P., and Gaudet, R. (2013). What do we know about the transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) ion channel? *FEBS J.* *280*, 5471–5487.
- Phelps, C.B., Wang, R.R., Choo, S.S., and Gaudet, R. (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.
- Pickard, W.F., and Barsoum, Y.H. (1981). Radio-Frequency Bioeffects at the Membrane Level: Separation of Thermal and Athermal Contributions in the Characeae. *J. Membr. Biol.* *61*, 39–54.
- Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., and Ferrer-Montiel, A. (2005). Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *451*, 151–159.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* *111*, 229–233.

- Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006). AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 619–647.
- Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., and Gordon, S.E. (2004). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin. *J. Gen. Physiol.* 123, 53–62.
- Sanz-Salvador, L., Andres-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., and Planells-Cases, R. (2012). Agonist- and Ca<sup>2+</sup>-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. *J. Biol. Chem.* 287, 19462–19471.
- Sarria, I., Ling, J., Zhu, M.X., and Gu, J.G. (2011). TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP<sub>2</sub>: distinction from tachyphylaxis. *J. Neurophysiol.* 106, 3056–3066.
- SCENIHR (2015). Opinion on potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF). (Luxembourg: Publications Office).
- 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.
- Shrestha, S., and Deo, S.K. (2006). Anthozoa red fluorescent protein in biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 515–524.
- Shupak, N.M., Prato, F.S., and Thomas, A.W. (2003). Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: a review. *Radio Sci Bull* 307, 9–30.
- Stallaert, W., Dorn, J.F., van der Westhuizen, E., Audet, M., and Bouvier, M. (2012). Impedance Responses Reveal  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Signaling Pluridimensionality and Allow Classification of Ligands with Distinct Signaling Profiles. *PLoS ONE* 7, e29420.
- Stolwijk, J.A., Matrougui, K., Renken, C.W., and Trebak, M. (2015). Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* 467, 2193–2218.

Su, L., Wei, X., Xu, Z., and Chen, G. (2017). RF-EMF exposure at 1800 MHz did not elicit DNA damage or abnormal cellular behaviors in different neurogenic cells. *Bioelectromagnetics* 38, 175–185.

Szallasi, A., and Blumberg, P.M. (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30, 515–520.

Tóth, B.I., Oláh, A., Szöllösi, A.G., and Bíró, T. (2014). TRP channels in the skin: TRP channels in the skin. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2568–2581.

Trevisani, M., Patacchini, R., Nicoletti, P., Gatti, R., Gazzieri, D., Lissi, N., Zagli, G., Creminon, C., Geppetti, P., and Harrison, S. (2005). Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br. J. Pharmacol.* 145, 1123–1131.

Trugnan, G., Fontanges, P., Delautier, D., and Ait-Slimane, T. (2004). FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM? De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur ! *Medecine/Sciences* 20, 1027–1034.

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

Vassort, G., and Fauconnier, J. (2008). Les canaux TRP (transient receptor potential). *Med Sci Paris* 24, 163–168.

Vay, L., Gu, C., and McNaughton, P.A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* 165, 787–801.

Vecchia, P., Matthes, R., Lin, J.C., Saunders, R.D., Ziegelberger, G., and Swerdlow, A. (2009). Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz - 300 GHz): review of the scientific evidence on dosimetry, biological effects, epidemiological observations, and health consequences concerning exposure to high frequency electromagnetic fields (100 kHz - 300 GHz) (Oberschleißheim: ICNIRP).

Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417.

- Vennekens, R., Vriens, J., and Nilius, B. (2008). Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr. Neuropharmacol.* *6*, 79–96.
- Verschaeve, L. (2012). Evaluations of international expert group reports on the biological effects of radiofrequency fields.
- 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. Mutat. Res.* *705*, 252–268.
- Vetter, S.W., and Leclerc, E. (2003). Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur. J. Biochem.* *270*, 404–414.
- Vihervaara, A., and Sistonen, L. (2014). HSF1 at a glance. *J. Cell Sci.* *127*, 261–266.
- 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.
- Vlachová, V., Teisinger, J., Sušánková, K., Lyfenko, A., Ettrich, R., and Vyklický, L. (2003). Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci.* *23*, 1340–1350.
- 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., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., and Nilius, B. (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 396–401.
- Walker, K.M. (2003). The VR1 Antagonist Capsazepine Reverses Mechanical Hyperalgesia in Models of Inflammatory and Neuropathic Pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *304*, 56–62.
- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., and Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* *424*, 434–438.

- Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., and Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 9652–9656.
- Wilson, T., and Hastings, J.W. (1998). Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 187–230.
- Wirkner, K., Hognestad, H., Jahnel, R., Hucho, F., and Illes, P. (2005). Characterization of rat transient receptor potential vanilloid 1 receptors lacking the N-glycosylation site N604. *Neuroreport* *16*, 997–1001.
- Xiao, Y., Lv, X., Cao, G., Bian, G., Duan, J., Ai, J., Sun, H., Li, Q., Yang, Q., Chen, T., et al. (2010). Overexpression of *Trpp5* contributes to cell proliferation and apoptosis probably through involving calcium homeostasis. *Mol. Cell. Biochem.* *339*, 155–161.
- Xing, B.-M., Yang, Y.-R., Du, J.-X., Chen, H.-J., Qi, C., Huang, Z.-H., Zhang, Y., and Wang, Y. (2012). Cyclin-Dependent Kinase 5 Controls TRPV1 Membrane Trafficking and the Heat Sensitivity of Nociceptors through KIF13B. *J. Neurosci.* *32*, 14709–14721.
- Yang, F., Cui, Y., Wang, K., and Zheng, J. (2010). Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 7083–7088.
- Zeng, Q., Chen, G., Weng, Y., Wang, L., Chiang, H., Lu, D., and Xu, Z. (2006). Effects of Global System for Mobile Communications 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on gene and protein expression in MCF-7 cells. *PROTEOMICS* *6*, 4732–4738.
- Zhang, X., Huang, J., and McNaughton, P.A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* *24*, 4211–4223.
- Zheng, J. (2013). Molecular Mechanism of TRP Channels. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Zhu, X., Chu, B.P., Peyton, M., and Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* *trp* gene. *FEBS Lett.* *373*, 193–198.