



**HAL**  
open science

# Caractérisation de l'effet des champs radiofréquences environnementaux sur les thermorécepteurs et sur la réponse globale des cellules au stress

Alexandre Joushomme

► **To cite this version:**

Alexandre Joushomme. Caractérisation de l'effet des champs radiofréquences environnementaux sur les thermorécepteurs et sur la réponse globale des cellules au stress. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0388 . tel-04828977

**HAL Id: tel-04828977**

**<https://theses.hal.science/tel-04828977v1>**

Submitted on 10 Dec 2024

**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 PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

**SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE**

Par

**Alexandre JOUSHOMME**

Caractérisation de l'effet des champs  
radiofréquences environnementaux sur les  
thermorécepteurs et sur la réponse cellulaire  
au stress

Sous la direction de  
Yann PERCHERANCIER

Soutenue le 9 Décembre 2022

Membres du jury :

M. CHAUDIERE, Jean	Professeur	CBMN	Président
Mme. ROLS, Marie-Pierre	Directrice de recherche	IPBS	Rapporteuse
M. LE DRÉAN, Yves	Professeur	IRSET	Rapporteur
Mme. PELLETIER, Amandine	Maitre de conférences	PériTox	Examinatrice
M. DE SEZE, René	Directeur de recherche	INERIS	Examineur
M. PERCHERANCIER, Yann	Directeur de recherche	IMS	Directeur de thèse





# **Caractérisation de l'effet des champs radiofréquences environnementaux sur les thermorécepteurs et sur la réponse cellulaire au stress**

## **Résumé :**

Le bioélectromagnétisme est le domaine d'étude des mécanismes d'interaction des champs électromagnétiques (CEM) avec la matière vivante ainsi que des effets biologiques induits par l'exposition aux CEM. Au niveau biophysique, il est parfaitement caractérisé que les radiofréquences (RF) provoquent un échauffement des tissus. Des recommandations et des normes ont été définies afin de protéger les populations des risques associés. Toutefois, les effets non-thermiques des champs RF de faibles niveaux sont mal compris et les données de la littérature se contredisent souvent. Les travaux de ce doctorat visent à déterminer si l'exposition à des champs RF émis à des niveaux environnementaux est susceptible d'impacter le vivant aux niveaux cellulaires et moléculaires. Dans un premier temps l'utilisation d'approches sans marquage telles que l'impédancemétrie et la microscopie holographique permettront de mesurer les effets potentiels des RF, en particulier des signaux 5G en cours de déploiement, sur le comportement global des cellules. Dans un deuxième temps, l'étude ciblée des RF sur l'activité de protéines impliquées dans la réponse au stress cellulaire sera réalisée sur les protéines ERK, RAS, PML et HSF1. L'activité de ces protéines sera mesurée à l'aide de la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET), une méthode biophysique qui permet de mesurer les changements de conformation des protéines en temps réel et sur cellules vivantes. Dans un dernier volet, l'étude des effets des RF sur les canaux thermo-TRP sensibles aux températures ambiantes et au froid sera entreprise, également à l'aide du BRET. Grâce à cette étude, nous pourrions déterminer s'il existe d'éventuels effets biologiques lors de l'exposition des cellules à des RF émis à des niveaux inférieurs aux normes.

**Mots clés :** Canaux ioniques, TRP, HSF, MAPK, Autophagie, Label-free, Électrophysiologie, Transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET), Bioélectromagnétisme

# **Characterization of the effect of environmental radiofrequency fields on thermoreceptors and on the cellular response to stress**

## **Abstract:**

Bioelectromagnetism is the field of study of the mechanisms of interaction of electromagnetic fields (EMF) with living matter as well as the biological effects induced by exposure to EMF. At the biophysical level, it has been perfectly characterized that RF causes tissue heating. Recommendations and standards have been defined in order to protect populations from associated risks. However, the non-thermal effects of low-level RF fields are poorly understood and data in the literature often contradict each other. The project aims to determine whether exposure to RF fields emitted at environmental levels is likely to impact living organisms at cellular and molecular levels. As a first step, the use of label-free approaches such as impedancemetry and holographic microscopy will allow to measure the potential effects of RF on the overall behavior of cells. In a second part, we will focus on the potential effect of 3.5 GHz 5G signals on the activity of proteins involved in the response to cellular stress, namely ERK, RAS, PML and HSF1. The activity of these proteins will be measured using the bioluminescence resonance energy transfer technique, a biophysical method that can measure conformational changes in proteins in real time and in living cells. In a final part, the study of the effects of RF on thermo-TRP channels sensitive to ambient temperatures and cold will be undertaken, also using the Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) technique. Through this study, we will be able to determine if there are any biological effects when cells are exposed to sub-standard RF levels.

**Keywords:** Ion channels, TRP, HSF, MAPK, Autophagy, Label-free, Electrophysiology, Bioluminescence resonance energy transfer (BRET), Bioelectromagnetism

## **Unité de recherche**

Équipe SANE (Santé Environnement), Laboratoire IMS, UMR 5218, Université de Bordeaux - Bâtiment A31, 351 avenue de la libération, 33400 Talence, France

LISTE D'ABREVIATIONS .....	7
<b>I - L'ELECTROMAGNETISME.....</b>	<b>9</b>
<b>1- Notions générales.....</b>	<b>9</b>
<b>2- Signaux environnementaux .....</b>	<b>12</b>
A- Spectre électromagnétique .....	12
B- Les CEM RF environnementaux .....	13
a- Évolution de la téléphonie .....	13
b- Wi-Fi et Bluetooth.....	17
<b>II - BIOELECTROMAGNETISME.....</b>	<b>17</b>
<b>1- Mécanisme d'interaction des RF environnementales .....</b>	<b>18</b>
A- Effet thermique.....	18
B- Quantification de l'interaction.....	19
C- Pénétration de l'onde RF .....	20
<b>2- Normes en vigueur .....</b>	<b>21</b>
A- La loi Abeille.....	21
B- Mise en place des normes .....	22
a- Historique.....	22
b- Normes établies .....	26
c- Mise à jour ICNIRP 2020.....	28
<b>3- Bilan des études de ces dernières années .....</b>	<b>29</b>
A- Prolifération et mort cellulaire .....	32
B- Voie MAP kinase .....	35
C- Voie HSF.....	36
D- Canaux TRP .....	37
<b>III - CIBLES BIOLOGIQUES D'INTERET .....</b>	<b>40</b>
<b>1- Développement et mort cellulaire .....</b>	<b>40</b>
A- Développement .....	40
B- Apoptose.....	41
C- Nécrose.....	45
D- Autophagie.....	47
<b>2- Cibles moléculaires étudiées.....</b>	<b>50</b>
A- La voie des MAP kinases .....	50
a- Activation de la voie ERK/MAPK et RAS .....	52
b- ERK1/2 .....	53
c- ERK5 .....	54
d- MAP kinase p38.....	54
e- JNK .....	54
f- MAP kinases atypiques (ERK3/4 ; ERK7/8 ; NLK).....	55
B- HSF et HSP.....	56
a- HSF .....	56
b- HSP .....	60
C- SUMOylation de PML.....	62
a- PML .....	62
b- SUMOylation .....	67

D- Canaux TRP .....	69
a- TRPV4 .....	71
b- TRPM8 .....	74
c- TRPA1 .....	75
IV - METHODES D'ETUDE UTILISEES.....	78
<b>1- Méthodes sans marquage.....</b>	<b>78</b>
A- Holomicroscopie .....	78
a- Principe .....	78
b- Système utilisé .....	79
B- Impédancemétrie .....	81
a- Principe .....	81
b- Système utilisé .....	81
<b>2- Méthodes d'étude utilisant des sondes moléculaires encodées génétiquement .....</b>	<b>83</b>
A- Transfert d'énergie en résonance de Förster .....	83
B- Transfert d'énergie en résonance de <b>fluorescence</b> (FRET) .....	85
C- Accepteur d'énergie fluorescent : La mNeonGreen .....	86
D- Transfert d'énergie en résonance de <b>bioluminescence</b> (BRET).....	87
E- Donneur d'énergie bioluminescent : la nanoLuciférase .....	91
V - ÉTUDE DE L'IMPACT DES RADIOFREQUENCES SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA MORT CELLULAIRE A L'AIDE DE METHODES NON DISCRIMINANTES.....	93
VI - ÉTUDE DE L'IMPACT DES RADIOFREQUENCES SUR LES VOIES METABOLIQUES DE REPONSES AU STRESS SUR CELLULES EN CULTURE.....	115
VII - ÉTUDE DE L'ACTIVITE DE CANAUX IONIQUES THERMOSENSIBLES SOUS EXPOSITION RF A L'AIDE DU BRET .....	138
<b>1- Introduction .....</b>	<b>138</b>
<b>2- Matériel et méthodes .....</b>	<b>141</b>
<b>A-Biologie cellulaire .....</b>	<b>141</b>
<b>B-Vecteurs d'expression des protéines de fusion d'intérêt .....</b>	<b>141</b>
a- Sondes intermoléculaires .....	141
b- Sondes intramoléculaires de première génération .....	142
c- Sondes intramoléculaires de seconde génération .....	142
<b>C-Biologie moléculaire .....</b>	<b>143</b>
a- Clonage par assemblage Golden Gate .....	143
b- Transfections transitoires .....	145
<b>D-Bioluminescence par transfert d'énergie en résonance (BRET).....</b>	<b>146</b>
a- Doses-réponses de l'effet d'un agoniste sur l'activation des canaux TRP .....	146
b- Effet de la variation de température sur l'activation des canaux TRPV4, TRPM8 et TRPA1.....	147
<b>E-Système d'exposition aux RF : Cellule TEM adaptée au BRET .....</b>	<b>148</b>
<b>F- Méthodes de thermorégulation expérimentales.....</b>	<b>150</b>

a- Variations de températures en conditions expérimentales .....	150
b- Régulateur PID .....	152
c- Matériel développé.....	155
<b>G-Analyses statistiques .....</b>	<b>160</b>
<b>3- Résultats .....</b>	<b>160</b>
<b>A- Dosimétrie radiofréquence .....</b>	<b>161</b>
a- Dosimétrie numérique.....	161
b- Dosimétrie expérimentale .....	162
<b>B- Paramétrage du PID .....</b>	<b>164</b>
<b>C- Mesure de la variation de signal de BRET en fonction de la température sans exposition RF avec le système de thermorégulation Peltier .....</b>	<b>166</b>
<b>D- Mesure de la variation de signal de BRET en fonction de la température sous exposition RF avec le système de thermorégulation fluidique .....</b>	<b>173</b>
<b>E- Mesure de la variation de signal de BRET en présence de ligands spécifiques des canaux ciblés .....</b>	<b>174</b>
a- Impact de la température sur la réponse aux ligands des sondes BRET ciblant TRPV4 .....	174
b- Caractérisation de la sonde ciblant TRPA1 dans le mode d'activation chimique .....	178
c- Caractérisation de la sonde ciblant TRPM8 dans le mode d'activation chimique.....	179
<b>4- Discussion.....</b>	<b>181</b>
A- Caractérisation de la réponse des sondes BRET intramoléculaires ciblant les canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4 lors de variations de température avec un système de thermorégulation Peltier.....	182
B- Caractérisation de la réponse des sondes BRET intermoléculaires ciblant les canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4 lors de variations de température effectuées avec un système de thermorégulation Peltier.....	183
C- Développement d'un système de thermorégulation fluidique finalisé pour mieux caractériser le comportement thermique des canaux thermo-TRP sur exposition RF.....	186
D- Caractérisation de la réponse des sondes BRET ciblant les canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4 en présence de ligands spécifiques des canaux étudiés à différentes températures .....	188
E- Proposition d'un modèle expliquant les réponses synergiques des canaux thermo-TRP en fonction des différentes stimulations.....	190
<b>5- Conclusions et perspectives .....</b>	<b>191</b>
<b>VIII- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>194</b>
<b>1- Conclusions des trois études.....</b>	<b>194</b>
<b>2- Impacts des RF sur l'eau liée aux macromolécules biologiques .....</b>	<b>194</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>198</b>
<b>ANNEXE 1 – TABLEAU REUNISSANT LES PARAMETRES D'EXPOSITIONS DES REFERENCES DE LA PARTIE SUR LE BIOELECTROMAGNETISME DES PROTEINES DE LA VOIE MAPK.....</b>	<b>239</b>
<b>ANNEXE 2 – TABLEAU REUNISSANT LES PARAMETRES D'EXPOSITIONS DES REFERENCES DE LA PARTIE SUR LE BIOELECTROMAGNETISME DES PROTEINES HSF&amp; HSP.....</b>	<b>242</b>
<b>ANNEXE 3 – ARTICLES EN SECOND OU TROISIÈME AUTEUR .....</b>	<b>252</b>

## Liste d'abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique	Hz : Hertz
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Trioxyde d'arsenic	ICNIRP : Commission internationale de protection contre les radiations non-ionisantes
ATP : Adénosine-Triphosphate	
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer (Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence)	IPTG: Isopropyl β-d-1-Thiogalactopyranoside
Ca <sup>2+</sup> : Ion calcium	LB: Lysogeny Broth
CaM : Calmoduline	M8B : M8B Hydrochloride
CEM : Champs Électromagnétiques	MG132 : Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal
CI: Cell Index	mNeonG: mNeonGreen
CMA : Autophagie Médiée par des protéines chaperonnes (Chaperone-mediated autophagy)	mV: Millivolt
CW: Continuous Wave (Onde continue)	mW: Milliwatt
DAS : Débit d'Absorption Spécifique (SAR en anglais)	NLuc : Nano-Luciférase
DAG : Diacylglycerol	nm : Nanomètre
dBm : Rapport de puissance en décibels (dB) entre la puissance mesurée et un Milliwatt	PBS: Phosphate Buffered Saline
DMEM rouge : Dulbecco's Modified Eagle Medium avec du rouge phénol	PEI : Polyethyleneimine
DTT : DiThioThréitol	PIP2 : Phosphatidylinositol bisphosphate
EC50 : Dose Efficace 50, dose entraînant 50 % de l'effet maximal	PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
EDTA : ÉthylèneDiamineTétraAcétique	PML: Promyelocytic leukemia protein
FDTD : Domaine Temporel de Différences Finies	RET: Resonance Energy Transfer (Transfert d'énergie par résonance)
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases	RF : Radiofréquence
FRET : Förster Resonance Energy Transfer (transfert d'énergie par résonance de type Förster)	RLuc : Renilla Luciferase
	Sec : Seconde
	SEM : Erreur Standard de la Moyenne
	SUMO1: Small ubiquitin-related modifier 1
	SVF : Sérum de Veau Fœtal

GFP : Green Fluorescent Protein

GSK101: GSK1016790A

GSM: Global System for Mobile

HEK293T: Human Embryonic Kidney 293T

HSF: Heat Shock Factor

HSP: Heat Shock Protein

T75 : Flasque de 75 cm<sup>2</sup> de surface

TRP: Transient Receptor Potential

TST : Temps de Sommeil Total

XGal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-

D-galactopyranoside

YFP: Yellow Fluorescent Protein



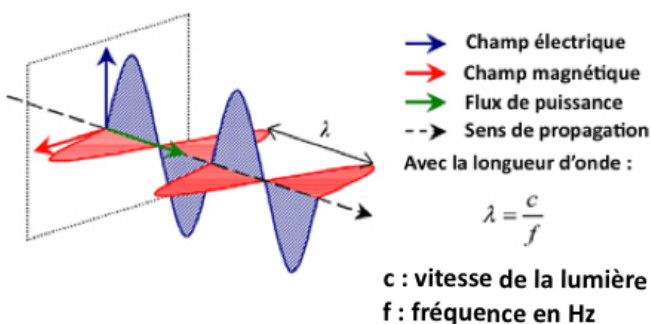
# I - L'électromagnétisme

## 1- Notions générales

Au début du XIX<sup>e</sup> siècle, l'électromagnétisme était défini par trois grands théorèmes (Lindell, 2005), qui sont :

- Le théorème de Gauss, qui permet de calculer le flux d'un champ électrique à travers une surface fermée, en connaissant les charges électriques qu'elle renferme (Xiaolan *et al*, 2011).
- Le théorème d'Ampère, qui permet de déterminer la valeur du champ magnétique grâce à la mesure des courants électriques (Martin, 2020 partie 22.3 : Ampere's law).
- Le théorème de Faraday, qui permet de rendre compte des phénomènes macroscopiques d'induction électromagnétique (Kinsler, 2020).

Chacun de ces théorèmes définissait une partie de l'électromagnétisme de manière indépendante. C'est en 1865 que Maxwell réussit à unifier l'ensemble de ces concepts électriques et magnétiques à l'aide d'une vingtaine d'équations (Saslow, 2002). Ces équations ont été ensuite reformulées par Olivier Heaviside (Hampshire, 2018) en quatre équations différentielles que nous utilisons aujourd'hui. Ces équations sont communément identifiées comme « équations de Maxwell ». Il a ainsi réussi à montrer qu'une onde électromagnétique plane est composée d'un champ électrique sinusoïdal  $\vec{E}$  exprimé en volt par mètre (V/m), et un champ magnétique  $\vec{H}$  de même période, exprimé en ampère par mètre (A/m).  $\vec{E}$  et  $\vec{H}$  sont perpendiculaires et se propagent dans une même direction, de manière perpendiculaire à leur plan de propagation, à la vitesse de la lumière ( $3 \times 10^8$  m/s dans le vide). Ces paramètres seront conservés tant qu'aucun obstacle n'est rencontré. Cette propagation s'accompagne d'un flux d'énergie (en W/m<sup>2</sup>) comme représenté dans la Figure 1.



**Figure 1** - Représentation de la propagation d'une onde électromagnétique plane dans l'espace. En bleu, est représenté le champ électrique qui se propage de manière perpendiculaire au champ magnétique en rouge. Le sens de propagation suit le flux de puissance en vert. Source : <https://ondes-info.ineris.fr/node/1>

Ce flux est proportionnel au vecteur de Poynting ( $\vec{S}$ ) (Tombe, 2020), représentant la valeur et la direction de la densité de flux électromagnétique, c'est-à-dire, la densité de flux lié à la propagation de l'onde qui peut s'écrire sous la forme décrite dans l'Équation 1 :

Équation 1 : 
$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H}$$

Dans le cas d'une onde de propagation, la densité d'énergie, c'est-à-dire la puissance transmise à travers une surface, se traduit par l'intégrale de  $\vec{S}$  sur la surface. La longueur de  $\vec{S}$  est alors exprimée en watt par mètre carré ( $W/m^2$ ). Toujours dans le cas d'une onde plane, elle est dépendante des valeurs des champs magnétiques  $\vec{H}$  et électriques  $\vec{E}$ .

Le rapport constant de la valeur du champ électrique  $\vec{E}$  et du champ magnétique  $\vec{H}$ , pour une onde plane, est appelé **impédance caractéristique** (noté  $Z$ ), et dépend de la permittivité et de la perméabilité du milieu que l'onde traverse. Dans le cas le plus simple, c'est-à-dire dans le vide,  $Z = 120 \pi$  soit environ  $377 \Omega$  (Wilson, 2017) d'après la relation  $Z = \vec{E}/\vec{H}$ .

Cependant, les ondes planes ne représentent qu'une partie de l'ensemble des ondes électromagnétiques caractérisables lors d'une exposition environnementale. C'est d'autant plus vrai lorsqu'on est proche d'une source de champs électromagnétiques (CEM) radiofréquences (RF). Dans cette situation, nous pouvons diviser le CEM transmis par une antenne en deux régions distinctes. La plus proche de l'antenne sera la région des champs proches, et la plus éloignée sera celle des champs lointains. La frontière entre ces deux champs est égale à  $r$  selon l'Équation 2 (où  $a$  est la plus grande dimension de l'antenne).

Équation 2 : 
$$r = 2a^2/\lambda$$

En champs lointains,  $\vec{E}$  et  $\vec{H}$  sont liés par les différentes équations présentées dans ce chapitre et donc l'exposition peut être caractérisée par uniquement l'un de ces deux champs. Ce n'est pas le cas en champ proche où l'exposition doit être caractérisée par les deux champs.

Il est intéressant de noter que, du fait de la relation  $\vec{B} = \mu \vec{H}$ , c'est l'induction magnétique  $\vec{B}$  (aussi appelée flux magnétique et exprimée en Tesla, T) qui représentera souvent le champ magnétique. Ainsi, en plus de l'intensité  $\vec{H}$ , il faut prendre en compte  $\mu$  (la perméabilité magnétique du milieu) pour calculer  $\vec{B}$  (Tombe, 2020).

Plusieurs paramètres non cités ci-dessus restent importants dans l'étude d'une onde électromagnétique. Pour commencer, on peut caractériser une onde électromagnétique par sa fréquence ( $f$ ), qui correspond au nombre de périodes effectuées par le champ électrique ou magnétique en un point donné en une seconde, et qui est exprimée en hertz (Hz). La distance entre deux crêtes ou deux creux consécutifs est la longueur d'onde ( $\lambda$ ). Cette dernière est liée à la fréquence selon l'Équation 3 (Kryjevskaja *et al*, 2012).

Équation 3 : 
$$v = f \lambda$$

Où  $v$  est la vitesse ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de propagation de l'onde dans le milieu. Si le milieu est le vide, cette vitesse est égale à la vitesse de la lumière dans le vide, et sera notée  $c$ . L'intensité des champs électriques et des champs magnétiques composant l'onde est également importante au même titre que la direction prise par le champ électrique, nommée polarisation électrique (P).

La vitesse de l'onde dépendra des propriétés électriques du milieu, donc de :

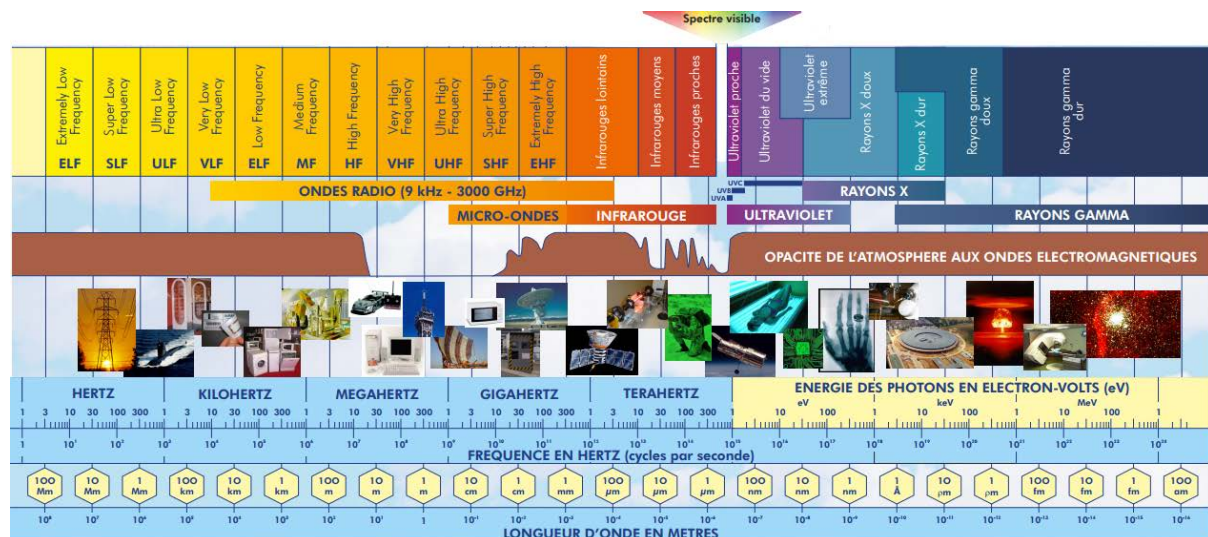
- La **perméabilité ( $\mu$ )**, mesure de l'interaction du milieu avec le champ magnétique. Il s'agit de la capacité d'un matériau à modifier le champ magnétique  $\vec{B}$  incident. Elle est mesurée en henry par mètre (H/m), ou en newton par ampère carré ( $\text{N}/\text{A}^2$ ). Pour les matériaux non ferromagnétiques comme les systèmes biologiques, cette valeur est proche de celle du vide ( $\mu_0 \approx \mu = 4\pi \cdot 10^{-7}$  (H/m)). Les champs magnétiques peuvent donc nous traverser sans que cela interfère dans leur progression. Elle se calcule selon la formule  $\mu = \mu_0 \mu_r$  où la variable  $\mu_r$  dépend du milieu. Cette formule nous indique que pour tenir compte de la perméabilité magnétique du milieu, l'induction magnétique doit être notée  $\vec{B} = \mu_0 \mu_r \vec{H}$  (Yan *et al*, 2008).
- La **permittivité ( $\epsilon$ )**, mesure de l'interaction du milieu avec le champ électrique. Il s'agit de la manière dont le milieu va répondre à l'application du champ électrique. C'est le paramètre le plus variable dans un système biologique. On distingue donc la constante de permittivité du vide  $\epsilon_0$  ( $8,854187 \times 10^{-12}$  F.m<sup>-1</sup>) de la permittivité relative (ou constante diélectrique) en présence de matière. La permittivité relative se calcule alors comme  $\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$ . En tenant compte du fait que l'indice de réfraction du milieu ( $n$ ) est dépendant de  $\epsilon_r$ , et de la température du milieu, ainsi que de la fréquence du champ électrique incident (Andryieuski *et al*, 2015).

Les rayonnements électromagnétiques sont l'association des champs électriques et magnétiques (Kimura, 2020). Lorsqu'un champ électromagnétique traverse la matière, son énergie est absorbée. Du fait de la relation  $E = hc/\lambda$ , plus la longueur d'onde est faible, plus il transférera d'énergie à la matière traversée.

## 2- Signaux environnementaux

### A- Spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique comprend l'ensemble des fréquences des champs statiques aux fréquences virtuellement infinies. On peut classer ces fréquences sur un spectre électromagnétique suivant leur longueur d'onde. Toutes ces ondes ne sont pourtant pas présentes dans notre environnement quotidien. Certaines ne sont pas naturellement présentes sur terre et ne peuvent pas traverser l'atmosphère (Figure 2).



**Figure 2** - Spectre électromagnétique indiquant de haut en bas la dénomination de chaque gamme d'onde avec leurs acronymes, leur capacité à se propager dans l'atmosphère, des exemples de source de ces ondes, leur fréquence et enfin leur longueur d'onde.

Source : <https://fr.scribd.com/document/368418683/POSTER-Spectre-Electromagnetique>

Ce spectre est divisé en différentes bandes de fréquences. C'est leur fréquence qui définit la manière dont les CEM interagissent avec la matière, et donc leurs domaines d'application. Ces CEM peuvent être utilisés aussi bien pour transporter de l'information de manière dématérialisée dans le cadre de la communication, que, à de plus hautes fréquences, comme vecteurs énergétiques par exemple lors des radiothérapies ou en imagerie médicale. Cette thèse traitera de l'effet des RF, une gamme de fréquences allant de 100 kHz à 300 GHz (vecchia *et al*, 2009a). Il s'agit d'une gamme de fréquences utilisée dans l'imagerie médicale

par résonance magnétique (IRM)(Murbach *et al*, 2015), le chauffage (micro-ondes) (Ramaswamy & Tang, 2008), ou le transfert d'énergie (système Qi)(Lu *et al*, 2015). Il s'agit également de la gamme de fréquences utilisée au quotidien pour les télécommunications (vecchia *et al*, 2009a), ce qui rend les ondes RF omniprésentes dans notre environnement.

## B- Les CEM RF environnementaux

Nous sommes aujourd'hui exposés au quotidien aux signaux RF. Ils comprennent tous les systèmes permettant la télécommunication sans fil. Au cours du temps, de plus en plus de procédés industriels reposent sur la fluidité de ces télécommunications. Différents types de signaux ont ainsi vu le jour.

### a- Évolution de la téléphonie

L'utilisation des signaux RF pour la communication sans fil a connu une nette expansion ces dernières décennies (Figure 3).

1980	1990	1997	2005	2011	2013	2015	2017	2020
<b>1G</b>	<b>2G</b>	<b>2,5G</b>	<b>3G</b>	<b>3G+</b>	<b>4G</b>	<b>4G+</b>	<b>4G+</b>	<b>5G</b>
2,4 kbit/s Appels vocaux	9,6 kbit/s SMS	40 kbit/s MMS	384 kbit/s Internet	3,6 Mbit/s	80 Mbit/s Vidéos	300 Mbit/s	600 Mbit/s Vidéos sans latence	20 Gbit/s IoT Robotique

**Figure 3** - Représentation chronologique de l'apparition des différentes générations de téléphonie mobile et exemples d'applications. Image inspirée de Gupta (2013) et de différentes frises chronologiques.

La première génération de téléphonie mobile (1G) est apparue en 1979 au Japon (Gupta, 2013). Celle-ci se propagea rapidement à l'international dans les années qui suivirent. Il s'agit d'un réseau où la voix est **modulée en fréquences avec un encodage analogique**. Cet encodage utilise des signaux variés de manière continue dans le temps, pouvant prendre une infinité de valeurs différentes. La fréquence de la porteuse utilisée pour la 1G allait de 824 à 900 MHz avec un débit de 2,4 kbits/s pour une distance de communications allant de 2 à 20 km. Elle utilisait un multiplexage en fréquences (FDMA ; Frequency division multiple access) où la bande passante totale est divisée en plusieurs fréquences non superposées. Chaque utilisateur disposait d'une fréquence différente. Les normes liées à cette génération de téléphonie étaient au nombre de trois suivant les pays. La première norme de réseau de téléphonie mobile était l'AMPS (Advanced Mobile Phone System). Elle est apparue en 1976 et

entra en vigueur aux États-Unis, en Russie et en Asie. Une seconde norme fut utilisée en Europe, le TACS (Total Access Communication System). Ce système fut notamment largement utilisé en Angleterre, à Hong-Kong et au Japon. Au Royaume-Uni, ce système fut amélioré pour donner naissance à l'ETACS (Extended Total Access Communication System) qui disposait d'un plus grand nombre de canaux de communication. Ces normes ont uniquement pour objectif la répartition des bandes de fréquences et la régulation de leur utilisation. Cette génération de téléphonie n'avait que de faibles mécanismes de sécurité rendant possible le piratage de lignes téléphoniques.

La seconde génération de téléphonie mobile (2G) est la première à utiliser un **encodage numérique**. L'encodage numérique utilise des signaux pouvant prendre un nombre déterminé de valeurs discrètes. L'ensemble des générations suivantes de téléphonie ont utilisé ce type d'encodage. La 2G repose sur les normes GSM (Global System for Mobile), cette génération utilise des fréquences de 900 MHz à 1,8 GHz. Elle peut couvrir une zone de 10 à 30 km et a un débit de données de 9,6 kbit/s (Gupta, 2013). A titre d'illustration, télécharger une vidéo de 2h en MP4 (x264) prendrait 9 jours et 12 heures avec la 2G. Contrairement à la 1G qui utilisait un système FDMA, la 2G combine un système CDMA (Code division multiple access) et TDMA (Time division multiple access). Le CDMA sépare les appels en attribuant à chacun un code. Plusieurs émetteurs font ainsi transiter des informations simultanément sur un même canal. Contrairement à la FDMA, elle ne limite pas l'utilisation d'une fréquence à une seule conversation. À cela s'ajoute le TDMA, une méthode qui attribue un intervalle de temps à chaque conversation. Ainsi plusieurs conversations peuvent partager la même fréquence puisque l'intervalle de temps alloué est différent d'une conversation à l'autre. Si trois intervalles de temps sont répartis équitablement sur trois conversations passant par une même fréquence, alors trois appels peuvent être passés simultanément sur cette fréquence. Ainsi, grâce à ces avancées technologiques, la 2G a permis de crypter numériquement les conversations téléphoniques. Outre le gain en sécurité, une meilleure utilisation et répartition des bandes de fréquences a permis de désengorger le réseau en mettant plus d'utilisateurs par bandes de fréquences. Ce fut également le début des services de données mobiles avec l'arrivée des SMS (Short Message Service). Elle fut ensuite améliorée au cours du temps pour être plus efficace et permettre le transfert de plus de données et l'apparition des MMS (Multimedia Messaging Service). On passa alors aux normes GPRS (General Packet Radio

Service) avec la 2,5G. Celle-ci a permis de passer à un débit de 40 kbits/s. Si nous reprenons l'exemple de la vidéo utilisé plus haut, le téléchargement prendra 2,5 jours contre 9,5 avec la version précédente. Puis arriva la norme EDGE (Enhanced Data GSM Environment ; 2,75G) avec un débit de 128 kbits/s. Le téléchargement de la vidéo indiquée précédemment ne prendrait alors que 18 heures de téléchargement.

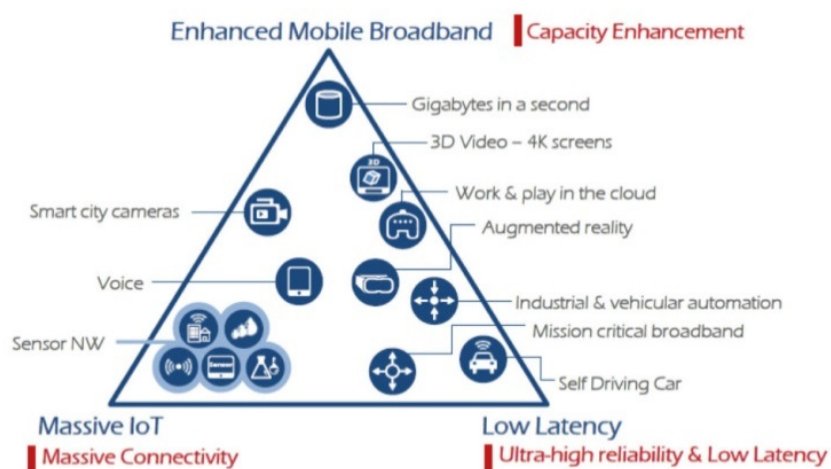
Pour améliorer encore les performances du réseau, la 3G vit le jour (Gupta, 2013). L'objectif de cette génération est de fournir des services multimédias de meilleure qualité et une plus grande couverture du réseau. Basée sur les normes UMTS (Universal Mobile Telecommunications System), la 3G dispose d'une porteuse entre 900 MHz et 2,1 GHz. Son débit est de 384 kbits/s. La vidéo de 2h en MP4 (x264) ne prendrait que six heures pour être téléchargée avec la 3G. Des améliorations ont été apportées à ce système donnant le HSDPA (High Speed Downlink Packet Access ; 3,5G ou H ou 3G+) permettant un débit de 3,6 Mbits/s. Avec la 3G+, une vidéo de 2h peut être alors téléchargée en cinq minutes.

Le système actuellement utilisé est un réseau 4G, donc de quatrième génération, correspondant aux normes LTE (Long-Term Evolution). Le débit est de 10 à 80 Mbits/s selon le lieu et le nombre d'utilisateurs du réseau. La fréquence d'émission est entre 700 MHz et 2,7 GHz. Une vidéo d'une durée de 2h peut être téléchargée en environ une minute grâce à la 4G. Cependant pour améliorer encore les performances, la 4G+ (norme LTE-A ou LTE-Advanced) a vu le jour. Le débit passa alors à 300 Mbit/s, et même 600 Mbits/s suivant le matériel utilisé. Une vidéo de 2h peut ainsi être téléchargée en vingt secondes.

Aujourd'hui, une nouvelle génération de téléphonie mobile est en cours de déploiement. Il s'agit de la 5G (normes NR pour New Radio). Pour optimiser le réseau et la congestion radio, la technologie 5G utilisera ultimement plusieurs bandes et plusieurs types de technologies réseaux. Deux bandes de fréquences lui sont allouées, nommées Frequency Range (FR). La bande FR1 va de 410 MHz à 7,125 GHz et sera utilisée pour aller jusqu'à 200 km. La bande entre 24,25 GHz et 71 GHz permettra d'aller de 10 à 100 mètres. Cette génération de téléphonie permettra des débits théoriques de 20 Gbits/s. Autrement dit, le téléchargement d'une vidéo de 2h en MP4 x264 de 1Go ne prendra que 0,4 secondes.

Les applications possibles de la 5G vont plus loin. Avec la 4G, nous commençons à voir apparaître de plus en plus d'appareils contrôlables à distance. Ces contrôles nécessitent des réponses quasiment instantanées et donc des débits de connexion importants. La 5G est

conçue pour améliorer la technologie 4G LTE. Comme illustré Figure 4, la 5G vise à répondre à l'augmentation exponentielle d'appareils connectés ainsi qu'à leurs utilisateurs, tout en prenant en compte la nécessité d'une plus grande fiabilité et d'une latence plus faible (Sundhar & Miller, 2017; Chávez-Santiago et al, 2015). Ces services permettront, par exemple, de développer des services médicaux à distance à l'aide de robots télécommandés depuis un autre pays. Nous pourrions également voir apparaître des applications liées à la réalité virtuelle. Il sera également possible d'utiliser la 5G pour des communications machine-machine. Cette situation pourrait être utilisée dans certaines industries ou pour la circulation de véhicules autonomes.



**Figure 4** - Principales caractéristiques et exigences des réseaux 5G. Image issue du site : Source : <https://www.sdxcentral.com/5g/definitions/what-is-5g/5g-standards/>

Puisque la 5G monte en gamme de fréquences, il y aura également des contraintes physiques à sa propagation. Plus la fréquence d'une onde électromagnétique augmente, moins l'onde sera capable de se propager loin. Pour pallier ce problème, il faudra installer des relais 5G dans la rue (arrêts de bus, feux de circulation, ...) pour assurer un réseau homogène. *In fine*, le réseau 5G permettra de faire face à l'augmentation exponentielle du trafic multimédia et des appareils connectés. Effectivement, si le nombre d'utilisateurs mobiles était 5,3 milliards en 2021, ce qui représente 67 % de la population mondiale, le nombre d'appareils IoT (*Internet of Things*) pourrait atteindre 22 milliards d'ici 2025. On comprend, dans ce nombre, tous les appareils du quotidien qui fonctionnent via l'internet sans fil (Pau *et al*, 2018). Cela réunit notamment l'électroménager intelligent, les voitures connectées, et les terminaux privés tels que Siri ou Cortana par exemple et cela ouvre des perspectives industrielles considérables (Kang *et al*, 2015).



Le champ d'application de la 5G est déjà vaste alors que son déploiement a seulement commencé en 2020. Pour le moment en Europe, la 5G est déployée à une fréquence de 3,5 GHz et coexiste avec les précédentes générations de téléphonie mobile. La bande 26 GHz est également en cours de déploiement pour la couverture extérieure au sein des réseaux denses d'après l'autorité de régulation des communications électroniques, des postes et de la distribution de la presse (*Tableau de bord des expérimentations 5G en France - ARCEP*).

#### *b- Wi-Fi et Bluetooth*

D'autres méthodes de communication sans fil ont également vu le jour comme le Bluetooth et le Wi-Fi. Le Bluetooth permet de transférer des données sur de faibles distances et entre plusieurs appareils. Il consomme peu d'énergie et a une portée de dix mètres avec une porteuse à 2,4 GHz (Yin *et al*, 2019). La première génération de la technologie Bluetooth permettait un débit de 720 kbit/s. Elle a été améliorée jusqu'à la 5<sup>ème</sup> génération qui permet un débit de 2 Mbit/s et va jusqu'à soixante mètres.

Le Wi-Fi permet également un transfert de données à distance. Depuis la première génération de Wi-Fi (norme 802.11a), ce dernier a énormément évolué. La dernière évolution accessible au public suit les normes 802.11ax, c'est le Wi-Fi 6 (Krishan, 2019). Il s'agit d'une version disposant des bandes de 2,4 et 6 GHz, avec une portée de soixante-dix mètres et un débit de 10 Gbit/s. Cependant une nouvelle version encore plus performante est en cours de développement : la norme 802.11ay, qui devrait avoir une bande de fréquence entre 45 et 60 GHz avec un débit théorique de 100 Gbit/s.

## II - Bioélectromagnétisme

Le bioélectromagnétisme, au sens auquel nous l'entendons dans ce travail de doctorat, consiste en l'étude des effets biologiques des CEM sur des modèles animaux et cellulaires. L'un des enjeux du bioélectromagnétisme au niveau environnemental est de vérifier que l'exposition à des champs RF, émis à des niveaux inférieurs aux normes en vigueur, n'entraîne pas d'effets biologiques ou sanitaires. Le cas échéant, il conviendrait de caractériser ses effets afin de préciser les normes en vigueur.

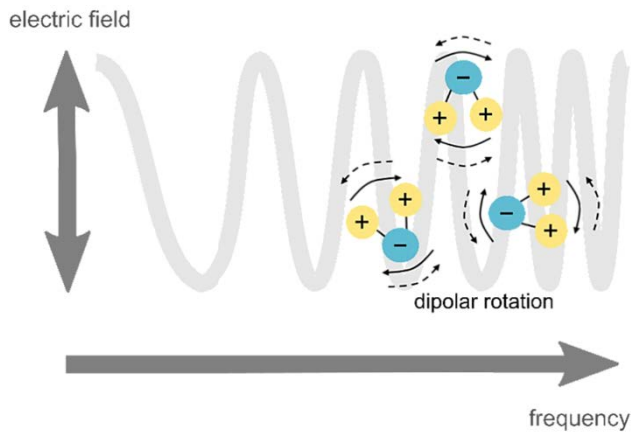
## 1- Mécanisme d'interaction des RF environnementales

### A- Effet thermique

L'impact du champ électrique sur la matière est dépendant du matériau étudié. Ainsi un matériau peut être désigné comme diélectrique s'il ne contient pas de charges pouvant être déplacées. Si les matériaux diélectriques sont souvent des matériaux isolants comme l'eau pure, ils restent sensibles aux champs électriques. Le champ  $\vec{E}$  peut induire une polarisation  $\vec{P}$  des matériaux diélectriques contenant des molécules dipolaires.

La molécule dipolaire majoritaire de notre organisme est l'eau. La polarité de cette molécule tient dans la différence d'électronégativité de ses différents atomes et de son agencement particulier. En effet, la molécule d'eau possède un atome d'oxygène plus électronégatif que les deux atomes d'hydrogène qui le borde. De plus les atomes d'hydrogènes forment un angle de  $104,45^\circ$  avec l'atome d'oxygène. Cette angulation aboutie à la formation d'un dipôle électrique permanent (Raghavan et al, 2005).

L'eau représente 65 % de notre masse, mais en quantité, elle représente 98 % des molécules de notre corps. Dans notre organisme, c'est donc avec l'eau que les CEM RF vont entrer principalement en interaction. Les molécules d'eau libre sont par défaut orientées de manière aléatoire dans notre organisme. Or, lors de l'exposition de molécules d'eau à un CEM les pôles positifs des molécules d'eau vont s'orienter dans la direction du champ électrique. C'est la constante diélectrique de la molécule qui déterminera sa capacité à s'orienter dans le sens du champ électrique. Ce phénomène est le phénomène de polarisation (Içier & Baysal, 2004). Si les molécules d'eau libre peuvent s'orienter parfaitement dans la direction du champ électrique jusqu'à 100 MHz, un retard dans la polarisation des molécules d'eau est observable à partir de cette fréquence. Ce retard est maximal aux alentours de 26 GHz. Ce phénomène est dû aux interactions entre les molécules en présence au moment de l'orientation du moment dipolaire des molécules d'eau dans le sens du champ électrique (*Figure 5*). Le déphasage de l'oscillation entre les molécules dipolaires soumises au champ électrique entraîne des pertes d'énergie de l'onde électromagnétique sous forme de chaleur (Chandrasekaran et al, 2013). On parle de **pertes diélectriques** (Zhu et al, 2012).



**Figure 5** - Représentation schématique du mécanisme d'échauffement par rotation dipolaire lors d'exposition aux RF. D'après Curet, 2019.

## B- Quantification de l'interaction

**L'énergie RF absorbée** est quantifiée au travers du **débit d'absorption spécifique (DAS, SAR en anglais)**, qui mesure l'énergie absorbée par unité de masse du matériau exposé (en J/kg). Le DAS est une mesure de la puissance d'un flux d'énergie (issu de RF entre 100 kHz et 10 GHz) pouvant être absorbé par un corps. Autrement dit, c'est une mesure de la puissance RF absorbée par unité de masse. Son unité est le W/kg.

Il est calculable à partir du champ électrique ( $\vec{E}$  en V/m), et de l'élévation de température ( $dT/dt$  en K/s) (Équation 4) dans le matériau étudié.

Équation 4 :

$$DAS = \frac{\sigma E^2}{2\rho} = c_i \frac{dT}{dt}$$

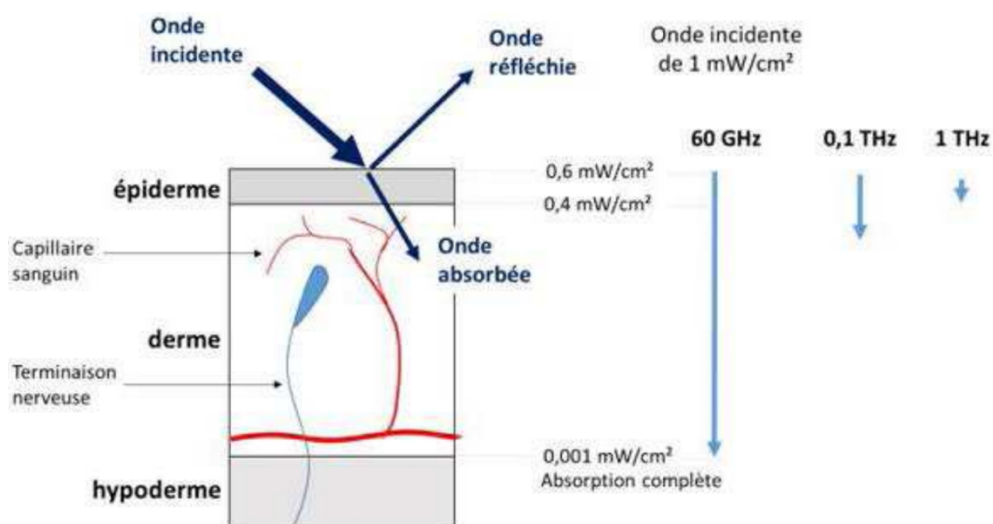
Cette équation est écrite avec les variables :  $\rho$  la masse volumique de l'objet en  $\text{kg/m}^3$ ,  $\sigma$  la conductivité électrique de l'objet en S/m et  $c_i$  la capacité thermique de l'objet en  $\text{J}/(\text{kg K})$ . La valeur du DAS dépendra donc de la géométrie de l'objet étudié, de l'énergie RF de l'émetteur et de la distance par rapport à l'émetteur. Ce sont pour ces raisons que le calcul du DAS doit être effectué avec un appareillage dédié et dans des conditions parfaitement caractérisées. Par conséquent, les normes établies pour une exposition globale et une exposition locale sont différentes. Ces différences, ainsi que la manière dont sont déterminées ces normes seront expliquées dans la partie II-2-B- de ce manuscrit. Un exemple concret de calcul du DAS dans des conditions expérimentales sera donnée dans la partie VII-3.

Lorsque nous calculerons le DAS, nous aurons recours à deux méthodes. La première est une méthode de dosimétrie numérique et la seconde de dosimétrie expérimentale. La dosimétrie numérique prend en compte l'objet choisi, la résolution des équations de Maxwell (ou équations de propagation des ondes) et la source électromagnétique utilisée. En ce qui

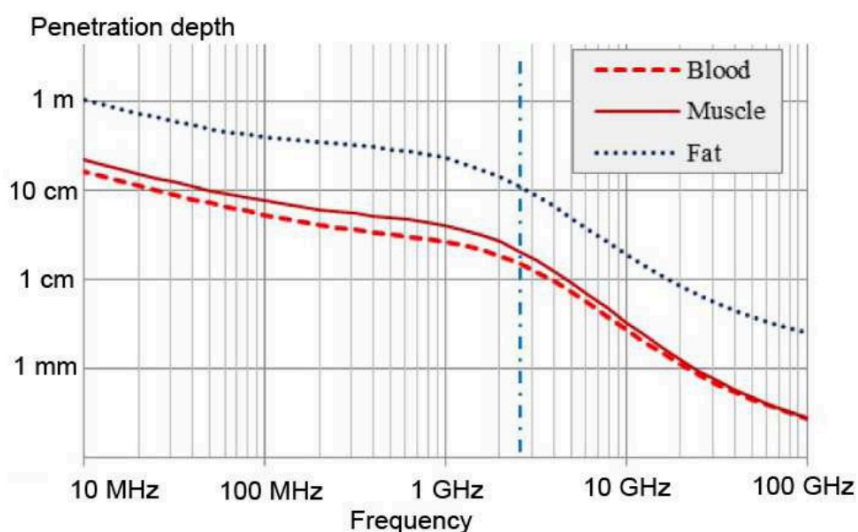
concerne les équations de propagation des ondes, c'est la méthode FDTD (*Finite Difference in Time Domain*) qui sera utilisé pour établir notre dosimétrie numérique. Il s'agit d'une méthode classiquement utilisée pour calculer le DAS dans un objet exposé aux ondes (Aly & Piket-May, 2014; Lwin & Yokota, 2019). Cette méthode permet la résolution directe des équations de Maxwell. Pour la mesure expérimentale, nous allons mesurer l'élévation de température d'un volume déterminé de liquide lors d'une exposition aux RF. Le volume dans lequel seront faites les mesures de température sous exposition RF sera le même que le volume de milieu utilisé lors des expérimentations biologiques ultérieures, avec les mêmes caractéristiques diélectriques. De même, le système d'exposition et les conditions dans lesquelles nous mesurerons le DAS seront les mêmes que les conditions expérimentales utilisées.

### C- Pénétration de l'onde RF

La cible biologique à étudier dépend des caractéristiques de l'exposition RF, et les tissus d'intérêt en bioélectromagnétisme environnemental vont changer avec la 5G. En effet, à 3,5GHz (5G actuellement déployée), la pénétration dans l'organisme est de l'ordre du centimètre, et à 26 GHz (qui sera déployée dans les années à venir), la pénétration est de l'ordre du millimètre. Ainsi les sujets d'études pour les CEM RF 5G au-delà de 6 GHz porteront principalement sur les cellules de la peau ou les neurones DRG situés sous la peau (EMF-Portal | Radio frequency (10 MHz–300 GHz)). La profondeur de pénétration des CEM RF en fonction de la fréquence est illustrée en Figure 6 et Figure 7.



**Figure 6** - Réflexion et pénétration d'un rayonnement électromagnétique, dans la gamme des radiofréquences, au niveau de la peau humaine en fonction de la fréquence. Source : I. Lagroye, présentation au CGE, section Sécurité et Risques, 13/11/2018



**Figure 7** - Profondeur de pénétration d'un rayonnement électromagnétique, dans la gamme des radiofréquences, dans le corps humain en fonction de la fréquence. Source: Human Exposure to Electromagnetic Fields, Patrick Staebler, Wiley 2017

## 2- Normes en vigueur

Sur la base des connaissances scientifiques, des normes ont été établies qui nous protègent des effets indésirables des champs RF. Ces normes sont régulièrement réévaluées par différents comités tels que l'ICNIRP (*International commission on non-ionizing radiation protection*) ou l'IEEE (*Institute of electrical and electronics engineers*). Ces organismes rédigent des rapports en se basant sur l'avancée de la recherche scientifique (SSM's Scientific Council on Electromagnetic Fields, 2020; ICNIRP, 2020, 2003, 1998). Ces rapports servent ensuite de base à l'OMS (Organisation mondiale pour la santé) et aux différentes autorités de chaque pays pour faire appliquer les lois et décider localement des restrictions de base concernant les appareils utilisant les RF. De même, il revient à chaque pays de vérifier que les normes sont bien appliquées. Par exemple, en France, l'ANFR (Agence nationale des fréquences) a pour mission de vérifier que les normes en vigueur sont respectées. Pour ce faire, elle peut contrôler à tout moment les produits du marché et les expositions dans l'environnement. Les produits non-conformes sont interdits à la vente et ses fabricants encourent une amende.

### A- La loi Abeille

La législation française a évolué en juillet 2020 avec la loi Abeille. Avant cette loi, seuls les terminaux radioélectriques (soit principalement les téléphones mobiles) étaient concernés

par la législation sur l'exposition aux CEM. **Cette législation comprend la mesure de DAS obligatoire avant la mise en vente, et depuis 2010 l'affichage des valeurs de DAS sur les lieux de vente et dans les publicités du produit.** En 2015, la députée Laurence Abeille fait promulguer la loi n°2015-136 (*LOI n°2015-136 du 9 février 2015 relative à la sobriété, à la transparence, à l'information et à la concertation en matière d'exposition aux ondes électromagnétiques (1),2015,2015-136*) qui n'est entrée en vigueur qu'à partir de juillet 2020 (Loi Abeille 2020). Ainsi aujourd'hui, les législations relatives aux RF sont étendues à tout produit émettant des ondes électromagnétiques et susceptibles d'être utilisées à proximité de l'humain. Cette loi s'applique à tous les fabricants, importateurs et distributeurs pour :

- Tous les produits sans fil et connectés.
- Les produits et équipements contenant un ou plusieurs émetteurs d'ondes électromagnétiques dont la puissance totale dépasse 20 mW.
- Les produits et équipements utilisés de manière « raisonnablement prévisible » à une distance inférieure à 20 cm du corps humain.

Cette loi s'ajoute aux mesures déjà en place en Europe, auxquelles doivent se plier les pays membres, telle que la Directive RED (directive européenne 2014/53/UE).

## B- Mise en place des normes

### a- Historique

Avec le développement exponentiel des technologies de communication sans fil, la population a commencé à s'interroger sur l'innocuité des ondes RF. Dans les années 1990, plusieurs pistes sont alors explorées pour définir les seuils d'exposition au-delà desquels des effets biologiques sont mesurés. Ces études portent sur la reproduction, les cancers, mais également sur l'effet connu d'échauffement. Ces études ont permis de poser les bases scientifiques nécessaires à l'établissement de normes.

Les études épidémiologiques portant sur la reproduction et les risque de cancers qui ont été réalisées à la fin du XX<sup>e</sup> siècle ont été peu concluantes du fait d'une « évaluation imparfaite de l'exposition » et d'un « nombre limité de personnes prises en compte » (ICNIRP, 1998). Les informations étaient « trop limitées pour conclure ». En revanche, des études ont été menées en laboratoire sur des volontaires, sur des cultures de cellules et sur des animaux. La suite de ce sous-chapitre résume les recherches ayant mené aux normes établies.

Certaines études ont commencé par pointer le seuil à partir duquel les sujets humains commencent à ressentir des effets thermiques. Parmi elles, l'étude de Chatterjee *et al*, 1986 a montré qu'en passant de 100 kHz à 10 MHz, les sensations passaient du fourmillement (100 kHz) à une chaleur ressentie (à partir de 10 MHz, et jusqu'à 300 GHz). Cette étude renvoie alors au travail de l'ACGIH de 1996 (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) (ACGIH Worldwide, 1996) qui soulignait qu'une augmentation de la température corporelle de 1 à 2°C peut provoquer des coups de chaleur et insulations. Pour l'OMS (World Health Organization & Safety, 1993), une augmentation de température corporelle de 1°C représente la limite haute sans effet nocif. Par conséquent, l'OMS a fixé que le DAS ne doit pas entraîner une élévation de plus de 1°C dans les tissus et les organismes exposés pour ne pas provoquer d'effets délétères.

Des expositions avec des DAS supérieurs ou égaux à 4 W/kg ont été effectuées sur des animaux tels que des rongeurs (Grandolfo *et al*, 1983). Le livre de Grandolfo *et al*. de 1983 met en évidence des réponses thermorégulatrices efficaces chez des rongeurs exposés à un DAS de 4 W/kg. Plus précisément, il a pu être montré que l'exposition sur de longues durées des animaux à 4 W/kg entraîne l'augmentation de la pression sanguine et du rythme cardiaque mesuré chez les animaux exposés, mais que ces réponses thermorégulatrices permettent de maintenir la température stable dans l'organisme exposé aux champs radiofréquences (Grandolfo *et al*, 1983). Cependant le stress provoqué par une sollicitation prolongée du système de thermorégulation de l'animal est nocif et peut conduire à l'épuisement et au décès (Yaribeygi *et al*, 2017; Cheshire, 2016). En 1999, des études toxicologiques de l'effet des RF sur des rats et de souris ont été demandées par la FDA (*Food and Drug Administration*) au gouvernement des États-Unis, donnant lieu aux études NTP (*National Toxicological Program*) qui ont été réalisées entre 2010 et 2014 au NIEHS (*National Institute of Environmental Health Sciences*). Ces études ont été menées sur plusieurs centaines de rats et de souris sous exposition, le corps entier, à des signaux GSM 900 MHz ou CDMA 1 900 MHz. L'étude a inclus plusieurs centaines d'animaux (rats et souris), exposés tout au long de leur vie à des niveaux de rayonnement très élevés (jusqu'à des DAS corps entier de 6 W/kg chez le rat et 10 W/kg chez la souris), soit des conditions d'exposition très supérieures aux valeurs limites recommandées pour l'Homme en 1998 par la Commission internationale de protection contre les rayonnements non ionisants (ICNIRP). Ainsi, les tests ont été effectués sur sept groupes de

chaque sexe pour chaque DAS (un groupe non exposé, puis six groupes par modulation divisé en deux). Sur les sept groupes, six groupes étaient exposés de manière intermittente (10 minutes on/10 minutes off) durant 18 heures (soit 9 heures d'exposition effective). Cette exposition a eu lieu tous les jours durant 28 jours pour trois groupes et durant deux ans pour trois autres groupes (le septième groupe était le groupe non exposé). La répartition des DAS par espèce et temps d'exposition s'est faite comme décrit dans le Tableau 1.

**Tableau 1** - Tableau résumant les durées de manipulation et les DAS pour les rats et souris des études NTP :

<i>Rats</i>		<i>Souris</i>	
<i>28 jours</i>	<i>2 ans</i>	<i>28 jours</i>	<i>2 ans</i>
<i>0 W/kg</i>	<i>0 W/kg</i>	<i>0 W/kg</i>	<i>0 W/kg</i>
<i>3 W/kg</i>	<i>1,5 W/kg</i>	<i>5 W/kg</i>	<i>2,5 W/kg</i>
<i>6 W/kg</i>	<i>3 W/kg</i>	<i>10 W/kg</i>	<i>5 W/kg</i>
<i>9 W/kg</i>	<i>6 W/kg</i>	<i>15 W/kg</i>	<i>10 W/kg</i>

Les résultats principaux de l'étude indiquent en particulier une augmentation des schwannomes malins du cœur et une augmentation de l'incidence combinée des tumeurs cutanées (fibrosarcomes, sarcomes, histiocytomes fibreux malins), respectivement chez les rats mâles et les souris mâles, qui ont été exposés deux ans au DAS maximal (6 W/kg pour les rats et 10 W/kg pour les souris). Ces résultats sont associés à une survie anormalement basse des rats non exposés et une incidence anormalement basse des tumeurs chez les souris non exposées. Aucune différence entre espèces ou entre genres n'est observée. De même, aucun effet-dose n'a été observé. Ainsi, bien que les résultats NTP concluent à une augmentation de cancers du cœur suite à une exposition à de forts DAS (National Toxicology Program, 2018a, 2018b), la FDA (Commissioner, 2020), l'ICNIRP (ICNIRP, 2020b), l'ANSES (ANSES, 2018), l'ARPANSA (Agence de radioprotection et de sûreté nucléaire Australienne) (ARPANSA, 2019) ou la BFS (Office fédéral de radioprotection, en Allemagne) (BFS, 2019) jugent que ces résultats manquent de cohérence et ne sont pas applicables à l'humain.

Des études comportementales ont également été réalisées entre 1 et 3 W/kg sur les rongeurs et sur des singes. Un changement comportemental a pu être enregistré lors des manipulations (Adair & Adams, 1980; Stern *et al*, 1979; de Lorge & Ezell, 1980; D'Andrea *et al*, 1986). Certaines expérimentations ont été faites sur le singe *Saimiri sciureus* exposé à un signal CW de 2,45 GHz à des DAS de 0,15 à 3,25 W/kg durant dix minutes (Adair & Adams,



1980). Ces études ont montré que des singes préférant une température ambiante de 34 à 36°C vont se déplacer dans des zones où la température est inférieure de 4°C, tout en conservant un bon niveau de thermorégulation (température rectale) lorsqu'ils sont exposés à des DAS supérieurs à 1,1 W/kg corps entier. Aucune modification comportementale n'a été enregistrée à des DAS du corps entier inférieurs à 1 W/kg dans cette étude (Adair & Adams, 1980). En revanche, malgré une absence de variation de la température anale à des DAS supérieurs à 1,1 W/kg, le changement de préférendum de température ambiante est accompagné d'une augmentation de la température hypothalamique de 0,2 à 0,3°C (Adair *et al*, 1984). Des études ont aussi été menées sur la thermo-sensation de rats dont on avait rasé la fourrure (Stern *et al*, 1979). Ces rongeurs ont été placés dans une chambre froide où, en appuyant sur un bouton, ils pouvaient allumer une lampe infrarouge afin de se réchauffer. Les rongeurs ont été habitués à appuyer sur le bouton pour allumer la lampe chauffante pour se réchauffer lorsqu'ils avaient froid avant le début des tests. Lorsque ces rats ont été exposés à des micro-ondes à 2,45 GHz (en CW) durant quinze minutes dans l'enceinte de la chambre froide, la vitesse à laquelle ils ont allumé la lampe infrarouge a diminué en fonction de la densité de puissance de l'onde RF, qui variait entre 5 et 20 mW/cm<sup>2</sup> (de 1 à 4 W/kg environ). Ce résultat indique que des niveaux de chauffage par radiofréquences peuvent être significatifs sur le plan comportemental sans être détectables au niveau thermique (température rectale). Une autre étude fut menée l'année suivante également sur des rats exposés à 1,28 GHz (26 mW/cm<sup>2</sup> pour 4,94 W/kg corps entier) et 5,62 GHz (15 mW/cm<sup>2</sup> pour 3,75 W/kg corps entier)(de Lorge & Ezell, 1980). Dans cette étude les rats disposaient de deux leviers. Le premier produisait deux tonalités différentes et le second distribuait de la nourriture lorsqu'il était activé après l'une des deux tonalités. Le taux de réussite des rats à cet exercice a diminué à 1,28 GHz par rapport au sham ou à 5,62 GHz. Les chercheurs ont alors noté que le DAS local sur la tête était plus élevé au niveau distal à 1,28 GHz qu'à 5,62 GHz. Ils en ont conclu que la réponse du rat est perturbée à une densité de puissance plus faible à 1,28 qu'à 5,62 GHz du fait d'une pénétration plus profonde de l'énergie et en raison des différences de distribution anatomiques de l'énergie RF absorbée. Une autre étude publiée en 1986 a été faite sur des rats exposés à un signal CW 2,45 GHz avec une puissance de 0,5 mW/cm<sup>2</sup> (soit 0,14 W/kg corps entier) durant 90 jours (7h d'exposition par jour, tous les jours). Les paramètres, comme la masse de l'animal, la consommation en eau, la réaction aux chocs

électriques, le niveau de cholinestérase, de sulfhydryle dans le sang, de 17-cétostéroïdes dans l'urine, la taille des organes en fin de manipulation après sacrifice de l'animal, n'ont pas varié. En revanche, la capacité des rats exposés à effectuer des tâches comme actionner un levier pour recevoir de la nourriture était amoindrie par rapport aux rats non exposés (D'Andrea *et al*, 1986).

Les effets causés par une exposition aux RF entraînant une augmentation thermique de la température corporelle d'animaux ont aussi été étudiés. Par exemple, un lapin dont la tête a été exposée durant deux à trois heures à des DAS de 100 à 140 W/kg développe une cataracte (Guy *et al*, 1975). En expérimentant une augmentation de température de 1 à 2°C lors d'expositions de rongeurs aux RF, de nombreux effets ont été recensés (opacité du cristallin, anomalies dans la cornée, perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique, problèmes immunitaires et hématologiques, modification des fonctions nerveuses et neuromusculaires, modification de la teneur en eau, en électrolytes et des fonctions membranaires des cellules)(Poston & Swicord, 1986; Barnes & Greenebaum, 2007). On constate également que plus on monte en fréquence, plus l'énergie est absorbée par les couches superficielles de la peau ou de l'œil. On peut cependant éviter les lésions à de hautes fréquences en limitant la puissance à 50 W/m<sup>2</sup> (Jacobs, 1981; World Health Organization & Safety, 1993). Concernant le caractère potentiellement cancérigène de l'exposition aux RF, après les analyses de nombreuses études, différents rapports indiquent que l'apparition de cancers suite aux expositions aux RF de la téléphonie mobile est peu probable (World Health Organization & Safety, 1993; Cridland, 1993).

#### *b- Normes établies*

Aujourd'hui, après trente années de recherches, les normes ont été établies en tenant compte du seul effet caractérisé sur le plan physique, à savoir un effet thermique lors de l'exposition aux RF. Les recherches exposées précédemment ont permis d'établir que la valeur de DAS critique pour augmenter la température d'un corps humain entier de 1°C en trente minutes est de 4 W/kg (ICNIRP, 2020a). Ainsi, afin de se prémunir contre l'échauffement provoqué par l'exposition aux RF, les limites d'expositions pour la population ont été fixées à une valeur cinquante fois inférieure, soit 0,08 W/kg. En ce qui concerne les travailleurs ayant connaissance des risques associés aux RF, la limite reste dix fois inférieure à la valeur pouvant

provoquer un échauffement avec une limite à 0,4 W/kg. Les normes en vigueur aujourd’hui sont listées dans les Tableau 2 et Tableau 3 ci-dessous :

**Tableau 2** - Restrictions de base pour l’exposition aux champs électromagnétiques de 100 kHz à 300 GHz, pour des intervalles de moyenne  $\geq 6$  min. Le DAS moyen pour l’ensemble du corps doit être moyenné sur trente minutes. Les expositions locales SAR et  $S_{ab}$  (Densité de puissance absorbée, « absorbed ») doivent être moyennées sur six minutes et sur une masse cubique de 10 g. La  $S_{ab}$  locale doit être moyennée sur une surface corporelle carrée de 4 cm<sup>2</sup>. Au-dessus de 30 GHz, une contrainte supplémentaire est imposée, de sorte que l’exposition moyenne sur une surface carrée de 1 cm<sup>2</sup> du corps est limitée à deux fois celle de la restriction de 4 cm<sup>2</sup>. NA signifie non applicable. D’après ICNIRP, 2020a.

Personnes concernées	Gamme de fréquences	DAS moyen corps entier (W/kg)	DAS local tête et torse (W/kg)	DAS local membres (W/kg)	Sab locale (W/m <sup>2</sup> )
Professionnels	100 kHz à 6 GHz	0,4	10	20	NA
	>6 à 300 GHz	0,4	NA	NA	100
Public	100 kHz à 6 GHz	0,08	2	4	NA
	>6 à 300 GHz	0,08	NA	NA	20

**Tableau 3** - Restrictions de base pour l’exposition aux champs électromagnétiques de 100 kHz à 300 GHz, pour des intervalles d’intégration  $> 0$  et  $< 6$  min. t est le temps en seconde, les restrictions doivent être suivies pour toutes les valeurs de t comprises entre  $>0$  et  $<360$  s, quelles que soient les caractéristiques temporelles de l’exposition elle-même. L’AS (absorption spécifique d’énergie) local doit être moyenné sur une masse cubique de 10 g. L’ $U_{ab}$  (densité d’énergie absorbée) local doit être moyenné sur une surface carrée de 4 cm<sup>2</sup> du corps. Au-dessus de 30 GHz, une contrainte supplémentaire est imposée, telle que l’exposition moyenne sur une surface carrée de 1 cm<sup>2</sup> du corps est limitée à  $72[0,025+0,975(t/360)^{0,5}]$  pour le travail et  $14,4[0,025+0,975(t/360)^{0,5}]$  pour une exposition grand public. L’exposition à toute impulsion, groupe d’impulsions ou sous-groupe de train d’impulsions, ainsi qu’à la somme des expositions (y compris les champs électromagnétiques non pulsés), délivrées en s, ne doit pas dépasser ces niveaux. D’après (ICNIRP, 2020a).

Personnes concernées	Gamme de fréquence	AS tête et torse (kJ/kg)	AS membres (kJ/kg)	$U_{ab}$ locale (kJ/m <sup>2</sup> )
Professionnels	>400 MHz à 6 GHz	$3,6[0,05+0,95(t/360)^{0,5}]$	$7,2[0,025+0,975(t/360)^{0,5}]$	NA
	>6 à 300 GHz	NA	NA	$36[0,05+0,95(t/360)^{0,5}]$
Public	>400 MHz à 6 GHz	$0,72[0,05+0,95(t/360)^{0,5}]$	$1,44[0,025+0,975(t/360)^{0,5}]$	NA
	>6 à 300 GHz	NA	NA	$7,2[0,05+0,95(t/360)^{0,5}]$

Il est important de remarquer que les limites d'exposition de la tête et du tronc sont inférieures à celles des membres. Cela s'explique par une précaution prise pour le tronc et la tête qui contiennent des organes vitaux. De plus, on note une différence entre une exposition du corps entier et une exposition locale. Cette distinction permet de ne pas surexposer une partie d'un corps. Une surexposition ciblée pourrait avoir pour conséquence de dépasser les capacités thermorégulatrices et les capacités d'absorption thermiques de la zone ciblée et d'engendrer un échauffement. Une surexposition globale pourrait quant à elle dépasser les capacités thermorégulatrices du corps et entraîner des stress connus lors d'une exposition d'un organisme à une chaleur extrême.

#### *c- Mise à jour ICNIRP 2020*

Une mise à jour des normes de l'ICNIRP a été établie en 2020 (ICNIRP, 2020a). La mise à jour de 2020 avait pour but de prévenir de potentiels problèmes liés à la 5G qui était déployée la même année. Les directives de restrictions d'exposition moyenne du corps entier, qui couvraient un intervalle de fréquences de 100 kHz à 10 GHz, ont été étendues jusqu'à 300 GHz. Cette mise à jour permet de s'adapter aux futures évolutions du réseau de téléphonie mobile, notamment la 5G qui dépassera les 10 GHz. Ces restrictions de durée passent de 6 minutes à 30 minutes d'exposition globale (les restrictions sur la durée d'exposition locale ne sont pas modifiées).

De plus, la fréquence de transition (fréquence en-dessous de laquelle on utilise le DAS et au-dessus de laquelle on utilise la « densité de puissance ») a été abaissée à 6 GHz au lieu de 10 GHz jusque-là. La raison de ce changement est qu'une mesure en DAS pourrait sous-estimer l'exposition superficielle à de trop hautes fréquences.

Avant la mise à jour de l'ICNIRP en 2020 concernant les restrictions locales moyennes sur six minutes à des fréquences  $\leq 6$  GHz, le DAS devait être calculé sur un volume de 10 g. Il doit maintenant être calculé sur un **cube** de 10 g afin d'avoir une meilleure approximation spatiale de l'élévation de température dans un échantillon exposé à une fréquence inférieure à 6 GHz. Pour les fréquences dépassant les 30 GHz, et donc utilisant des faisceaux très concentrés, la surface passe à 1 cm<sup>2</sup>. Ces derniers points permettent de prendre en compte les problèmes de focalisation de faisceaux rencontrés avec le déploiement de la 5G, et d'éviter de faire une moyenne sur une grande surface.

En ce qui concerne les fréquences supérieures à 6 GHz, les règles concernant l'exposition locale sur une moyenne de six minutes ont été modifiées. Premièrement nous parlerons maintenant de densité de puissance absorbée et non de densité de puissance incidente. Ceci permet l'établissement de restrictions de base plus précises puisque 50 % des ondes RF incidentes sont réfléchies par la peau. Deuxièmement, la moyenne ne doit plus être faite sur 20 cm<sup>2</sup> comme en 1998 mais sur 4 cm<sup>2</sup>, surface qui correspond à l'une des faces d'un volume moyen de 10 g. Cela permet de garantir qu'une exposition, qui n'entraînerait pas d'échauffements sur 20 cm<sup>2</sup>, ne puisse pas en entraîner en étant focalisée sur une zone de 4 cm<sup>2</sup>. Le troisième point concerne les faisceaux fortement focalisés qui pourront être observés au-dessus de 30 GHz. De fait, la restriction passe de 4 à 1 cm<sup>2</sup> de moyenne locale pour les fréquences supérieures à 30 GHz.

### 3- Bilan des études de ces dernières années

Comme vu dans la partie précédente, les normes en vigueur nous protègent contre les effets thermiques des CEM RF, qui sont les seuls effets connus et caractérisés de l'exposition aux RF sur le vivant à ce jour. Cependant la population civile continue à s'interroger sur de potentiels effets non-thermiques des RF sur la santé. De nombreuses personnes, se définissant souvent comme « électrosensibles », affirment ressentir des effets des ondes électromagnétiques de téléphones et d'antennes radio (Leitgeb & Schröttner, 2003). D'autres personnes pensent que l'origine de leurs problèmes de santé pourraient provenir des ondes RF présentes dans leur environnement.

L'existence potentielle d'effets non-thermiques des RF reste inexplicable par la physique moderne. Tous les mécanismes d'interaction plausibles entre les RF et les tissus vivants se retrouvent noyés dans le bruit thermique (Sheppard *et al*, 2008b; Challis, 2005). Faute de connaissances biophysiques pouvant expliquer les phénomènes décrits par les populations sensibles, la communauté scientifique est cantonnée à une approche empirique de la veille sanitaire concernant de potentiels effets des RF émis à des niveaux inférieurs aux normes en vigueur. Ainsi durant les trente dernières années, beaucoup d'études ont examiné les effets non-thermiques potentiels de l'exposition environnementale. Parmi les études montrant un effet, rares sont celles qui ont pu être reproduites par d'autres équipes et celles-ci n'ont pas été prises en compte pour l'établissement des normes de 1998 (ICNIRP, 1998) comme pour celles de 2020 (ICNIRP, 2020a).

Parmi les sujets qui suscitent le débat depuis des années, la communauté scientifique travaillant sur les aspects environnementaux de l'exposition aux RF s'est posé des questions concernant l'impact biologique de cette exposition sur la réponse au stress des cellules, que ce soit au niveau cellulaire ou au niveau moléculaire.

Parmi les effets décrits auparavant comme étant non-thermiques, l'effet de Frey ou « effet acoustique » des micro-ondes a fait l'objet d'une attention particulière. Des études menées sur des sujets humains exposés à 200 MHz et 6,5 GHz (Frey, 1961; Frey & Messenger, 1973) ont montré que pour des énergies absorbées entre 100 et 400 mJ/m<sup>2</sup>, des impulsions de 30 ms à 2,45 GHz (soit 4 à 16 mJ/kg) entraînent une interaction thermoélastique dans la zone auditive du cortex cérébral qui se traduit chez les sujets exposés par un effet auditif (bourdonnement ou claquement suivant la modulation). Cet effet est finalement apparu comme étant un effet thermique. Les seuils établis par l'ICNIRP en 1996 ont donc été établis en tenant compte de ces études et protègent contre ces effets.

Des études sur la potentielle libération de calcium par des cellules exposées à de hautes fréquences pulsées ont également été publiées, mais n'ont pas pu être reproduites. C'est par exemple le cas d'études menées en 1979 sur le cerveau de poussins montrant une libération de calcium sous champs RF (Blackman *et al*, 1979; Bawin *et al*, 1978). Ces études n'ont pas pu être reproduites en 1987 (Albert *et al*, 1987). Cela étant, de récentes études continuent à évoquer un effet des RF sur l'homéostasie calcique et les canaux ioniques impliqués (Hao *et al*, 2022; Pall, 2022; Wood & Karipidis, 2021; Kaur *et al*, 2021; Bertagna *et al*, 2021).

En 1976, une équipe a proposé la théorie de l'effet fenêtre : un effet des RF émis à bas niveau pour certains DAS, fréquences ou types de modulation, comme explication à de telles différences d'effets (Bawin & Adey, 1976). À l'heure actuelle, aucun mécanisme moléculaire n'a été caractérisé pour expliquer un tel effet fenêtre. Il en va de même pour tout une série de paramètres physiologiques (notamment l'activité électrique du cerveau (Bawin *et al*, 1975), l'impact sur les AMPc des lymphocytes (Byus *et al*, 1984), sur les lymphocytes T (Lyle *et al*, 1983), l'impact sur la prolifération cellulaire (Peters *et al*, 1979)). Le manque de reproductibilité des résultats rend difficile l'établissement de conclusions claires quant à l'existence d'un tel effet. Effectivement, plusieurs études de réplication notent une absence d'effet dans d'autres lignées cellulaires ou lymphocytaires, sur la prolifération ou sur les propriétés biochimiques des cellules exposées, comme discuté dans les quatre livres de la

série « *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields* » (Barnes & Greenebaum, 2007; Polk, 2019; Polk & Postow, 2019). Dans ces livres, les auteurs expliquent que le manque de reproductibilité provient, dans beaucoup de cas, d'un manque de caractérisation des systèmes d'exposition aboutissant souvent à des effets thermiques non décelés. Une étude parue en 2016 va également dans ce sens de cette conclusion, en soulignant la relation inversement proportionnelle entre l'occurrence d'effets dits « non-thermique » dans les études en bioélectromagnétisme et la qualité des procédures expérimentales, en particulier des conditions d'exposition (Simkó *et al*, 2016). Même si pour le moment aucun effet non thermique des RF n'a été mis en évidence de manière incontestable, tant au niveau biologique que physique, la recherche de ces potentiels effets reste bien entendu d'une importance majeure sur le plan sanitaire du fait de l'omniprésence des RF dans notre environnement (IARC, 2013).

Un stress sur une cellule peut être étudié de différentes manières et ses répercussions peuvent être multiples. Par exemple, certains stress vont entraîner des dommages cellulaires qui engendreront un arrêt du cycle de développement (Fridlyanskaya *et al*, 2015) ou au contraire une augmentation incontrôlée de la prolifération accompagnée d'une impossibilité de recourir aux mécanismes de mortalité cellulaire, ce qui mènera à un cancer (Australia, 2014). Les réponses cellulaires au stress sont finement régulées au niveau moléculaire. Parmi les plus importantes voies moléculaires de réponse au stress cellulaire on retrouve HSF (*heat shock factor*) qui interagit et régule les HSP (*heat shock proteins*), protéines permettant la renaturation des protéines endommagées par un stress. Une autre voie capitale dans la réponse au stress et extrêmement conservée, est la voie MAP kinase. Cette voie est essentielle dans la réponse cellulaire à un grand nombre de situations. Les stress rencontrés peuvent être ressentis au niveau cellulaire par différents canaux membranaires sensibles à la température, à la pression ou au pH. Certains canaux qualifiés de polymodaux sont sensibles à une grande quantité de perturbations différentes de l'environnement. Parmi ces senseurs de stress cellulaires les canaux TRP sont particulièrement importants. Il s'agit d'une famille de canaux conservés dans l'évolution. Ce sont des canaux sélectifs pour le calcium, et il est connu que des perturbations de l'homéostasie calcique peuvent avoir lieu lorsque les cellules rencontrent une situation de stress (Kania *et al*, 2015; Krebs *et al*, 2015; Daverkausen-Fischer

& Pröls, 2022). Ces perturbations peuvent également faire de ces canaux des cibles intéressantes lors d'investigations sur le stress ressenti par les cellules.

Ainsi, dans ce manuscrit, nous nous intéresserons à la réponse de différents processus biologiques dont l'activité est connue pour être modulée par l'exposition à des stress environnementaux. Ces études se basent sur les observations faites dans de précédents articles du domaine qui seront présentées dans la partie qui suit. Les protéines et mécanismes que nous avons choisi d'étudier seront détaillés au niveau biologique dans la partie III - Cibles biologiques d'intérêt de ce manuscrit.

#### A- Prolifération et mort cellulaire

Il existe plusieurs manières d'étudier l'impact de l'exposition aux RF sur la prolifération et les différents types de mortalité cellulaire, parmi lesquelles les observations morphologiques, ou le dosage des ARNm ou de certaines protéines. Les études sur le sujet sont trop nombreuses pour être développées dans leur intégralité (Manna & Ghosh, 2016), mais nous pouvons citer quelques exemples illustratifs.

En 1997, French et al. ont montré que la distribution de l'actine était impactée dans des cellules U-87MG (astrocytome humain) exposées à 835 MHz (densités de puissance de  $40 \pm 15$  mW/cm<sup>2</sup> ou  $8,1 \pm 3$  mW/cm<sup>2</sup>, pendant 20 minutes, trois fois par jour pendant sept jours)(French *et al*, 1997). Dans cette étude, les auteurs ont observé que, après exposition, les cellules avaient adopté un aspect aplati et perdu de l'actine dans les prolongations cellulaires. À  $40 \pm 15$  mW/cm<sup>2</sup>, des agrégats d'actine (bulles) ont été localisés à des sites spécifiques sur la membrane cellulaire. Selon les auteurs, aucune augmentation de température au-delà de 37°C n'a été mesurée durant ces expériences, écartant l'hypothèse d'un effet thermique. À l'inverse, une autre étude par les mêmes auteurs montre une absence d'effet des RF sur la distribution de l'actine (864,3 MHz, CW, 7 W/kg, 3 expositions de 20 minutes par jour) dans les HMC-1 (mastocytes humains)(Harvey & French, 1999). Des études similaires ont été faites dans des cellules souches embryonnaires (eNSC), montrant que la croissance de neurites est inhibée par une exposition de 4 W/kg (1 800 MHz, 3 jours)(Chen *et al*, 2015a). Cet effet est accompagné d'une diminution de l'ARNm de gènes proneuraux Ngn1 et NeuroD qui sont indispensables au développement neural.

Concernant la cinétique de prolifération, qui est un indicateur de la santé de la cellule, bien que la plupart des études ne trouvent pas d'effet des RF (voir par exemple, Ky *et al*, 2011



(837 et 1950 MHz, 4 W/kg pendant 1 heure, cellules de carcinome humain MCF7), Lixia *et al*, 2006 (1800 MHz, 1, 2 et 3 W/kg pendant 2 heures, cellules épithéliales du cristallin humain hLEC) ou Merola *et al*, 2006 (900 MHz, 1 W/kg en GSM pendant 24, 48 et 72 heures, cellules de neuroblastome humain LAN-5)), d'autres études rapportent des effets. C'est le cas de l'étude de Esmekaya *et al*, 2013 dans laquelle les auteurs ont noté une inhibition totale de la prolifération cellulaire dans les fibroblastes mammaires lors d'une exposition W-CDMA 2,1 GHz à 0,607 W/kg durant 4 et 24 heures. Une diminution de la prolifération des cellules épithéliales amniotiques humaines (AMA) a également été montrée suite à une exposition de 20 à 40 minutes à un champ RF 960 MHz modulé GMS à différents DAS (0,021, 0,21 ou 2,1 mW/kg)(Kwee & Raskmark, 1998). Dans cette étude, une diminution de la croissance a été notée de manière dose-dépendante. Cependant d'autres études n'ont pas observé d'effets dans des cellules A172, H4, IMR90 (Sekijima *et al*, 2010)(80, 250, ou 800 mW/kg, CW ou W-CDMA, 2,14 GHz durant 96 h) ou encore dans des astrocytomes (French *et al*, 1997). Dans l'article de French *et al*, de 1997 (menée sur des astrocytes U-87 MG exposés 20 min, 3 fois par jour durant 7 jours à un signal CW 835 MHz à 8,1 mW/cm<sup>2</sup> ou 40 mW/cm<sup>2</sup>), les effets de diminution de la prolifération n'ont été observés qu'à 8,1 mW/cm<sup>2</sup> mais pas à 40 mW/cm<sup>2</sup> (French *et al*, 1997). Les auteurs ont invoqué un effet fenêtre pour expliquer leurs observations, mais malheureusement cet effet n'a aucune base mécanistique.

Ainsi la croissance, le développement et la prolifération sont des cibles potentielles dans l'étude d'effets non-thermiques des RF. Cependant la capacité des cellules à mourir est tout aussi importante que leur capacité à croître correctement. Ainsi, de nombreuses d'études se sont intéressées au possible impact des RF sur l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Des études comme celle de (Song *et al*, 2011) sur des cellules de carcinome de poumon A549 ont montré une augmentation de la mort nécrotique après une exposition de 10 à 30 minutes à des puissances de 200 à 600 mW/cm<sup>2</sup>. Néanmoins, dans cet article, la fréquence micro-onde utilisée n'est pas précisée et aucune caractérisation du système d'exposition n'est disponible. En revanche, d'autres études, comme (Sanchez *et al*, 2006) ne trouve aucun effet des RF que ce soit sur la nécrose, l'apoptose, ou la prolifération (900 MHz, 2 W/kg, GSM, 48 heures d'exposition) alors que le système d'exposition est parfaitement caractérisé. C'est le cas aussi de l'étude de (Campisi *et al*, 2010) qui n'a rapporté aucun effet nécrotique (900 MHz, 0,26 W/m<sup>2</sup>, CW, 5, 10 et 20 minutes d'exposition).

Des études similaires ont été réalisées pour l'apoptose. Il a été montré qu'un signal W-CDMA à 2,1 GHz et un signal 900 MHz pouvait induire une réponse apoptotique (Esmekaya *et al*, 2013; Liu *et al*, 2012; Song *et al*, 2011; Lu *et al*, 2012). De même Buttiglione et son équipe ont montré une activation de l'apoptose. Cette activation passe par une régulation à la hausse de EGR-1, un activateur de la transcription de la voie de mort cellulaire, tandis que Bcl2, inhibiteur de l'apoptose, est régulé à la baisse dans les neuroblastomes humains exposés durant 24 heures à 900 MHz en GSM à 1 W/kg (Buttiglione *et al*, 2007b). Des cellules apoptotiques ont également été retrouvées dans les lignées cellulaires d'hépatocarcinome HepG2 (15 minutes on, 15 minutes off durant 1, 2, 3, ou 4 heures, avec un signal GSM à 900 et 1 800 MHz et un DAS de 2 W/kg)(Ozgun *et al*, 2014). À l'inverse, aucune altération significative de l'apoptose n'a été trouvée dans les cellules souches neurales embryonnaires (Chen *et al*, 2014a)( 1, 2 et 4 W/kg durant 1, 2 et 3 jours à 1800 MHz), les cellules amniotiques humaines (Bourthoumieu *et al*, 2013)(GSM 900 MHz 24h à 0.25, 1, 2, et 4 W/kg), ou les cellules de neuroblastome humain (Merola *et al*, 2006)(Exposition de 24, 48, et 72 heures à 900 MHz en GSM à 1 W/kg).

Un autre mécanisme de mort cellulaire contrôlée est l'autophagie (phénomène biologique développé dans la partie III-1-D. Ce mécanisme a également fait l'objet de recherches en bioélectromagnétisme (Hao *et al*, 2018). Des articles de Kim et son équipe rapportent une induction de l'autophagie à des DAS de 4 W/kg (exposition 4 heures par jour durant 12 semaines) sur des cortex de souris exposées à un signal CW à 835 MHz (Kim *et al*, 2018, 2016, 2017). Un autre article corrobore ces observations sur un autre modèle biologique, montrant qu'une exposition de spermatocytes GC-2 de souris exposées à 1 800 MHz à 4 W/kg durant 24 heures subissent une augmentation de l'autophagie (Liu *et al*, 2014). Des études récentes, comme par exemple celle de Hao et al. (2022) montrent une augmentation des voies responsables de l'autophagie dans les neurones extraits de rats et dans les cellules PC12 (les cellules PC12 étaient exposées à 19 W/kg, et des neurones de rats ont été exposés à 10,5 W/kg)(Hao *et al*, 2022). Les expositions ont duré 15 minutes à 2,856 GHz. L'augmentation de température n'est pas caractérisée dans cette étude. Ainsi si l'autophagie semble être une nouvelle cible d'intérêts dans le domaine du bioélectromagnétisme, un effet non-thermique des RF sur l'autophagie reste à démontrer.

## B- Voie MAP kinase

Un autre volet important dans la recherche d'effets potentiels des RF sur la cellule est l'impact que ces CEM pourraient avoir sur les voies moléculaires de réponse au stress de la cellule. L'un des mécanismes majeurs qui déclenchent les réponses cellulaires aux stimuli extracellulaires est l'activation des cascades de protéines-kinases activées par les mitogènes Ser/Thr (MAPK) qui relaient les signaux extracellulaires aux processus intracellulaires suite à l'activation de la protéine RAS (Kim & Choi, 2015b; Nussinov *et al*, 2018). La voie de signalisation RAS/MAPK joue un rôle central dans la régulation de divers processus cellulaires tels que l'expression des gènes, la croissance cellulaire et la survie (la voie en elle-même est détaillée partie A-). Dans ces voies de signalisation, RAS active trois cascades de phosphorylation qui aboutissent à l'activation de ERK, JNK et p38, respectivement. Une signalisation MAPK anormale peut entraîner une prolifération cellulaire accrue ou incontrôlée et une résistance à l'apoptose, et il a été démontré qu'elle est impliquée dans de nombreux cancers (Kim & Choi, 2015b). Plusieurs groupes ont donc recherché un potentiel effet des champs RF sur la réponse au stress cellulaire RAS/MAPK en utilisant des tests biochimiques et protéomiques standards (IARC, 2013; Kim *et al*, 2012). Il est ressorti de ces études que plusieurs membres de la voie des MAPK pourraient être affectés par les RF.

En particulier, plusieurs études suggèrent que l'exposition aux RF des cellules entraîne soit l'activation des kinases ERK (Friedman *et al*, 2007; Sheikh *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2014a; Zuo *et al*, 2015; Tang *et al*, 2015; Liu *et al*, 2014; Wang *et al*, 2015), soit une augmentation de son expression (Szymanski *et al*, 2018b). Dans ce dernier article, une augmentation de l'expression de la protéine JNK a également été détectée. D'autres études montrent également une augmentation conjointe de l'activité de JNK et de celle de ERK (associée parfois à une élévation de leur expression)(Buttiglione *et al*, 2007a ; Yu *et al*, 2008; Valbonesi *et al*, 2014a). A l'inverse, certaines équipes trouvent une corrélation entre l'exposition aux RF et une inactivation de ERK (Shahin *et al*, 2018; Zuo *et al*, 2015), parfois associée à une inhibition

---

Afin d'alléger le texte, les DAS, fréquences, modulations et effets des articles de ce chapitre sont compilés en Annexe 1 – Tableau réunissant les paramètres d'expositions des références de la partie sur le bioélectromagnétisme des protéines de la voie MAPK

de p38 (Tsoy *et al*, 2019). Ces effets peuvent être expliqués par une modulation de RAS (Caraglia *et al*, 2005) située en amont des MAPK (Marinelli *et al*, 2004).

Ces études ne permettent pas de conclure quant à un effet (positif ou négatif) des RF sur la voie RAS/MAPK. De plus amples études sont donc nécessaires afin de déterminer si une adaptation des normes a lieu d'être ou non. Dans ce but, mon équipe a développé des sondes BRET (Poque *et al*, 2020) qui seront développées dans la partie Transfert d'énergie en résonance de **bioluminescence** (BRET) de ce manuscrit ainsi que dans le second article de ce manuscrit. Avec cette technique, mon équipe a constaté que l'exposition de cellules hépatiques Huh7 aux champs RF à 1 800 MHz pendant 24 heures n'altérait ni le niveau basal d'activation de RAS et ERK, ni la puissance du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) pour activer les kinases RAS et ERK. Cependant, il a été constaté que l'exposition à des signaux de 1 800 MHz modulés en GSM à 2 W/kg diminuait l'efficacité maximale de la PMA à activer les kinases RAS et ERK. L'exposition avec un signal CW 1800 MHz à 2 W/kg a quant à lui diminué l'efficacité maximale du PMA pour activer ERK mais pas de RAS. Aucun effet de l'exposition aux RF à 0,5 W/kg n'a été observé sur l'efficacité maximale du PMA pour activer RAS ou ERK quel que soit le signal utilisé. Dans ce manuscrit, je vais donc tirer profit de la technologie développée par mon équipe d'accueil en l'améliorant pour mener une étude similaire dans les cellules de la peau après exposition à des signaux 5G à 3,5 GHz.

#### C- Voie HSF

D'autres « protéines de stress », connues sous le nom de protéines de choc thermique (HSP en anglais)(voir chapitre HSF et HSP), ont également été décrites comme étant affectées par des expositions aux RF de faibles niveaux dans certaines études. Étant donné que les HSP et leurs facteurs associés sont induits par une variété de facteurs de stress, ils ont été proposés comme biomarqueurs possibles de l'exposition aux RF. Plusieurs études ont rapporté une altération de leur expression suite à une exposition aux RF de cultures de cellules (McNamee & Chauhan, 2009; vecchia *et al*, 2009 ; IARC, 2013; Kwee *et al*, 2001; Leszczynski *et al*, 2002, 27; Miyakoshi *et al*, 2019; Lixia *et al*, 2006; Sanchez *et al*, 2006; Lucas *et al*, 2007; Ennamany

---

Afin d'alléger le texte, les DAS, fréquences, modulations et effets des articles de ce chapitre sont compilés en Annexe 2 – Tableau réunissant les paramètres d'expositions des références de la partie sur le bioélectromagnétisme des protéines HSF& HSP.

et al, 2008). Tout comme pour la voie MAPK, certaines études rapportent une modification des niveaux de HSP (Valbonesi et al, 2014b; Calabrò, 2012; Novoselova et al, 2017; Yang et al, 2012; Kesari et al, 2014; Sepehrimanesh et al, 2014, 30; López-Furelos et al, 2016) et d'autres n'ont trouvé aucune altération suite à l'exposition aux RF (Miyakoshi et al, 2019; Aït-Aïssa et al, 2013; Watilliaux et al, 2011; Kim et al, 2012). Là encore, différents paramètres, comme la fréquence, la modulation ou des artefacts liés à un système d'exposition mal défini, pourraient expliquer les différences entre les résultats de ces différentes études. La majorité de ces études a mesuré le niveau d'expression des protéines HSP ou les niveaux d'ARN codant ces protéines.

Dans un travail préalable, toujours en utilisant des sondes BRET, mon équipe d'accueil a étudié l'impact des RF sur l'activation de HSF1 (*heat shock factor 1*), le facteur de transcription responsable de l'expression des HSP en cas de stress thermique ou protéotoxique (Poque et al, 2021). Ces études réalisées sur des cultures de cellules exposées pendant 24 heures à des signaux GSM, WiFi ou CW à 1 800 MHz, et à des DAS de 1,5 ou 6 W/kg ont montré un effet inhibiteur modeste des RF sur le niveau basal d'activité de HSF1.

#### D- Canaux TRP

Le dernier sujet d'études n'est pas une famille de protéines sensibles au stress à proprement parler, mais aux stimuli. Certains groupes de recherche ont proposé un modèle dans lequel les RF auraient un effet thermique uniquement au niveau moléculaire (Foster & Glaser, 2007; Lai, 2011). Selon ces auteurs, la variation de températures induite par les RF pourrait n'être détectable qu'à l'échelle nanométrique par des protéines thermosensibles qui possèdent un  $Q_{10} > 2$ . Le  $Q_{10}$  exprime la modulation de l'activité d'une protéine lors d'une augmentation de la température de 10°C (Dhaka et al, 2006; Hille, 2001). Si nous prenons l'exemple d'une grande famille de thermorécepteurs que sont les canaux ioniques thermo-TRP, leur  $Q_{10}$  peut parfois être supérieur à 20 (Clapham, 2003). Si des protéines thermosensibles sont effectivement capables de ressentir les variations de température induites par les RF dans leur environnement moléculaire, il conviendrait de considérer que les ondes RF puisse entraîner des transitions de conformation et stabiliser des états conformationnels particuliers de ces canaux. Si cette hypothèse était vérifiée, il s'ensuivrait une modulation artificielle de l'ouverture du canal sous exposition aux RF, une variation de

l'entrée d'ions dans la cellule, et probablement une réponse altérée à la température et aux ligands chimiques.

Du fait de leurs propriétés, les canaux thermo-TRP s'avèrent donc un excellent sujet d'études pour vérifier si, en plus d'un effet thermique, les RF pourraient également induire un effet non-thermique au niveau macroscopique. La principale technique d'étude des canaux ioniques est le patch-clamp, qui permet d'étudier une cellule ou un canal par application d'une pipette en verre sur la membrane plasmique. Or, on ne peut étudier qu'une cellule à la fois. En outre, on peut se demander si le fait de patcher la membrane à proximité des canaux TRP (qui sont également mécanosensibles) n'engendre pas un changement d'activité du canal. Dans le but d'étudier facilement les effets des RF sur les canaux thermo-TRP activés par la chaleur, sans contact physique avec la membrane, et sur une culture de cellules vivantes, mon équipe a développé des sondes moléculaires basées sur la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET), dont une description est donnée dans la partie Transfert d'énergie en résonance de **bioluminescence** (BRET). Ces sondes permettent de mesurer, en temps réel et dans les cellules vivantes, les changements de conformation et l'activation des canaux TRPV1 connus pour être activés par des températures supérieures à 43°C (Ruigrok *et al*, 2017). L'utilisation de ces sondes a permis de montrer que l'exposition aux RF (1800 MHz), à des DAS supérieurs aux normes, entraînait bien l'activation de TRPV1 mais uniquement via un effet thermique (Ruigrok *et al*, 2018). Ce résultat n'excluait en rien la possibilité d'un effet non-thermique des RF sur d'autres canaux thermo-TRP sensibles à d'autres plages de températures comme les températures ambiantes ou froides.

Différentes équipes de recherche ont obtenu des résultats suggérant que des canaux thermo-TRP pourraient effectivement être affectés par l'exposition aux RF. Des manipulations effectuées sur des rats exposés à 900 MHz, à des DAS compris entre 0,1 et 0,3 W/kg, indiquent que les animaux exposés développent un comportement physiologique similaire à celui observé chez les animaux qui ont froid (Pelletier *et al*, 2013b, 2014; Arendash *et al*, 2012, 2010). Dans ces études, les auteurs montrent notamment qu'un rat réveillé exposé à des radiofréquences de 900 MHz avec un DAS inférieur à 0,08 W/kg aura tendance à préférer des températures ambiantes plus chaudes que les rats non exposés. Il a également été noté qu'ils passent plus de temps à dormir à une température ambiante de 31°C lors d'une exposition, tandis que les rats non exposés passent plus de temps à dormir à une température ambiante

de 28°C. De plus des rats placés à une température ambiante de 31°C mangeront plus s'ils sont exposés aux RF 900 MHz (Pelletier *et al*, 2014). Des tests faits à l'aide d'imagerie infrarouge et des mesures de température montrent qu'un rat non exposé aux radiofréquences connaîtra un phénomène de thermorégulation, notamment une vasodilatation des vaisseaux sanguins de la queue (un organe capital dans la thermorégulation du rat) et une vasoconstriction des vaisseaux sanguins situés dans les extrémités (queue, oreilles, museau) lorsqu'il est placé à 31 °C. Ce phénomène est amoindri chez les rats exposés aux radiofréquences. La conséquence est une température sous-cutanée de la queue plus basse de 1,2°C chez les animaux non exposés (Pelletier *et al*, 2013). Le phénomène de thermorégulation est rétabli lors de l'ajout de l'agent vasodilatateur dans le rat. Ainsi, il pourrait y avoir un impact des RF sur la physiologie des rats, au niveau de leur thermorégulation, et ce, et ce de manière non-thermique. Il s'agirait d'une augmentation de la sensation de froid chez le rat.

En 2020, l'équipe de René de Seze a affiné ces résultats en étudiant sur des souris les variations de températures corporelles au long de la journée sur plusieurs jours avec deux expositions par jour (exposition corps entier à 900 MHz à  $0.16 \pm 0.10 \text{ W.kg}^{-1}$ ) (Mai *et al*, 2020). Dans ce travail, les mesures de température ont été réalisées à l'aide d'un capteur de température sans fil implantée dans les animaux. Les auteurs ont vérifié préalablement qu'il n'y avait pas d'échauffement de cette sonde avec les RF (comme cela a pu être soupçonné dans d'autres articles, où les éléments métalliques des sondes de température interagissaient possiblement avec les RF, provoquant un échauffement). Ils ont montré dans cet article que les souris exposées deux fois par jour aux RF avaient, de manière cyclique, une température corporelle plus élevée de 0,23°C ( $\pm 0,07^\circ\text{C}$ ), par rapport à la moyenne des souris non exposées. Cet effet n'est retrouvé que durant les phases éclairées et non durant les phases sombres (correspondant aux cycles jour-nuit). Cela correspondrait à ce qu'on attend d'un système de thermorégulation qui favoriserait l'augmentation de température au niveau des organes internes. Cet effet n'ayant été observé qu'à partir du second jour d'exposition, et mettant une heure à apparaître, ils en ont également conclu à une adaptation physiologique du corps.

Afin d'expliquer ce phénomène, l'équipe de René de Seze a émis l'hypothèse d'une modification de la structure d'un canal thermosenseur sensible au froid, lors d'une exposition répétée du canal aux RF. Le canal qu'ils ont choisi d'étudier est TRPM8, principal

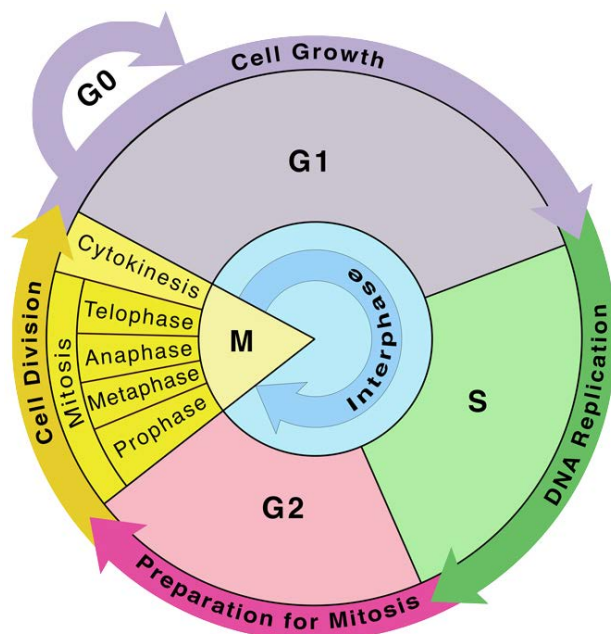
thermosenseur des températures froides de notre organisme. Cette hypothèse se base sur l'étude de Vega et al. (2016) qui montre qu'un récepteur TRPM8 exposé de manière répétée à une molécule agoniste fini par ne plus pouvoir les fixer (Pérez de Vega et al, 2016). Cette équipe a donc vérifié, chez la souris cette fois, l'activité et l'expression du canal TRPM8. Les résultats lors de l'ajout d'un antagoniste montrent que les récepteurs TRPM8 ne pouvaient plus fixer l'antagoniste spécifique suite à l'exposition aux RF durant une semaine (absence d'effet de l'antagoniste par rapport à des souris non exposées)(Mai et al, 2020).

### III - Cibles biologiques d'intérêt

#### 1- Développement et mort cellulaire

##### A- Développement

Le développement cellulaire passe par des phases connues et caractérisées. Concernant les cellules somatiques, c'est-à-dire toutes les cellules d'un organisme pluricellulaire à l'exception des cellules germinales qui sont impliquées dans la reproduction (cellules d'origine des gamètes : ovules et spermatozoïdes)(López-Sáez *et al*, 1998; Australia, 2014; Marte, 2004). Le développement cellulaire met en jeu l'interphase, la mitose et la phase G0 (Figure 8). L'interphase est elle-même divisée en 3 phases : G1, S et G2.



**Figure 8** – Diagramme représentant la proportion moyenne de temps de chaque phase du cycle cellulaire : G1, S, G2, M (mitose) et G0. Source : <https://www.sciencefacts.net/cell-cycle.html>

L'interphase représente environ 90 % du cycle cellulaire. Elle est composée de la phase G1, S et G2. Pendant la phase G1 la cellule va avoir un métabolisme normal pour remplir les fonctions qui lui sont propres. Elle va mettre en place les dispositifs nécessaires à la division de l'ADN lors des phases suivantes. Durant cette phase, le matériel génétique est vérifié. Si aucune erreur n'est détectée la cellule passe en phase S. La phase S durera environ 4h durant lesquelles l'ADN sera



répliqué et vérifié. Des histones servant à la compaction de l'ADN sont également produits en grande quantité durant cette phase. La phase suivante, G2, arrive lorsque la réplication de l'ADN est complète. Durant cette phase, l'ADN est de nouveau vérifié avant la mitose et la cellule elle-même se prépare à la division. La phase M est la phase de division à proprement parler. Elle se divise en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase et la cytokinèse (Scholey et al, 2003). Ces différentes étapes retracent les différentes étapes de séparation de l'ADN et des organites dans les 2 cellules qui résulteront de la mitose. Les cellules peuvent sortir du cycle pour passer en état de quiescence (G0). Il s'agit de cellules qui ne se développeront plus, comme les neurones du système nerveux central par exemple. Cela arrive pour les cellules pleinement différenciées, ou ayant subi des dommages à l'ADN, et donc ne passant pas les étapes de vérification. Suivant le type cellulaire, la phase G0 peut être permanente (certains neurones), semi-permanente (cellules du foie, du rein, ...), ou même inexistante (sauf en cas de problèmes comme pour les cellules épithéliales, ...).

Chaque phase est caractérisée et provoque ses propres variations dans la physiologie de la cellule qui se répercute sur la morphologie (Miniotis et al, 2014). Ainsi, un dérèglement des différentes phases peut être observable en microscopie, notamment en microscopie holographique (Miniotis et al, 2014). De plus, un problème lors des phases de la mitose peut impacter les capacités prolifératives de la cellule (Levine & Holland, 2018). Si des perturbations trop importantes du cycle cellulaire surviennent, la cellule va d'abord tenter de les surmonter ou de s'y adapter au moyen de l'autophagie par exemple (Towers et al, 2019; Zhang et al, 2013; Wojtkowiak et al, 2012). La cellule entrera en apoptose si les perturbations du cycle cellulaire ne peuvent pas être résolues, ou en nécrose si les dommages surpassent les capacités d'adaptation.

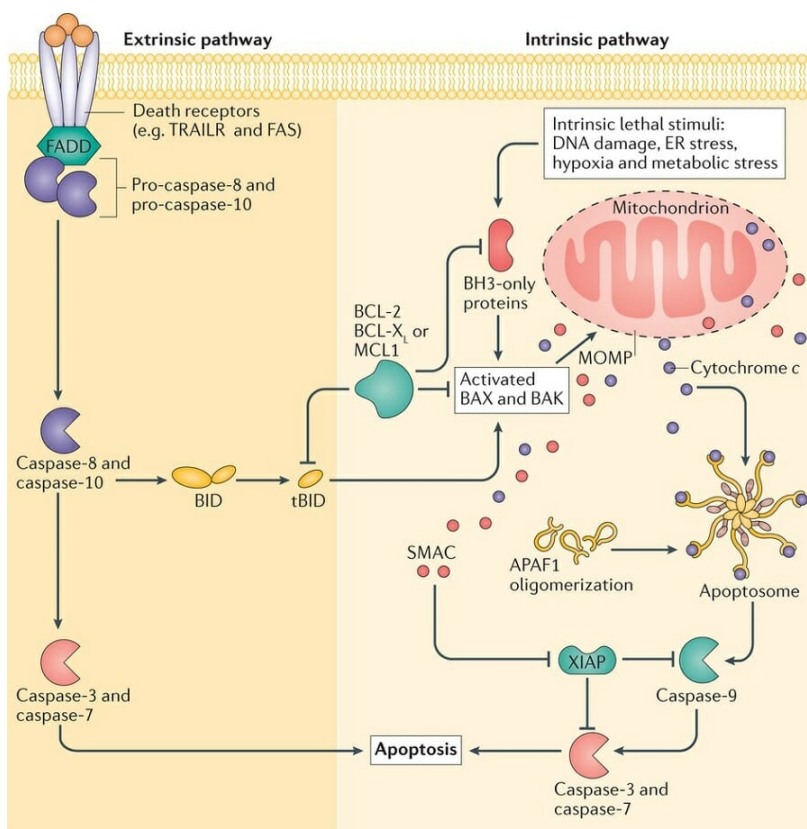
## B- Apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire fondamental dans le développement des organismes pluricellulaires. Elle est essentielle à la formation des tissus et des différentes parties de l'organisme (Meier et al, 2000). L'apoptose régule le nombre de cellules au sein de l'organisme au cours du développement, puis au cours de la vie de l'organisme. Elle sert par exemple à supprimer les cellules surnuméraires lors du développement du système nerveux central des mammifères (Meier et al, 2000; Yuan & Yankner, 2000; Jacobson et al, 1997). Elle participe à la formation des doigts en supprimant les tissus interdigitaux présents lors de la

formation de la main dans le fœtus (Wood et al, 2000; Hernández-Martínez & Covarrubias, 2011; Lorda-Diez et al, 2015). Ce mécanisme de mort cellulaire permet également le maintien de l'homéostasie des différents organes, créant un fragile équilibre entre mort et prolifération des cellules (Meier et al, 2000). Les cellules entrant en apoptose émettent un signal entraînant la migration caspase-dépendante de certaines cellules proches, notamment des cellules immunitaires (Lauber et al, 2003; Gude et al, 2008). Cela permet aux corps apoptotiques contenant les débris et les organelles d'être absorbés suite à la dégradation de la cellule (Ravichandran, 2003).

L'apoptose est donc un mécanisme de mort cellulaire allant au-delà d'une simple destruction de cellules défailtantes (Elmore, 2007), et qui est caractérisé aussi bien au niveau moléculaire (Galluzzi et al, 2018; Hengartner, 2000; Meier et al, 2000) qu'au niveau morphologique (Kerr et al, 1972; Elmore, 2007).

Toutes les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont liées à l'activité des caspases (cysteine-dependent aspartate-directed proteases). Ces protéines interviennent à chaque niveau des deux voies de signalisation de l'apoptose, qui sont les voies extrinsèques et intrinsèques (Figure 9)(Galluzzi et al, 2018, 2015). La première passe par les récepteurs membranaires de mort cellulaire et la seconde passe par la mitochondrie.



**Figure 9** – Représentation schématique de plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans les déclenchements extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

Source : <https://biologydictionary.net/apoptosis/> (Editors, 2017).

La voie extrinsèque menant à l'apoptose utilise un récepteur de mort situé sur la membrane plasmique. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires de la superfamille du récepteur TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha). Ils comprennent les récepteurs TNF-R1, TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor) et FAS (CD95)(Ashkenazi & Dixit, 1998). La fixation d'un ligand à ce récepteur entraîne l'activation des caspases par modification de la partie intracellulaire du récepteur rapprochant les domaines de mort (Death Domain, DD). La trimérisation du récepteur déclenche l'induction de la mort cellulaire. Dans le cas de FAS, la protéine FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) peut alors se lier au canal. Sur FADD se lie, ensuite, la caspase initiatrice (Jeong et al, 1999). Dans le cas de TNF-R1, FADD nécessite la protéine adaptatrice TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain)(Wallach et al, 1996). FADD interagit avec les procaspases 8 et 10 via ses domaines DED (death-effector domain). L'ensemble des protéines forme alors le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex)(Mace & Riedl, 2010). Les procaspases 3 et 7 seront ensuite clivées par la caspase 8 menant la cellule à l'apoptose (MacFarlane & Williams, 2004).

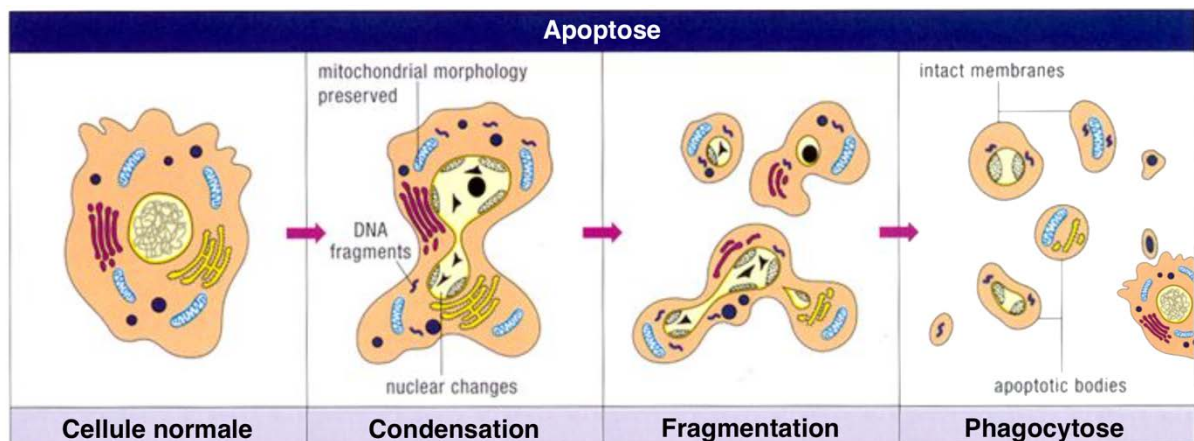
La voie intrinsèque, ou mitochondriale, est induite par différents signaux de stress provenant de la cellule elle-même. Ces stress peuvent être, par exemple, une augmentation des ROS, une diminution de la quantité de nutriments disponibles ou des dommages à l'ADN. Les stress entraînent une altération de la membrane externe de la mitochondrie. Les protéines pro-apoptiques Cytochrome C (Cyt C), Omi/HtrA3 et Smac, alors contenues entre les membranes internes et externes de la mitochondrie, sont relâchées dans le cytoplasme cellulaire (Green & Kroemer, 2004; Silke et al, 2000). Cyt C et Apaf1 (apoptotic protease-activating factor 1) forment un hétérodimère permettant une hydrolyse de l'ATP. La protéine Apaf1 sera alors en mesure de lier la procaspase-9. Un complexe formé de 7 de ces assemblages est appelé apoptosome et entraîne un clivage de la procaspase-9 en caspase-9, ce qui activera différentes caspases telles que les caspases 3 et 7 (Figure 9)(Malladi et al, 2009; Cain, 2003). Il est important de savoir que les voies de signalisations intrinsèques et extrinsèques peuvent s'activer entre elles (Slee et al, 1999; Yamada et al, 1999), ce qui permet une augmentation du signal de mort cellulaire.

L'entrée en apoptose des cellules s'accompagne également de modifications morphologiques des cellules (Kerr et al, 1972; Elmore, 2007; Kroemer et al, 2007, 2009)

comme la perte d'adhésion de la cellule à son support et aux autres cellules. Durant l'apoptose, plusieurs phénomènes interviennent en parallèle :

- Des phosphatidylsérines (PS) transitent de la face intracellulaire de la membrane plasmique à la face extracellulaire.
- La cellule subit une compaction du cytoplasme.
- La chromatine se condense (pycnose).
- Un phénomène de « bourgeonnement » membranaire (en anglais « plasma membrane blebbing ») apparaît avant la formation de corps apoptotiques.

L'apoptose entraîne une diminution de la taille des cellules. À aucun moment la membrane n'est rompue au cours de ce processus (Figure 10). L'ADN est ensuite fragmenté, ce qui est un point de non-retour dans la mort cellulaire (Galluzzi et al, 2009a). Ces fragments d'ADN sont formés d'environ 200 paires de bases. Les corps apoptotiques sont enfin phagocytés, soit par les cellules adjacentes, soit par les cellules du système immunitaire.

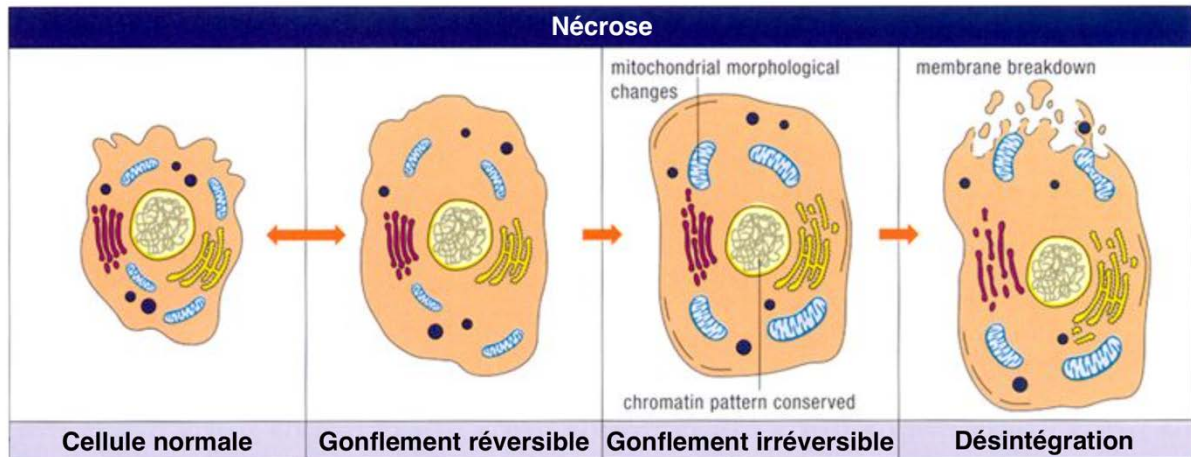


**Figure 10** - Progression des étapes de l'apoptose au cours du temps de gauche à droite. Lorsqu'une cellule « normale » entre en apoptose, la première étape est une perte d'adhésion. S'ensuit une diminution de sa taille par condensation du cytoplasme et de la chromatine. Le bourgeonnement membranaire provoquera par la suite la fragmentation en corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules adjacentes. Schéma de la publication Goldberg M. (2019) Morphologic and Biochemical Criteria of Cell Death: Apoptosis and Necrosis. J Cancer Sci Treatment, 1(1): 17-24.

L'apoptose est donc un processus actif qui n'impacte qu'une seule cellule, sans endommager son contenu, et qui implique une fragmentation du noyau. La membrane cellulaire n'étant pas endommagée, les vésicules apoptotiques sont phagocytées sans provoquer de réaction inflammatoire.

### C- Nécrose

À l'inverse de l'apoptose, la nécrose se reconnaît à une augmentation du volume cellulaire appelée oncosis et un gonflement des organelles. Ce phénomène est suivi d'une rupture de la membrane plasmique, ce qui libère le contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire (Kroemer et al, 2009)(Figure 11).

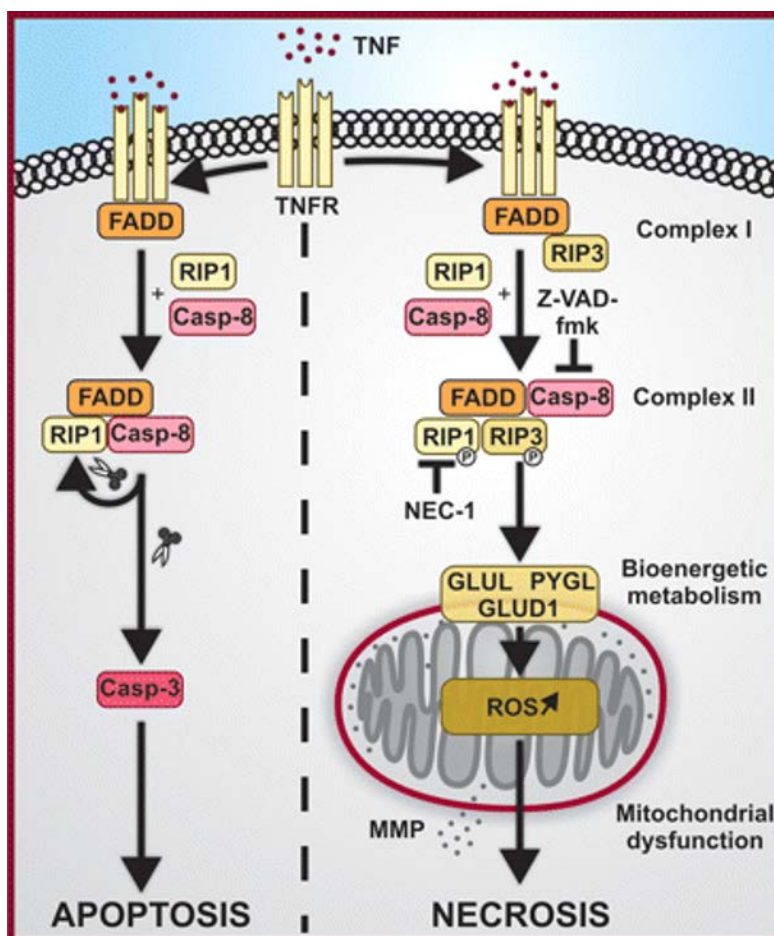


**Figure 11** - Progression des étapes de la nécrose au cours du temps de gauche à droite. Lorsqu'une cellule « normale » subit une nécrose, la première étape est un gonflement cellulaire suivi d'un gonflement des organelles. S'ensuit une destruction de la membrane plasmique accompagnée d'un rejet du contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire. Schéma de la publication Goldberg M. (2019) Morphologic and Biochemical Criteria of Cell Death: Apoptosis and Necrosis. J Cancer Sci Treatment, 1(1): 17-24.

La nécrose peut également être repérée à l'aide de différents paramètres comme une baisse de la concentration en ATP dans la cellule. La rupture des membranes mitochondriales entraîne le relargage des protéines normalement présentes lors de l'apoptose (Saelens et al, 2004). Dans le cas de la nécrose, il n'y a pas d'implication de la caspase dans le processus de mort cellulaire. La nécrose est causée par des stress tels que des chocs physiques ou chimiques violents. Les cellules concernées par la nécrose relarguent des protéines et des DAMPs (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns)(Poon et al, 2010). Ces protéines sont alors captées par les cellules de l'immunité, ce qui déclenche une réponse inflammatoire (Kono & Rock, 2008) et permettra un processus de cicatrisation du tissu (Raucci et al, 2007).

Bien que la nécrose soit connue pour être activée par les chocs accidentels, certains groupes de recherche tendent à mettre en évidence une programmation de ce phénomène (Golstein & Kroemer, 2007). Par exemple, la nécrose permet de contrôler la croissance des os en détruisant des chondrocytes durant leur développement (Roach & Clarke, 2000). Elle est

également en partie impliquée dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Barkla & Gibson, 1999). Une déplétion d'ATP peut également amener une cellule à une mort nécrotique plutôt qu'apoptotique (Leist et al, 1997). Ainsi, des études sur la possibilité d'une nécrose induite ont été réalisées (Degterev et al, 2005; Hitomi et al, 2008). Ces études ont conclu que lors d'une nécrose induite, il y a une fixation de ligands TNF-  $\alpha$ , TRAIL et FASL sur les récepteurs membranaires de l'apoptose. Une protéine semble centrale dans le mécanisme de nécrose induite, il s'agit de RIP1 (Receptor-interacting protein 1)(Christofferson et al, 2014). L'implication d'une protéine RIP3 fut également prouvée (Cho et al, 2009; He et al, 2009; Zhang et al, 2009). Le phénomène de nécrose induite fut appelé nécroptose. La nécroptose semble ainsi basée sur l'activité des protéines kinases. Bien que les complexes RIP soient différents des complexes DISC de l'apoptose, ces deux types de mort semblent partager des caractéristiques communes. Par exemple, RIP1, FADD et la caspase 8 interviennent dans les complexes de nécroptose comme d'apoptose, mais la nécroptose utilise également une protéine RIP3 absente de l'apoptose (Figure 12)(Hitomi et al, 2008; Degterev et al, 2005).



**Figure 12-** Schéma représentant les voies d'activation de l'apoptose et de la nécroptose. Figure issue de l'article de (Galluzzi et al, 2009b).



## D- Autophagie

L'autophagie a été découverte par Christian de Duve, qui reçut le prix Nobel de médecine en 1974, suite à sa caractérisation des péroxysomes et des lysosomes. Le terme d'autophagie désigne un mécanisme de recyclage des composants cytoplasmiques par la cellule elle-même. Cette voie permet la dégradation des organites et macromolécules via des lysosomes. Le produit de la dégradation sera réutilisé par la cellule pour créer de l'énergie ou de nouvelles macromolécules. Cette voie est donc capitale dans le maintien de l'homéostasie, notamment en situation de stress (par exemple, le manque de nutriments). Il existe quatre formes connues d'autophagie qui sont la micro-autophagie, l'autophagie dépendante de protéines chaperonnes, l'autophagie de l'ADN/ARN, et enfin la macro-autophagie.

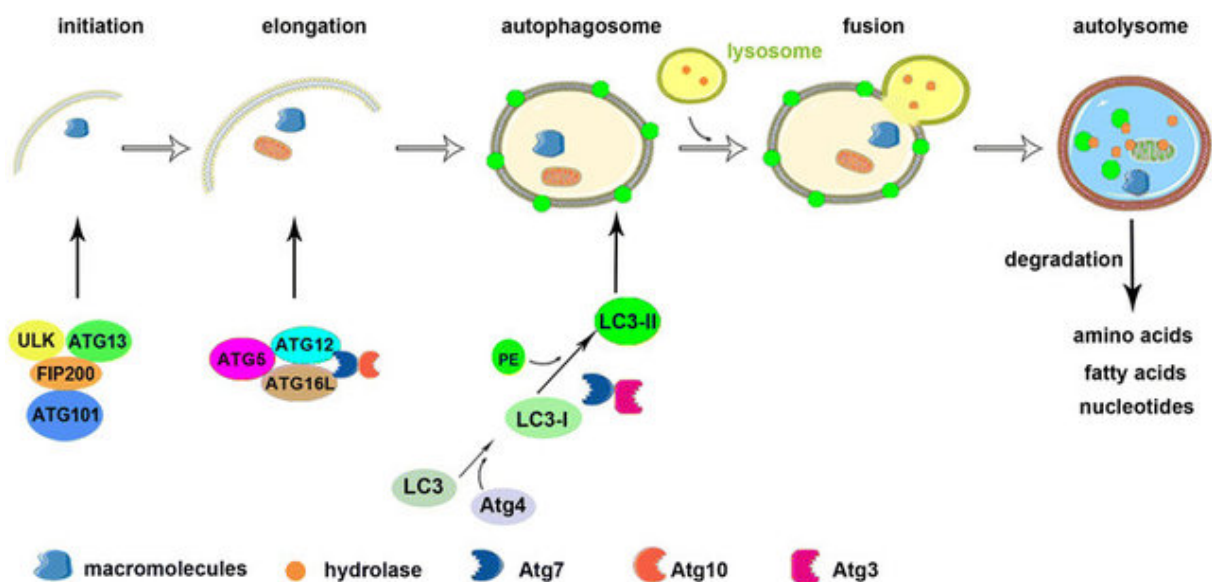
La micro-autophagie est principalement non sélective. Elle peut être induite par des stress comme le manque de nutriments et l'hypoxie. Lors de cet événement, la membrane du lysosome s'invagine séquestrant une petite partie du cytoplasme qui sera ensuite dégradée dans le lysosome. Il s'agit d'un mécanisme pouvant conduire à l'internalisation d'organites comme la mitochondrie, le peroxyosome ou le noyau (Mijaljica et al, 2011; Li et al, 2012a).

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes ou CMA (Chaperone-Mediated Autophagy) est quant à elle exclusivement sélective. Elle ne peut cibler que les protéines affichant un domaine de cinq peptides K-F-E-R-Q reconnue par la protéine chaperonne Hsc70 (Chiang et al, 1989). Cette protéine chaperonne permettra un adressage au lysosome. La protéine transmembranaire LAMP2A (Lysosomal- Associated Membrane Protein 2) permettra ensuite l'internalisation de ce complexe protéique dans le lysosome (Majeski & Fred Dice, 2004). LAMP2A monomérique est un récepteur de la CMA, cependant l'internalisation dans le lysosome requiert sa multimérisation (Bandyopadhyay & Cuervo, 2008).

L'autophagie de l'ADN et de l'ARN est ATP dépendant et fait intervenir LAMP2C (Fujiwara et al, 2013a, 2013b). LAMP2C reconnaît directement les acides nucléiques présents dans le cytosol et les internalise dans le lysosome sans passer par une protéine chaperonne.

La macro-autophagie est la forme la plus étudiée (Mehrpour et al, 2010; Parzych & Klionsky, 2014). Cette forme d'autophagie sera celle que nous qualifierons d'autophagie dans le reste de ce manuscrit. Elle permet une dégradation massive de multiples composants du cytoplasme en une fois à travers la formation d'une structure pourvue d'une bicouche lipidique et nommée autophagosome. Cette structure a la capacité de capturer des organites,

des complexes protéiques, ou encore des acides nucléiques. Elle fusionne ensuite avec un lysosome formant l'auto-lysosome. Le contenu de l'auto-lysosome est ensuite dégradé et les composants sont relargués dans le cytoplasme. Il s'agit d'un mode d'autophagie présent de manière constitutive mais pouvant être stimulé par un stress comme une carence en acides aminés, en facteurs de croissance, ou plus simplement lors d'infections, d'hypoxie ou d'un stress oxydatif (Klionsky & Codogno, 2013). Ce mécanisme est très rapide à se mettre en place. Il s'écoule 8 minutes entre l'apparition et la dégradation d'un autophagosome (Eskelinen, 2005). Il s'agit d'un processus finement régulé par une trentaine de gènes (Klionsky et al, 2003; Suzuki & Ohsumi, 2007). Ces gènes régulateurs sont nommés gènes ATG (AuTophagy related genes)(Klionsky et al, 2012). On peut décomposer ce phénomène d'autophagie en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la formation de l'autolysosome (Figure 13).



**Figure 13** – Formation de l'autolysosome en passant par les 3 étapes que sont l'initiation, l'élongation jusqu'à formation de l'autophagosome et enfin la fusion avec un lysosome qui forme l'autolysosome. Image issue de l'article Yang et al, 2015.

L'initiation est caractérisée par la formation de structure membranaire PAS (Phagophore Assembly Site) à partir de protéines ATG (Suzuki et al, 2001). Trois acteurs viennent interagir avec le phagophore au cours de cette étape ULK1, PI3K de classe III et MTORC1. L'origine de cette membrane ne fait pas consensus. La membrane pourrait provenir du réticulum endoplasmique (Hayashi-Nishino et al, 2009; Ylä-Anttila et al, 2009), de la membrane nucléaire (English et al, 2009), de l'appareil de Golgi (Itoh et al, 2008), de la mitochondrie (Hailey et al, 2010), ou de la membrane plasmique de la cellule (Ravikumar et al, 2010).



Une fois que le phagophore est prêt, il subit l'étape de l'élongation, qui est régulée par un mécanisme nommé « Ubiquitin-like conjugaison system ». Huit protéines ATG permettent la formation de deux systèmes distincts interdépendants : LC3-PE (Light Chain 3 - Phosphatidyl-Ethanolamine) et ATG12-ATG5. Cette étape permettra l'allongement et les invaginations de l'autophagosome.

Enfin, une fois l'autophagosome formé autour de la cible à dégrader, celui-ci va fusionner avec le lysosome. Pour cela l'autophagosome va se diriger le long de microtubules grâce à un complexe dynéine-dynactine (Kimura et al, 2008). L'autophagosome va ainsi être mené vers une région cellulaire riche en lysosomes pour permettre la formation de l'autophagolysosome, aussi appelé autolysosome. L'autophagosome peut également fusionner avec les endosomes formant alors des amphisomes via le complexe protéique ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)(Rusten & Simonsen, 2008). Ces amphisomes finiront également par fusionner avec un lysosome via une protéine Rab-SANRE (Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor)(Stroupe, 2011).

Une fois l'autolysosome formé, son contenu sera dégradé via l'intervention d'hydrolases telles que les lipases et les protéases. Les lipases vont faire des acides gras à partir des lipides et les protéases vont décomposer les protéines en peptides, qui seront dégradés en acides aminés par des peptidases avant d'être libérés dans la cellule (Teter et al, 2001). Des nucléases sont également présentes pour dégrader les séquences d'acides nucléiques en nucléosides.

L'autophagie peut être provoquée par des stress de différentes natures. Le stress nutritionnel provient d'une carence en nutriments ou de facteurs de croissance dans le milieu. En culture cellulaire, cette carence ne met que quelques minutes à induire l'autophagie (Boya et al, 2005). Il faut attendre 48 heures pour observer une accumulation de phagosomes dus au jeûne chez un animal entier (Mizushima & Levine, 2010). Une autre catégorie de stress régulé par l'autophagie est le stress du réticulum endoplasmique lors d'une surproduction de protéines mal repliées. Cela peut survenir suite à une anomalie dans la régulation des mécanismes d'oxydoréduction, une infection virale ou une carence en glucose. Un stress mitochondrial peut également déclencher une réponse autophagique. Une mitochondrie endommagée générera beaucoup de ROS qu'il est capital de pouvoir éliminer. L'autophagie de la mitochondrie est appelée mitophagie (Matsuda & Tanaka, 2010). Certains pathogènes

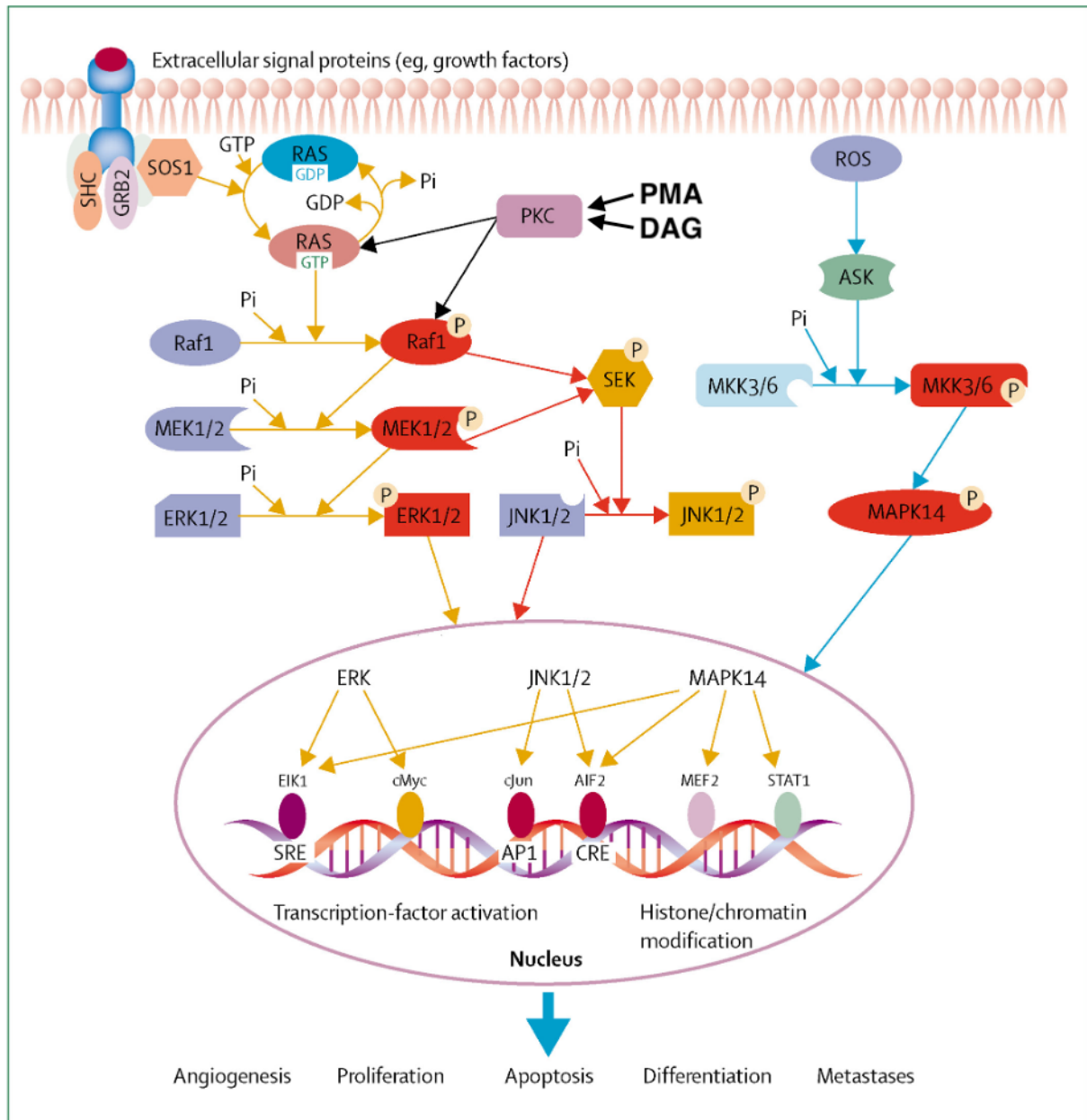
peuvent également induire une réaction autophagique (Rikihisa, 1984). Il en va de même pour l'hypoxie et l'anoxie (Bellot et al, 2009).

## 2- Cibles moléculaires étudiées

### A- La voie des MAP kinases

L'un des mécanismes majeurs qui déclenchent les réponses cellulaires aux stimuli extracellulaires est l'activation en cascade de Ser/Thr protéine-kinase activées par les mitogènes. La voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) contient différents mécanismes de signalisation qui sont conservés au cours de l'évolution (Reddy et al, 2003; Xu et al, 2016; Widmann et al, 1999) et qui sont critiques pour certains processus biologiques. Cette voie appartient au groupe des kinases CMGC (CDK, MAPK, GSK, CLK). Elle régule par exemple la prolifération, la différenciation, le développement, l'apoptose, la senescence ainsi que la survie de la cellule (Sun et al, 2015). Cette capacité de régulation en fait une voie d'importance dans le milieu de la cancérologie (Reddy et al, 2003). La voie MAPK est subdivisée en 4 voies classiques et 3 voies atypiques (Morrison, 2012). Les voies classiques mènent à l'activation des kinases JNK 1 à 3 (c-Jun NH2-terminal kinase, ou SAPK pour Stress-Activated Protein Kinase), p38  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$  (MAP14), des protéines ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) et ERK5 (BMK1 ou Big MAPK1). Les voies dites atypiques mènent à l'activation des ERK3/4, ERK7/8 et NLK (Nemo-like kinase). La voie MAPK est composée d'une cascade de phosphorylations séquentielles suite à certaines stimulations (tels que des facteurs de croissance, les stress cellulaires, des hormones, des cytokines, des neurotransmetteurs, l'adhérence cellulaire...) (Widmann et al, 1999). Globalement, il s'agit de protéines kinases activables par double phosphorylation d'une serine ou d'une thréonine et d'une tyrosine bordant une séquence dépendante de la protéine (au sein d'une séquence S/T-X-Y). Les protéines dites « classiques » ainsi que ERK 7/8 possèdent un domaine kinase Thréonine – X – Tyrosine (X représentant un acide aminé dépendant du type de kinase). Il existe de multiples méthodes pour activer les différentes parties de la voie MAPK. Un composé chimique très utilisé pour activer la voie ERK/MAPK est le PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)(Lee et al, 2002; Baillie et al, 2001; Jiang & Fleet, 2012; Zhang et al, 2016; Castagna et al, 1982; Brose & Rosenmund, 2002). Il s'agit d'un analogue du diacylglycérol (DAG) qui vient se lier directement à PKC. La PKC entraîne une cascade d'activations en commençant par activer RAS et RAF (Figure 14), ce qui

entraîne une cascade de phosphorylations par différentes kinases qui mènent à l'activation de ERK1/2 et JNK. PKC entraîne également l'activation de P38 (MAPK14) de manière indirecte (Nakajima et al, 2004; Kitatani et al, 2009; Keshari et al, 2013).



**Figure 14** – Représentation des trois cascades de transductions du signal induit par les kinases sérine-thréonine activées par des stimuli tels que des facteurs de croissance, le stress et l'inflammation. Les effecteurs en aval de la voie RAS comprennent l'activation de cMyc et cJun pour former AP1 : protéine activatrice 1, AIF2 : facteur induisant l'apoptose, ASK : kinase régulatrice du signal d'apoptose, CRE : élément de réponse AMP cyclique/calcium, ELK : kinase de lignée mixte, MKK : kinase MAPK, MEF2 : facteur d'amplification des myocytes 2, PKC : protéine kinase C, ROS : espèces réactives de l'oxygène. SOS=Son of sevenless, STAT1 = transducteur de signal et activateur du facteur de transcription 1. D'après Fang & Richardson, 2005.

#### *a- Activation de la voie ERK/MAPK et RAS*

Les voies MAPK sont activées par des stimuli comme les facteurs de croissance et les cytokines, il en va de même pour ERK/MAPK. L'activité de ERK/MAPK est principalement liée aux récepteurs EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor). Suite à leur activation, ces récepteurs se dimérisent, ce qui permet leur activité tyrosine kinase. Suite à cette activation, une protéine GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2) est recrutée et permet l'interaction avec un facteur d'échange GDP/GTP nommé SOS-1 (Son Of Sevenless homolog 1). SOS-1 permet l'activation d'une protéine RAS en remplaçant son GDP par un GTP. RAS-GTP est alors capable d'activer différentes voies de signalisation dont ERK/MAPK (Buday & Downward, 1993). Un des rôles de la voie MAPK est donc de relayer des signaux extracellulaires suite à l'activation de la protéine RAS (Kim & Choi, 2015a; Nussinov et al, 2018).

RAS est une protéine G de 21 kDa présente sur la face interne de la membrane plasmique. En plus d'être activé par SOS-1, RAS peut également être activée par GEF (Guanine Nucléotide Exchange Factors) qui est en capacité de remplacer le GDP de la protéine par du GTP. À l'inverse, RAS passe à sa forme inactive liée au GDP en présence de GAP (GTPase Activating Proteins)(Colicelli, 2004). Suite à son activation, RAS peut activer des effecteurs tels que RAF, qui activera à son tour la voie ERK/MAPK impliquée dans la prolifération. RAS peut également activer les protéines PI3K, RALGD, TIAM ou PLC qui sont respectivement impliquées dans la survie/différenciation, le trafic vésiculaire, l'organisation du cytosquelette, et la signalisation calcique (Downward, 2003).

RAS est une protéine oncogène mutée dans 1 cancer sur 4 chez l'humain, et jusque dans 90 % des cas de cancers du pancréas (Downward, 2003). RAS existe sous 4 isoformes : H-RAS, K-RASA, K-RASB et N-RAS. Ces isoformes possèdent 85 % d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés (Hobbs et al, 2016). Ces isoformes diffèrent notamment par leurs niveaux d'expression, K-RAS étant une isoforme quasiment ubiquitaire. En outre, H-RAS et N-RAS ont un domaine palmitoylé lié à un adressage à l'appareil de Golgi, tandis que K-RAS se retrouve principalement au niveau de la membrane plasmique.

## *b- ERK1/2*

ERK 1 et 2 sont les premières protéines à avoir été décrites comme faisant partie d'une signalisation induite par des facteurs de croissance. Elles possèdent un domaine de phosphorylation Thréonine, Glutamate, Tyrosine et sont similaires à 84 % (Buscà et al, 2016). Les protéines ERK1 et 2 sont activées par la phosphorylation de la thréonine 185 et tyrosine 187, sur leur motif Thréonine – Glutamate – Tyrosine. Une fois activées, ces protéines phosphorylent des substrats sur des résidus hydroxylés (Serine et Thréonine) situés sur des domaines Proline – X – Serine/Thréonine – Proline (Davis, 1993; Clark-Lewis et al, 1991; Yoon & Seger, 2006).

Les protéines ERK 1/2 sont importantes pour un grand nombre de processus cellulaires (Yoon & Seger, 2006). Suite à leur activation, ERK1 et 2 pénètrent dans le noyau et régulent l'activité de plusieurs facteurs de transcription. Par exemple, l'activateur transcriptionnel ELK1 (ETS like-1 protein) est phosphorylé par ERK1/2, ce qui augmente son affinité pour le SRE (serum response element) de c-Fos. Le gène Fos, qui régule la division cellulaire, est ainsi régulé à la hausse (Whitmarsh et al, 1995). De même, MYC, impliqué dans la croissance cellulaire, est régulé par ERK1/2 (Sears et al, 2000). Les protéines ERK1/2 sont également des éléments de régulation de la mort cellulaire puisqu'ils régulent TNF $\alpha$ , Fas, FasL, DR4 et 5, ainsi que des éléments pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Cagnol & Chambard, 2010). Les protéines ERK1 et 2 sont également impliquées dans le développement du système nerveux central (Li et al, 2012b), du système cardiovasculaire (Frémin et al, 2015), du système respiratoire (Boucherat et al, 2014), du système urinaire (Capolongo et al, 2019), du système immunitaire (Fischer et al, 2005), et même dans le développement du placenta (Nadeau & Charron, 2014).

Du fait de son importance, la voie ERK/MAPK est extrêmement régulée. Des protéines ont ainsi été caractérisées comme étant nécessaires à l'activation des kinases, permettant un rapprochement ou le recrutement des protéines kinases accélérant leur réponse, tout cela en minimisant les contacts avec des protéines tels que les phosphatases qui atténueraient l'action des kinases (Dhanasekaran et al, 2007). Plusieurs protéines sont aujourd'hui connues pour assurer ce rôle de régulateur de la voie ERK/MAPK (Meister et al, 2013) :

- Kinase Suppressor of Ras 1, KSR1 (Denouel-Galy et al, 1998; Ory et al, 2003)
- MEK Partner-1, MP1 / Complexe P14 (Wunderlich et al, 2001; Schaeffer et al, 1998)

- $\beta$ -arrestine 2 (Luttrell et al, 2001; Tohgo et al, 2002)
- MAPK Organizer-1, MORG1 (Vomastek et al, 2004)
- Flotillin-1 (Banning et al, 2012; Amaddii et al, 2012)
- Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2 (Zhou et al, 2009)
- Paxillin (Ishibe et al, 2004)
- IQ motif containing GTPase-activating protein 1 (IQGAP1)(Roy et al, 2005)

#### c- ERK5

La protéine ERK5 (MAPK7) est impliquée comme d'autres MAPK dans les processus anti-apoptotiques, la survie, la prolifération et la différenciation (Wang & Tournier, 2006). Elle est activée par certaines cytokines (tels que IL-6 ou IL-8), des facteurs de croissance (tels que EGF, VEGF, FGF2, HGF ou NGF), ou des stress (tels que les stress osmotiques, oxydatifs, ou UV) (Nithianandarajah-Jones et al, 2012). Les 3 isoformes de ERK5 (a, b et c) diffèrent par leurs extrémités N-terminales. Elles possèdent toutes un domaine de phosphorylation Thréonine – Glutamate – Tyrosine.

#### d- MAP kinase p38

La famille MAPK P38 comprend 4 isoformes : p38 $\alpha$  (MAPK14), p38 $\beta$  (p38-2, MAPK11), p38 $\gamma$  (MAPK12, SAPK3, ERK6), et p38 $\delta$  (MAPK13, SAPK14)(Jiang et al, 1996, 1997; Li et al, 1996, 38). Historiquement, p38 $\alpha$  est la première isoforme à avoir été découverte. Sa séquence d'acides aminés partage 75 % d'homologie avec p38 $\beta$  et 60 % d'homologie avec p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  (les isoformes  $\gamma$  et  $\delta$  ayant 70 % d'homologie entre eux)(Cuenda & Rousseau, 2007). L'expression est dépendante de l'isoforme (Ono & Han, 2000). p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  sont ubiquitaires, mais p38 $\beta$  est plus fortement exprimée dans le cerveau. La protéine p38 $\delta$  est exprimée dans les poumons, les reins, les intestins, le pancréas et les testicules, tandis que p38 $\gamma$  est exprimée dans les muscles squelettiques. Toutes les isoformes de p38 possèdent un domaine de phosphorylation Thréonine – Glycine – Tyrosine.

#### e- JNK

La voie c-Jun NH2-terminale kinase (JNK) est une voie activée par les stress environnementaux et les cytokines (Kyriakis & Avruch, 2001). Trois gènes ont une expression distincte suivant leur emplacement dans l'organisme. JNK1 (MAPK8) et JNK2 (MAPK9) sont

ubiquitaires tandis que JNK3 (MAPK10) est retrouvée dans le cerveau, les testicules et le cœur. Les 10 isoformes issus de ces trois gènes sont classées en deux catégories (Gupta et al, 1996). La première catégorie regroupe les JNK avec une extrémité C-terminale courte et une taille de 46 kDa. La seconde catégorie regroupe les JNK avec extrémité C-terminale plus longue et faisant 55 kDa. Toutes les isoformes possèdent un domaine de phosphorylation Thréonine – Proline – Tyrosine.

*f- MAP kinases atypiques (ERK3/4 ; ERK7/8 ; NLK)*

ERK3 (MAPK6) a été découvert par recherche d'homologie avec ERK1 durant un criblage de banque d'ADN (Boulton et al, 1991). ERK4 (MAPK4) fut découverte de manière similaire dans les années qui suivirent (García et al, 1996; Gonzalez et al, 1992). Ces protéines sont proches structurellement de ERK1, cependant elles ont un domaine C terminal plus grand et le motif de phosphorylation Tyrosine – Tryptophane conservé chez la plupart des MAPK est absent. A la place de ce domaine on retrouve un motif Serine – Glutamate – Glycine (Coulombe & Meloche, 2007). Notons que la répartition de ERK3 et ERK4 est différente. ERK3 est exprimée de manière ubiquitaire alors ERK4 est présent dans le cerveau, le colon, les ovaires, le pancréas, la peau, le placenta, les poumons, les reins et les yeux (Coulombe & Meloche, 2007).

ERK7 (MAPK15)(Abe et al, 1999) et son orthologue ERK8 (Abe et al, 2002) partagent 69 % de similarité. Ces protéines ont un motif Thréonine – Glutamine – Tyrosine. Des études ont montrées que ERK7 est constitutivement autophosphorylée et ne répond pas aux mêmes stimuli que les MAPK classiques (Abe et al, 2001). La protéine ERK8, quant à elle, répond à certains de ces stimuli et n'est pas autophosphorylée (Abe et al, 2002).

La Nemo-like kinase (NLK)(Choi & Benzer, 1994; Brott et al, 1998) possède environ 40 % d'homologie avec les protéines ERK. NLK possède un domaine Thréonine – Glutamine – Glutamate à la place du domaine kinase Thréonine – X – Tyrosine des MAPK classiques. NLK est une protéine ubiquitaire retrouvée en majorité dans les organes lymphoïdes et le cerveau (Daams & Massoumi, 2020).

## B- HSF et HSP

### *a- HSF*

Le facteur de choc thermique (Heat Shock Factor, HSF) est le régulateur le plus important de la réponse aux chocs thermiques chez l'humain.

La protéine HSF est un facteur de transcription liant l'ADN sur des séquences nommées HSE (Heat Shock Element) présentes sur les promoteurs des gènes HSP (Heat Shock Protein) (Gomez-Pastor et al, 2018; Santoro et al, 1998). Les HSE se composent de plusieurs répétitions de la séquence de cinq paires de bases 5'-nGAAn-3' (où n peut être n'importe quel nucléotide) (Xiao & Lis, 1988; Amin et al, 1988). Le nombre d'unités pentamériques dans une séquence HSE peut varier. Un minimum de trois répétitions est nécessaire pour l'induction de l'expression des HSP par la chaleur, mais certains HSE peuvent contenir huit répétitions (Fernandes et al, 1994). Qui plus est, le degré d'homologie de chaque unité pentamérique avec le motif consensus nGAAn peut varier, tout comme la nature du pentamère initial. Des écarts à la séquence consensus nGAAn peuvent être tolérés *in vivo* car plusieurs HSE favorisent les interactions entre plusieurs trimères HSF (Bonner et al, 1994; Topol et al, 1985; Xiao et al, 1991). Ces variations dans la séquence du site de liaison peuvent influencer l'affinité de HSF pour le ou les HSE d'un gène de choc thermique particulier, influençant ainsi le niveau d'activation transcriptionnelle et la nature de la réponse du gène de choc thermique (Guertin & Lis, 2010).

Du fait de son activité de facteur de transcription en se liant sur les HSE, HSF permet d'induire l'expression des HSP. De nombreux stimuli permettent l'induction de cette voie de stress. Ces stimuli peuvent :

- Être environnementaux (i.e., choc thermique (Nielsen et al, 2006), hypoxie
- Stress oxydants (Krishnamurthy et al, 2011) ;
- Être liés à une activation par des polluants chimiques (comme des métaux lourds (Joseph et al, 2012) ou par des drogues (Roesslein et al, 2008, 70)) ;
- Suivre une réponse cellulaire globale (une différenciation (Amici et al, 1992) ou une réponse inflammatoire (Knowlton, 2006)).

Des méthodes d'activation chimiques des protéines de réponse au choc thermique sont couramment utilisées en laboratoire. Par exemple, le MG132 (Kim et al, 2011), un inhibiteur du protéasome qui empêche les protéines mal repliées d'être détruites, est une molécule très



utilisée pour étudier l'activation de la voie HSF/HSP en provoquant un stress protéotoxique. Lorsque la quantité de protéines mal repliées augmente dans les cellules, la protéine HSF va réguler la production des protéines (Lee & Goldberg, 1998; Young & Heikkila, 2010). La réponse engendrée par l'activation de HSF est transitoire et différente suivant la puissance du stress et le type de cellules. HSF permet également de stopper la production de plusieurs protéines constitutivement exprimées tandis que HSP s'occupera des protéines mal repliées. Ces protéines permettent ainsi d'éviter le stress protéotoxique lié à l'agrégation de protéines dans les cellules (Anckar & Sistonen, 2011; Morimoto, 1993; Lindquist, 1986).

Chez l'humain, il existe trois protéines HSF qui sont HSF 1, 2, et 4, qui sont issues d'un épissage alternatif (Fiorenza et al, 1995). HSF3 n'a pour le moment été décrit que chez la souris et l'oiseau (Fujimoto et al, 2010; Nakai & Morimoto, 1993).

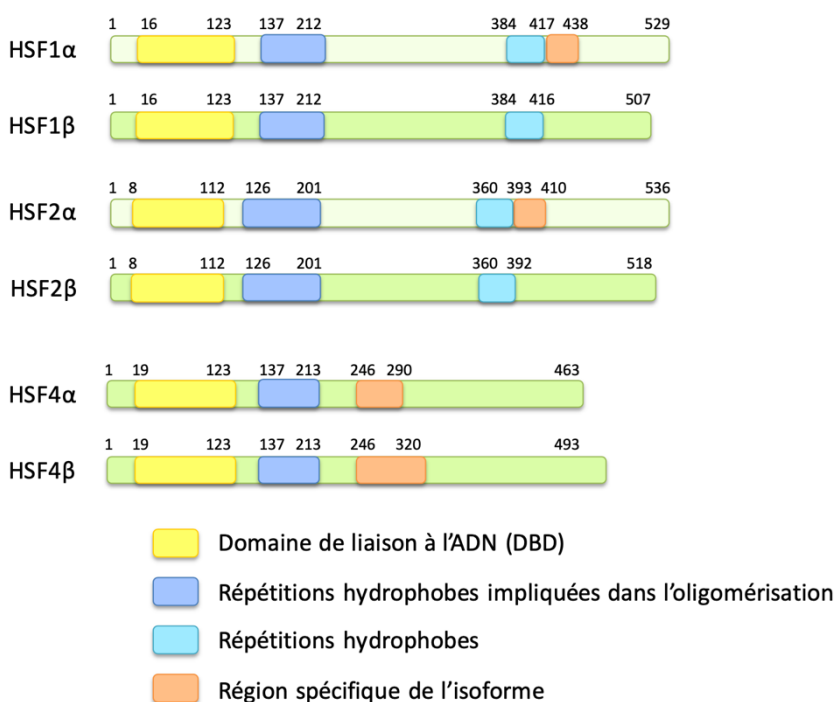
HSF1 engendre les processus de thermorésistance de la cellule (McMillan et al, 1998; Lindquist, 1986). Cette protéine est impliquée dans beaucoup de processus biologiques comme notamment la gamétogénèse, le développement, la réponse immunitaire et inflammatoire (Akerfelt et al, 2007; Nakai et al, 2000; Abane & Mezger, 2010). Il peut également réprimer la transcription globale de protéines en interagissant avec des histones déacétylases (Fritah et al, 2009). La protéine HSF1 est principalement régulée par des modifications post-traductionnelles et des interactions protéines-protéines (Fujimoto & Nakai, 2010; Björk & Sistonen, 2010).

HSF2 est impliqué dans la différenciation et le développement de la cellule (Abane & Mezger, 2010). HSF2 peut être impliquée dans la réponse au choc thermique en interagissant avec HSF1. Le trimère HSF2-HSF1 induit la transcription de corps nucléaire de stress (nSB) via la séquence Sat III. Elle induit l'expression de HSP70 et HSP25 et peut réprimer HSP40 et HSP110. L'activité de cette protéine est régulée par son niveau d'expression, elle-même dépendante de l'intégrité de la protéine HSF1 (Ostling et al, 2007). Ainsi une surexpression de HSF2 entraîne une activation dépendante de son expression. HSF2 est capable dans cette condition de se trimériser avec HSF1 même en dehors des conditions de stress et d'induire la transcription de HSP et de nSB (Ostling et al, 2007; Sandqvist et al, 2009).

HSF4 n'est exprimée que dans les poumons, le cerveau et le cristallin (Tanabe et al, 1999). En plus de n'être présente que dans très peu de types cellulaires, contrairement à HSF1

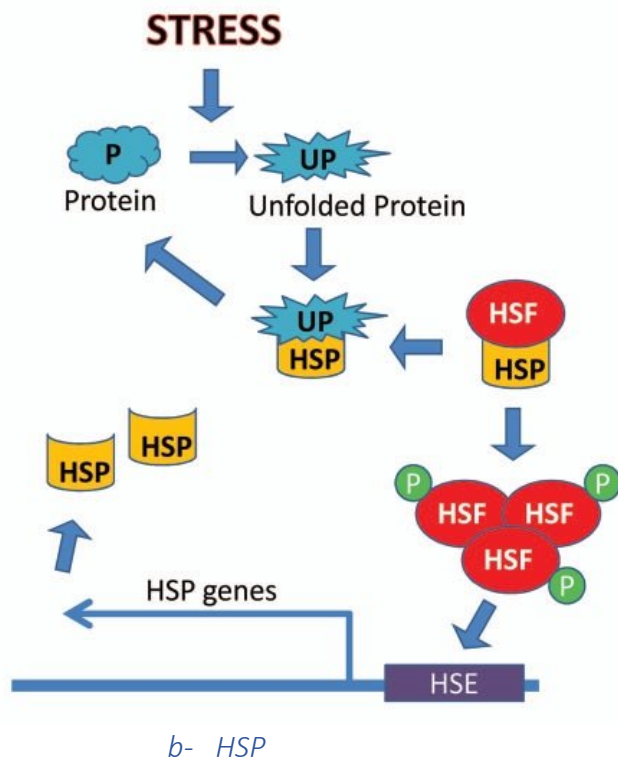
et HSF2, elle est constitutivement présente sous forme de trimère lié à l'ADN. Tout comme pour HSF2, l'activité de HSF4 est dépendante de sa concentration dans la cellule. Il existe deux formes de HSF4 : HSF4 $\alpha$  et HSF4 $\beta$  (Tanabe et al, 1999). HSF4 $\alpha$  est un répresseur de la transcription et HSF4 $\beta$  est impliqué dans la régulation de gènes du développement (Björk & Sistonen, 2010; Pirkkala et al, 2001). HSF4 permet également une plus grande adhésion de HSF1 sur ses promoteurs via un processus de déméthylation (Fujimoto et al, 2008).

Ces différentes isoformes sont composées de manière similaire (Figure 15) et sont conservées au cours de l'évolution (Pirkkala et al, 2001). En N-terminal de la protéine se trouve le domaine DBD (DNA binding domain, domaine de liaison à l'ADN), une structure hélice-boucle-hélice (Harrison et al, 1994; Vuister et al, 1994). Comme son nom l'indique, ce site permet la fixation de la protéine à l'ADN. C'est aussi le site utilisé pour l'oligomérisation (Lu et al, 2009; Takemori et al, 2009) et la régulation de l'activité transcriptionnelle (Yamamoto et al, 2009). Ce premier domaine est suivi par 80 acides aminés formant 3 séquences hydrophobes permettant la trimérisation de HSF (HR-A/B)(Sorger & Nelson, 1989). Ces séquences hydrophobes entrent en interaction avec un troisième domaine (absent de HSF4) qui inhibe ainsi la trimérisation (HR-C)(Green et al, 1995; Høj & Jakobsen, 1994; Nieto-Sotelo et al, 1990).



**Figure 15** – Représentation de la structure des différentes isoformes de la protéine HSF avec le nom de l'isoforme à gauche, et le numéro de chaque acide aminé bordant les séquences d'intérêts colorées. En jaune, le domaine de liaison à l'ADN de HSF. En bleu les répétitions hydrophobes impliquées dans l'oligomérisation de HSF. En cyan, les répétitions hydrophobes non impliquées dans l'oligomérisation de HSF. En rouge, les régions spécifiques à chaque isoforme. Figure tirée de Lanneau, 2010 et inspirée de l'article de (Pirkkala et al, 2001).

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons plus particulièrement nous intéresser à HSF1. L'activation de HSF1 nécessite trois étapes qui sont la trimérisation de HSF, puis la translocation dans le noyau de la cellule, et enfin la liaison du trimère à l'ADN. L'activité transcriptionnelle de HSF1 peut être régulée par phosphorylation, SUMOylation ou acétylation. HSF1 est principalement cytoplasmique en dehors des situations de stress. Dans le cytoplasme, HSF1 est complexée à des protéines chaperonnes telles que HSP70 et HSP90. Du fait de cette interaction, les domaines de trimérisations de HSF1 sont masqués, et HSF1 est ainsi retenue dans le cytoplasme sous la forme de monomères inactifs (Conde et al, 2009; Voellmy, 2006; Voellmy & Boellmann, 2007). Lors d'un stress, HSP se lie aux protéines dont la structure a été altérée, laissant les monomères de HSF1 libres de se trimériser. Lorsqu'elle est trimérisée, HSF1 migre dans le noyau et se lie à l'ADN sur les séquences HSE. Cette fixation n'entraîne pas l'activité transcriptionnelle de HSF (Jakobsen & Pelham, 1988; Sorger & Pelham, 1988; Jurivich et al, 1992; Lee et al, 1995). Pour que l'activité transcriptionnelle de HSF soit effective et puisse augmenter la production de HSP, une modification post-traductionnelle de HSF est nécessaire. Il existe une trentaine de modifications post-traductionnelles répertoriées (Westerheide et al, 2009; Wang et al, 2006; Xu et al, 2012; Soncin et al, 2003; Calderwood et al, 2010; Lee et al, 2008; Holmberg et al, 2001; Guettouche et al, 2005; Hietakangas et al, 2006; Kline & Morimoto, 1997; Chu et al, 1998; Murshid et al, 2010; Zhang et al, 2011; Boellmann et al, 2004; Chou et al, 2012). Parmi les modifications les plus importantes, la phosphorylation sur la serine 230 de HSF1 augmente l'activité transcriptionnelle, tandis qu'une phosphorylation des serines 303 et 307 régule négativement cette activité (Voellmy, 2006). La SUMOylation quant à elle diminue l'activité transcriptionnelle de HSF1 (Brunet Simioni et al, 2009). La désacétylation de HSF1 par la protéine SIRT1 favorise le maintien de HSF1 sur le promoteur de HSP70 (Westerheide et al, 2009). Différentes modifications post-traductionnelles permettent donc une régulation précise de la production de HSP par HSF. Enfin lorsque la quantité de HSP devient trop importante, la protéine interagit de nouveau avec HSF1 ce qui a pour effet de séparer les trimères HSF en monomères au travers d'une boucle de rétrocontrôle négatif (Voellmy, 2006)(Figure 16).



**Figure 16** - Activation des protéines HSF et HSP par un stress provoquant le mauvais repliement de Protéines. HSP qui est normalement liée à HSF vient alors se lier à la protéine mal repliée. Les monomères de HSF sont alors libres de se trimériser et de se fixer à la séquence HSE en amont du gène de régulation de HSP. Cette fixation a pour effet une augmentation de l'expression du gène HSP et donc de la production de protéines HSP. Figure issue de l'article de Krivoruchko & Storey, 2010.

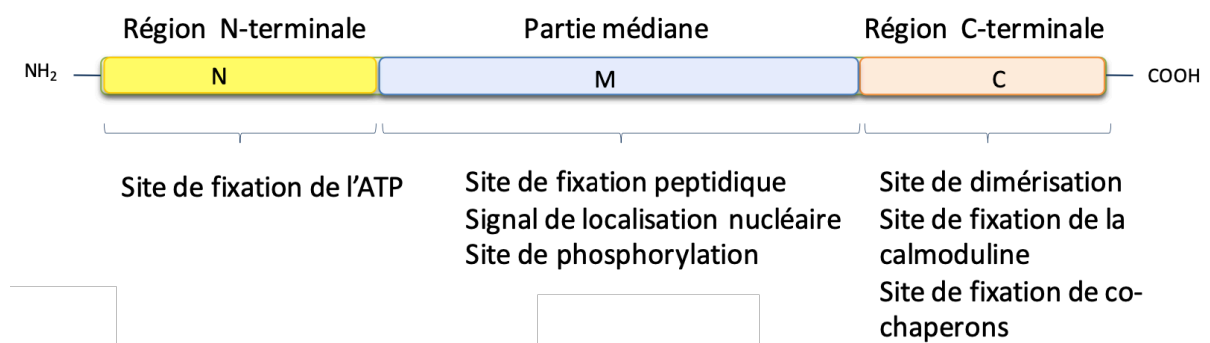
*b- HSP*

Comme indiqué dans la partie précédente, HSF1 induit la production de HSP en se liant à la séquence HSE. Il existe 6 familles de HSP chez les mammifères. Les protéines HSP sont classées suivant leurs poids moléculaires (le numéro de la HSP indiquant le poids de la protéine en kDa). On peut ainsi faire la distinction entre HSP110, HSP90, HSP70, HSP47 et les autres qui sont appelées les petites HSP (small HSP, sHSP). Chaque HSP détient des particularités tant par rapport à sa localisation, son mode d'activation ou son niveau d'expression. Les principaux types de HSP sont HSP27, HSP70 et HSP90. Dans la suite de ce manuscrit nous utilisons HSP90 dont les principaux membres sont HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$ , GP96 et TRAP1. Plus précisément, nous avons donc utilisé la protéine HSP90 $\alpha$  (gène HSP90AA1).

Les protéines HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$  sont les membres principaux de la famille HSP90. Il s'agit de 2 isoformes présentant 86 % d'homologie et qui sont originaires de la duplication d'un gène unique (Gupta, 1995). La différence entre ces isoformes réside dans la composition en acides aminés de leurs régions C-terminales. Ces protéines sont indispensables pour la survie cellulaire. C'est également une des protéines les plus abondantes dans la cellule. En situation de stress, lors de son induction, elle peut représenter jusqu'à 1% des protéines (Csermely et al, 1998). L'expression des deux isoformes n'est pas la même. HSP90 $\alpha$  est induite par les stress externes et est minoritaire par rapport à HSP90  $\beta$  qui est présente de manière constitutive (Subbarao Sreedhar et al, 2004). La différence se joue également sur leur impact

sur le développement. HSP90  $\beta$  est présente à tous les stades de développements tandis que HSP90  $\alpha$  a été trouvée dans les hépatoblastes, les cellules germinales primordiales et l'épithélium durant le développement. Ces éléments tendent à démontrer que HSP90  $\beta$  est plutôt impliquée dans le développement tandis que HSP90  $\alpha$  est plutôt impliquée dans la réponse au stress (Voss et al, 2000).

Ces deux isoformes partagent cependant la même structure en 3 parties (Figure 17). Le premier domaine en N-terminal permet la fixation principale de l'ATP. Le second domaine permet la reconnaissance de la protéine mal repliée qui sera prise en charge par HSP. Le troisième domaine en C-terminal permet la dimérisation. Ce troisième domaine contient également la fixation d'un second site de fixation de l'ATP si le site N-terminal n'est pas disponible (Söti et al, 2002).



**Figure 17** – Représentation de la structure de HSP90 et de ses 3 domaines. Figure issue de Lanneau, 2010.

Pour être actif, HSP90 doit être dimérisée (Minami et al, 1994). Ces dimères peuvent être  $\alpha$ - $\beta$ , mais ils seront principalement  $\alpha$ - $\alpha$  ou  $\beta$ - $\beta$ . Ce n'est que suite à cette dimérisation que HSP90 peut s'associer aux protéines mal formées et entamer le processus de repliement (Pratt & Toft, 2003). HSP90 peut ainsi replier de très nombreuses protéines, mais a une implication particulière dans le repliement de deux classes de protéines que sont les protéines kinases (Csermely et al, 1998; Sato et al, 2000) et les facteurs de transcription (Picard et al, 1990). Cette protéine permet également la stabilisation du cytosquelette via une interaction à l'actine et la tubuline. Ces interactions permettent de conserver les transports cytoplasmiques et l'intégrité de la cellule même lors de stress (Czar et al, 1996; Pratt, 1992). HSP90 piège les protéines mal repliées entre les deux monomères, induisant un changement de conformation. Puis une molécule d'ATP va être hydrolysée induisant un second

changement de conformation qui stabilisera la protéine piégée (Pearl & Prodromou, 2006). La liaison de HSP90 aux protéines mal repliées est ainsi régulée par l'ATP.

HSP90 est une protéine chaperonne dont l'activité dépend de protéines co-chaperonnes. Le domaine EEVD C-terminal est reconnu par des domaines TTR (Tetratricopeptide Repeat) de co-chaperonnes permettant cette interaction (Pearl & Prodromou, 2006; Wandinger et al, 2008). HSP90 peut également subir des modifications post-traductionnelles comme la S-Nitrosylation, l'acétylation et la phosphorylation (Bali et al, 2005; Murphy et al, 2005; Kovacs et al, 2005; Martínez-Ruiz et al, 2005).

### C- SUMOylation de PML

Les deux précédents chapitres concernent HSF et la voie MAP kinase. Il s'agit de deux voies de signalisation du stress cellulaire très étudiées en bioélectromagnétisme. À l'inverse, aucune étude de bioélectromagnétisme ne concerne PML. Pourtant l'activité de cette protéine peut être vue comme intégratrice de stress. PML est intimement liée aux précédentes voies de stress décrites dans ce manuscrit. Par exemple, il est connu que ERK1 et ERK2 sont activées à de fortes concentrations d'arsenic suite à l'activation de PML par phosphorylation, induisant la SUMOylation de PML (Hayakawa & Privalsky, 2004). Dans le sens inverse, on peut citer l'exemple de PML-II qui a la capacité d'augmenter l'activité de ERK (Meng *et al*, 2021a). Cette protéine est également en lien avec HSF. Des études ont par exemple montré que HSF pouvait être présente dans les corps nucléaires formés par PML (Goodson et al, 2001; Alastalo et al, 2003; Åkerfelt et al, 2010; Hong et al, 2001).

La SUMOylation de PML est modulée par la voie MAPK (Tessier et al, 2017; Hsu et al, 2016) et par HSF1 (Zhang et al, 2001). Cette capacité à être modulée par les différentes voies de stress fait de PML un intégrateur de stress cellulaire. Ainsi, en détectant une modulation de l'activité de PML, nous pourrions conclure soit à l'activation directe de PML par un stress, soit à la modulation d'une des voies de signalisation de stress endogène.

### *α*- PML

Le gène *PML* est un gène suppresseur de tumeur de 53 kpb en position 15q22 du chromosome 15. Il encode la protéine ubiquitaire PML (Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2010), qui est majoritairement distribué au niveau du noyau de la cellule (Wang et al, 1998).

La protéine PML est présente dans le nucléoplasme de manière diffuse ou bien associée à la matrice nucléaire, où elle engendre la formation des corps nucléaires (CN)(Jeanne et al, 2010, ; Sahin et al, 2014c). PML est la protéine d'échafaudage des CN, et est donc indispensable pour le recrutement des protéines partenaires sur les CN (Maul et al, 2000). Les CN sont des complexes protéiques insolubles. Leur taille (de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$ ) et leur quantité (de 5 à 30 par cellule) dépendent du type cellulaire, de l'étape du cycle cellulaire et des stress subits par la cellule (Ascoli & Maul, 1991; Maul et al, 1995). Leur distribution dépend aussi de ces mêmes conditions (Maul et al, 1995; Dellaire & Bazett-Jones, 2004; Ascoli & Maul, 1991). Lors d'une infection ou d'une inflammation, l'expression de PML augmente sous l'effet des interférons (INF) et du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ). Elle est également régulée par p53 (protéine suppresseur de tumeur) et K-RAS (protéine pro-oncogène)(Scaglioni et al, 2012).

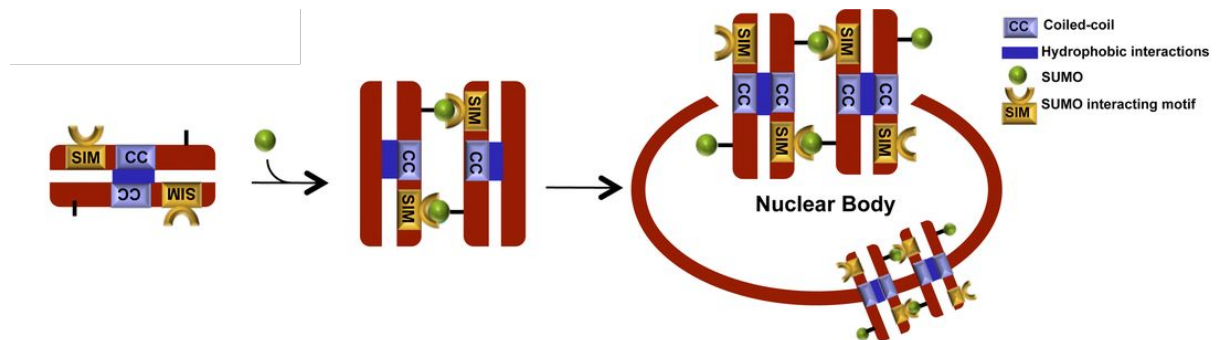
Une fois que PML a formé les CN, ces derniers interviennent dans une grande variété de processus biologiques (Pearson et al, 2000; Dellaire & Bazett-Jones, 2004; Bernardi et al, 2008; Kriehoff-Henning & Hofmann, 2008; Everett & Chelbi-Alix, 2007; Ito et al, 2008). Ils comprennent :

- La réaction antivirale (Bonilla et al, 2002; Blondel et al, 2002; Iki et al, 2005; Masroori et al, 2016),
- L'apoptose (Sahin et al, 2014b; Pearson et al, 2000; de Thé et al, 2012),
- La réparation de l'ADN (Dellaire et al, 2006; Dellaire & Bazett-Jones, 2004; Voisset et al, 2018; di Masi et al, 2016),
- Le renouvellement cellulaire (Chuang et al, 2011; Chang et al, 2013),
- La transcription (Khan et al, 2001; Bernardi & Pandolfi, 2007; Huang et al, 2014; Delbarre et al, 2017),
- Le métabolisme (Carracedo et al, 2015; Niwa-Kawakita et al, 2017).

Cette polyvalence des CN est expliquée par le grand nombre de protéines pouvant être recrutées par ces mêmes CN. Les protéines pouvant être recrutées peuvent être des protéines de réparation de l'ADN (Bischof et al, 2001; Grobelny et al, 2000), de régulation de la transcription et de la réponse immunitaire (Stepp et al, 2013; Newhart et al, 2013; Xu & Roizman, 2017), et de régulation de protéines pro-apoptotiques (Bernardi & Pandolfi, 2007; Ivanschitz et al, 2015; Salsman et al, 2017). Cette implication dans des processus biologiques

si variés s'explique par le fait que les CN constituent des plateformes d'interaction pour des protéines impliquées dans les différents processus cités (Bernardi & Pandolfi, 2007; Sahin et al, 2014b; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2010; Guo et al, 2014).

La formation des CN comprend 2 étapes. D'abord, la formation de dimères de PML liés par leurs domaines CC. La seconde étape est la multimérisation des dimères de PML par SUMOylation via les domaines SIM (sumo interacting motif) de PML (Sahin et al, 2014a). Celle-ci continue jusqu'à la formation des CN, qui est représentée dans la Figure 18.



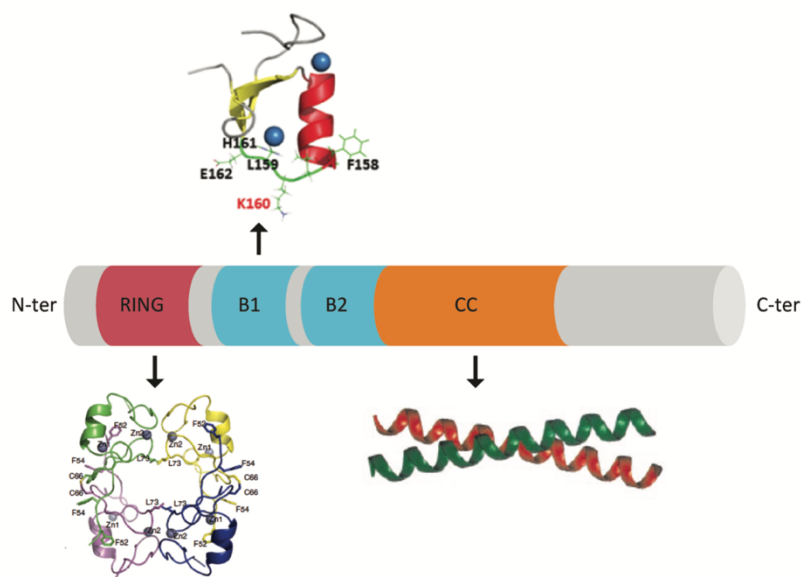
**Figure 18** – Représentation schématique du modèle actuel, dans lequel la biogenèse du NB repose sur des interactions intermoléculaires non covalentes entre SUMO et PML, et entre SUMO et SIM. D'après (Sahin et al, 2014a).

Les gènes régulant PML a dans son promoteur un élément ISRE (Interferon Stimulated Response Element) et une séquence GAS (Gamma interferon Activation Sites). Il s'agit d'éléments de réponse sensibles aux INF, cytokines antiprolifératives et antivirales (Stadler et al, 1995). Les INF se fixent à leurs récepteurs, entraînant une phosphorylation des STAT (Signal Transducer an Activator of Transcription) par les protéines JAK (Janus Kinase). Les STAT interagissent avec les IRF (Interferon- induced regulatory factors) et se lient aux ISRE pour permettre l'expression des gènes tels que PML. Cela explique l'augmentation de l'expression de PML lors d'infections virales et lors d'évènements inflammatoires (Terris et al, 1995 ; Lavau et al, 1995). Cela a pour effet une augmentation de la taille et de la quantité des CN dans le noyau (Chelbi-Alix et al, 1995). Une accumulation de PML est également induite par le TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire (Cheng et al, 2012; Hsu et al, 2016). On a enfin noté qu'une surexpression de p53 entraînait une augmentation de l'expression de PML de même qu'une sénescence de la cellule (de Stanchina et al, 2004).

Au niveau structural, PML est une protéine de la famille RBCC (RING finger, B-box, Coiled-Coil) ou TRIM (TRI-partite Motif)(Figure 19). Les protéines TRIM sont impliquées dans



la régulation de la différenciation, du développement cellulaire, de la progression du cycle et de l'apoptose (Micale et al, 2012).



**Figure 19** – Représentation des différentes structures présentes chez les protéines PML, dont le domaine RING (Wang et al, 2018), de la boîte B1 (Huang et al, 2014), et du domaine coiled-coil (CC) (Jensen et al, 2001).

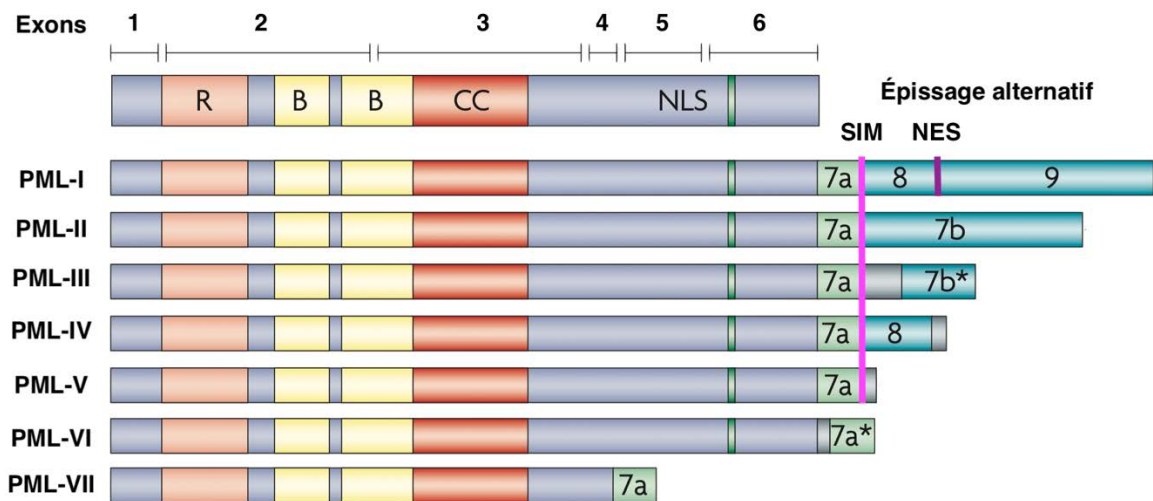
Les protéines TRIM ont un domaine RING (Really Interesting New Gene) à leur extrémité N-terminale, suivi de 2 boîtes B contenant des domaines à doigts de zinc riches en cystéines et en histidines, et d'un domaine CC (coiled-coiled) constitué de 4 hélices alpha servant à la multimérisation (Bernardi & Pandolfi, 2007; Nisole et al, 2005; Jensen et al, 2001; Borden et al, 1998). L'ensemble de ces domaines (RING, B et CC) sont impliqués dans la formation des CN PML (Kastner et al, 1992). Il a été démontré que le domaine RING permet la tétramérisation de PML, qui est une étape cruciale dans la formation des CN (Wang et al, 2018). Une autre importance de RING est que ce domaine peut interagir avec l'enzyme E2 de SUMO (UBC9), permettant sa SUMOylation (Duprez et al, 1999) (voir chapitre b-SUMOylation). Cette SUMOylation est encore plus importante lorsque PML est tétramérisé (Wang et al, 2018).

Il existe sept isoformes de PML issues de neuf exons dans le gène de PML (Condemine et al, 2006; Bernardi & Pandolfi, 2007). Toutes les isoformes contiennent un motif RBCC dans leur partie N-terminale (exon 1 à 4). En revanche, elles se différencient par leur partie C-terminale (exons 5 à 9). La variabilité de la partie C-terminale permet à PML de se lier avec différentes protéines partenaires, déterminant la fonction de l'isoforme de PML étudiée (Jensen et al, 2001; Ivanschitz et al, 2015). Des séquences C-terminales variables dans les isoformes PML pourraient créer différentes interfaces de liaison et spécificités fonctionnelles.

Ceci a en effet été décrit pour certaines isoformes :

- PML-IV induit une sénescence prématurée par liaison à p53 (Bischof et al, 2002; Fogal et al, 2000), favorise la déstabilisation de Myc et la différenciation cellulaire (Buschbeck et al, 2007) et induit la transcription médiée par PU.1 (Yoshida et al, 2007);
- PML-I se lie au facteur de transcription AML1 pour améliorer la transcription induite par AML1 (Nguyen et al, 2005) ;
- PML-III interagit avec le centrosome (Xu et al, 2005) ;
- Une isoforme cytoplasmique de PML (PML-VII) régule la signalisation du facteur de croissance TGF- $\beta$  (Lin et al, 2004).

Les exons 6 à 9 contiennent les sites NES (Nuclear Export Signal) et NLS (Nuclear Localization Signal). Ces sites sont impliqués dans la distribution de PML dans la cellule. Les isoformes I à VI sont localisées dans le noyau, cependant l'isoforme VII est cytoplasmique du fait de son absence de NLS. Le site NES n'est présent que sur l'isoforme 1, ce qui lui permet de transiter entre noyau et cytoplasme (Condemine et al, 2007)(Figure 20). La proportion entre les différentes isoformes semble rester la même entre les différentes cellules, bien que certaines isoformes soient plus présentes que d'autres (Condemine et al, 2006; Beech et al, 2005).



**Figure 20** - Schéma représentant les différents isoformes de PML. R est le domaine RING, B les boîtes 1 et 2, CC les somaines coiled-coil, SIM les domaines d'interaction avec la protéine SUMO. NES est le domaine d'export nucléaire spécifique de PML-I et lui permettant d'être à la fois nucléaire et cytoplasmique. NLS les domaines de localisation nucléaire absent de PML-VII expliquant sa présence uniquement cytoplasmique. PML-II -III -IV -V et -VI ayant un domaine NLS et pas de domaine NES, ils sont uniquement nucléaires. Image issue de l'article de Bernardi & Pandolfi, 2007.

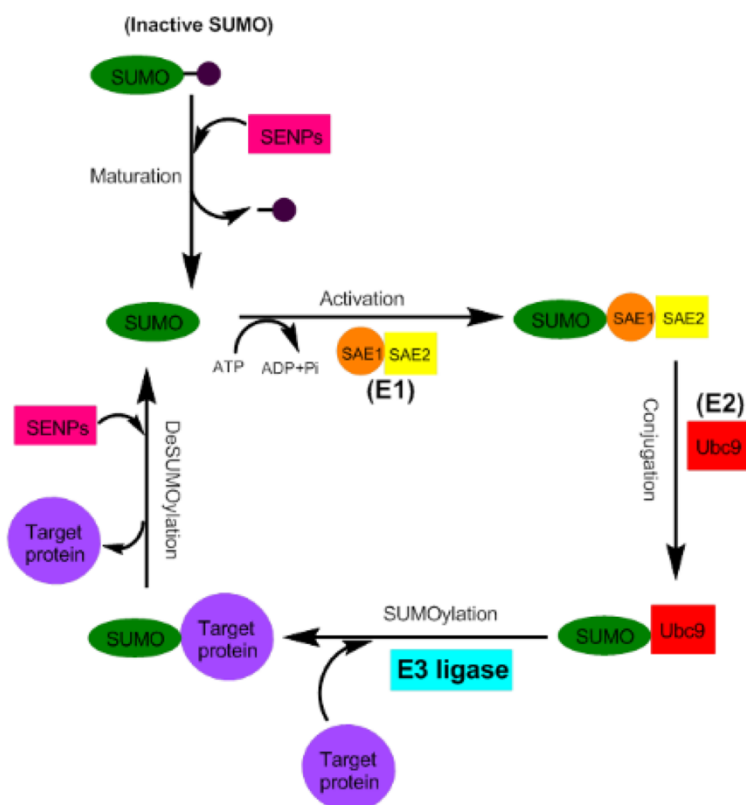
Les protéines PML subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité, la stabilité et les interactions de PML avec des protéines partenaires (Cheng & Kao, 2012; Hsu & Kao, 2018). Les modifications post-traductionnelles les plus étudiées sont la SUMOylation et la phosphorylation (Bernardi et al, 2004; Yang et al, 2002; Gresko et al, 2009; Hofmann et al, 2002; Hayakawa & Privalsky, 2004; Yuan et al, 2011; Scaglioni et al, 2006; Stehmeier & Muller, 2009), mais PML peut également subir une ubiquitinylation (Louria-Hayon et al, 2009; Weisshaar et al, 2008; Tatham et al, 2008; Lallemand-Breitenbach et al, 2008), une acétylation (Hayakawa et al, 2008; Campagna et al, 2011) ou une ISGylation (Interferon-Stimulated Gene)(Yuan & Krug, 2001; Guo et al, 2010). Dans ce travail de doctorat, nous nous sommes intéressés à la SUMOylation de PML. Nous allons donc nous concentrer sur ce mécanisme d'action qui peut servir de marqueur de l'activation de PML.

#### *b- SUMOylation*

La SUMOylation consiste en la liaison covalente d'une protéine SUMO sur une ou plusieurs lysines de la protéine cible. La SUMOylation ayant lieu sur un motif consensus, plus de 3 000 protéines différentes ont été identifiées comme susceptibles d'être modifiées de la sorte (Hendriks & Vertegaal, 2016). La protéine SUMO est conservée chez les eucaryotes comme chez les plantes (Johnson, 2004). Les protéines SUMO sont classées comme des ubiquitin-like car elles sont structurellement similaires à l'ubiquitine (Bayer et al, 1998). Comme l'ubiquitine, SUMO peut former des chaînes (Vertegaal, 2010). Il existe 5 types de protéines SUMO chez les mammifères. La séquence de SUMO1 est identique à 50 % avec celles de SUMO 2 et 3. Les protéines SUMO 2 et 3 sont appelées 2/3 puisque seulement 3 acides aminés les différencient (Müller et al, 2001). SUMO4 est spécifique de certains organes comme la rate, le rein ou les ganglions lymphatiques (Guo et al, 2004; Bohren et al, 2004). Enfin, SUMO5 a été identifié comme facilitant la formation des CN (Liang et al, 2016).

La SUMOylation suit un processus similaire à celui de l'ubiquitinylation, suivant trois grandes étapes et permettant la liaison de SUMO aux lysines de la protéine cible. Les trois étapes de la SUMOylation sont la maturation, puis l'activation de la protéine SUMO, et enfin une étape de transfert et de conjugaison sur une protéine partenaire. Chacune de ces étapes est permise par des enzymes annotées E1 à E3 suivant l'étape à laquelle elles interviennent dans le processus de SUMOylation (Figure 18). La première étape, la maturation, consiste en

l'activation du précurseur de SUMO encore inactif. Il s'agit d'une étape où les protéines SENP (SENtrin-specific Protease) vont hydrolyser le précurseur de SUMO libérant un motif di-glycine en C-terminal de la protéine. La seconde étape est l'étape d'activation. Celle-ci est dépendante de l'ATP et va créer un lien thioester entre SUMO et l'enzyme E1. L'enzyme E1 est un hétérodimère constitué de SAE1 et SAE2 (Gareau & Lima, 2010). Dans la troisième et dernière étape, une réaction de trans-thioestérification de la cystéine de SAE2 permet le transfert de SUMO à l'enzyme E2 (UBC9). Cette enzyme transfère SUMO sur la lysine d'un substrat durant l'étape de conjugaison. Des enzymes E3 SUMO ligases stabilisent le lien UBC9-substrat (Seeler & Dejean, 2003; Johnson, 2004) et aident au transfert de SUMO sur son substrat (Streich & Lima, 2014). Dans tout ce processus, une seule enzyme E2 catalyse la conjugaison de SUMO aux substrats. C'est un point de différence avec l'ubiquitinylation où plus de 50 enzymes E2 existent (Middleton et al, 2017). La SUMOylation a pour effet de modifier les capacités d'interaction de la protéine liée (Johnson, 2004). Cependant la liaison à la protéine SUMO est réversible grâce à l'enzyme SENP (Figure 21).



**Figure 21** - Schéma de la voie SUMOylation. Le précurseur de SUMO est mûri par SENP. Cette forme a un motif di-glycine C-terminal. SUMO est ensuite activée par l'enzyme E1, un hétérodimère de Aos1 et Uba2. SUMO activé est passé au site actif de l'enzyme de conjugaison E2, Ubc9. Enfin, SUMO est transféré avec la ligase E3 à la protéine cible. La désSUMOylation du substrat est causée par les protéases de la famille SENP. Figure issue de l'article de Dehnavi et al, 2019.

La SUMOylation de PML concerne principalement SUMO1, 2, et 3 (Kamitani et al, 1998; Muller, 1998; Duprez et al, 1999). Les protéines SUMO régulent PML lors de différents types de stress. Ces stress peuvent être liés à une réponse de l'organisme comme la production d'interférons par exemple (Sahin et al, 2014c). Ils peuvent également être provoqués de manière exogène via la mise en contact avec de l'arsenic (Muller, 1998; Sahin et al, 2014a). L'arsenic provoque une augmentation de ROS dans la cellule. Ces ROS forment des ponts disulfures entre les différentes protéines PML, ce qui augmente la quantité de CN (Jeanne et al, 2010). Cependant le trioxyde d'arsenic peut également se lier directement aux cystéines de la boîte B2 (domaine RBCC) de PML (Jeanne et al, 2010; Zhang et al, 2010), entraînant des modifications de conformation de PML. L'effet du trioxyde d'arsenic est donc double. Le premier est un effet d'activation par augmentation des ROS de la cellule et le second par liaison directe avec PML.

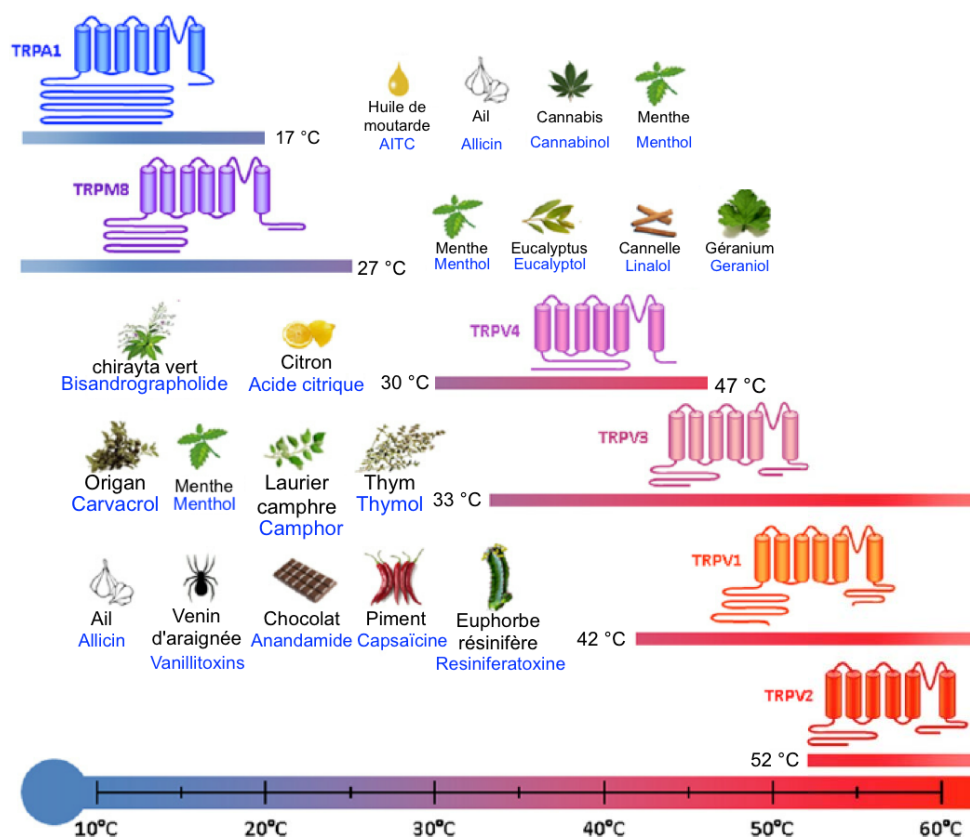
#### D- Canaux TRP

Percevoir ce qui nous entoure est une condition indispensable à la survie de n'importe quelle espèce animale. Pour ce faire, des récepteurs sensoriels sont exprimés par nos cellules. Il s'agit notamment de canaux ioniques qui, lors de leur activation, vont provoquer un influx d'ions dans la cellule. Cet événement va provoquer l'influx nerveux et la réponse appropriée au niveau de l'organisme.

Parmi tous les récepteurs sensoriels de notre corps, les canaux TRP (Transient Receptor Potentiel) sont remarquables. Il s'agit d'une famille de canaux omniprésents dans les organismes. Cette famille de canaux est capitale pour la survie, car ils nous permettent de ressentir une très grande variété de stimuli. Ils sont sensibles à la température (physiologique et nocive), à des agents chimiques (comme la capsaïcine, principe actif du piment), mais également à la pression sous toutes ses formes (que ce soit la tension d'un vaisseau ou l'osmolarité d'une cellule), et au pH (Moran *et al*, 2011; Nieto-Posadas *et al*, 2011). Chaque canal TRP a ses propres limites et facteurs d'activation qui le caractérise. Pourtant ils sont tous construits de manière similaire. Ce sont des canaux cationiques avec une perméabilité calcium/sodium ( $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}}$ ) allant de 0,3 à 10 (Vassort & Fauconnier, 2008).

Les canaux « thermo-TRP » (Figure 22) sont des canaux TRP sensibles à la température, en plus d'autres facteurs. Sous l'effet de facteurs physiques (comme la température ou de présence de ligands), la conformation des canaux thermo-TRP est modifiée, entraînant

l'ouverture du canal, le passage de cations dans le cytoplasme et l'interaction subséquente des sous-unités du canal avec des protéines régulatrices, comme la Calmoduline (CaM (Hasan *et al*, 2017)).



**Figure 22** - Structure de différents canaux thermo-TRP avec les plages de sensibilité à la température et des exemples d'agonistes entraînant leur activation. Tous les canaux TRP sont associés en tétramères, chaque monomère contenant six domaines transmembranaires (Diaz-Franulic *et al*, 2016). Les domaines N- et C-terminaux sont intracellulaires et sont connus pour être impliqués dans la régulation de ces canaux. D'après (Belvisi *et al*, 2011).

Les canaux TRP sont actifs sous forme tétramérique (homotétramère ou hétérotétramère de TRP suivant les conditions). Chaque monomère de TRP est lui-même constitué de 6 segments transmembranaires (TM), les segments 5 à 6 formants le pore dans la structure tétramérique finale (le segment 1 faisant suite à l'extrémité N terminale, et le segment 6 précédant l'extrémité C terminale). Les extrémités de ces monomères sont situées dans la cellule. Ces extrémités sont uniques pour chaque type de TRP et contribuent grandement à leur singularité.

L'extrémité C-terminale plus particulièrement contient la TRP box, un court tronçon hydrophobe conservé dans les sous-familles TRPC, TRPV et TRPM (Montell, 2001). Ce domaine TRP commence par une séquence consensus hydrophobe de 5 acides aminés «WKFAR» et se

termine par une région riche en proline (Phelps & Gaudet, 2007; Kraft & Harteneck, 2005). Ce domaine sert, entre autres, à la liaison du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates (PIP<sub>2</sub>), qui un lipide régulateur impliqué dans la régulation de beaucoup de canaux TRP (Brauchi et al, 2007). Un autre élément régulateur très présent chez les canaux TRP est le domaine de liaison à la calmoduline (CaM). La CaM est une petite protéine extrêmement conservée dans le règne du vivant avec des domaines en épingle à cheveux qui vont se complexer avec le calcium. En se liant à la fois au canal et au calcium, la CaM va moduler l'activité des canaux TRP en entraînant leur désensibilisation (Chaudhury et al, 2011; Rosenbaum et al, 2004). Sur la partie N-terminale du canal on retrouve des domaines de liaison à l'ankyrine. Chaque sous-famille de TRP a un nombre défini de domaines de liaison à l'ankyrine, pouvant aller de 4 domaines pour certains TRPV à 29 pour d'autres TRPN. Les ankyrines sont des protéines du cytosquelette qui interagissent avec les protéines membranaires intégrales via des liaisons dynamiques non covalentes. Elles aident à déterminer leur distribution dans la membrane cellulaire. Dans les érythrocytes par exemple, la spectrine se lie à la membrane cellulaire via l'ankyrine (Bennett & Stenbuck, 1979). Les domaines de liaison à l'ankyrine permettent aux canaux TRP d'interagir avec le cytosquelette de la cellule, ce qui pourrait être une explication de la mécanosensibilité de certains canaux TRP (Gaudet, 2008).

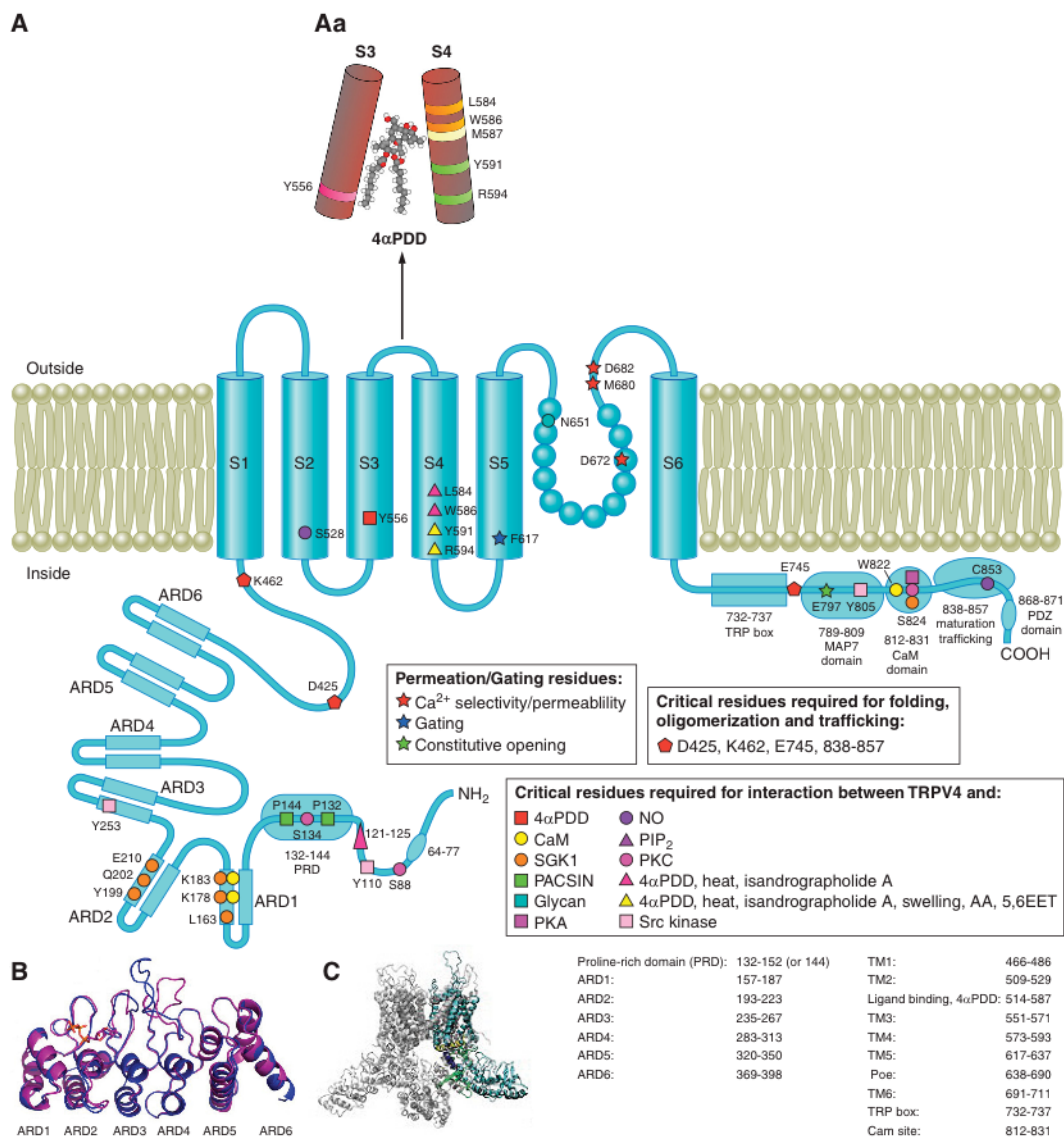
Malgré leurs différences, tous les canaux TRP permettent l'entrée de cations dans la cellule entraînant ainsi une réponse physiologique de la cellule. Cette réponse peut aller de l'apoptose de certaines cellules, à la dépolarisation membranaire qui donnera naissance à un potentiel d'action et à un message nerveux. Les canaux TRP ont également un rôle dans la prolifération cellulaire, mais aussi dans le bon fonctionnement des systèmes cardiovasculaires ou encore urinaires. Cependant, leurs différences les places dans différentes sous-familles suivant leur homologie de séquence d'acides aminés. Ce mode de classement est donc indépendant de leur perméabilité ou des facteurs permettant leur ouverture.

#### *α- TRPV4*

Le récepteur transitoire sensible au potentiel vanilloïde de type 4, ou TRPV4 (Transient receptor potential vanilloid type 4) est un canal cationique non sélectif, notamment perméable au calcium. Il est composé de 871 acides aminés pour un poids d'environ 96 kDa. Comme tous les canaux TRP, il se compose de 6 segments transmembranaires par monomère,



le pore se situant entre les segments 5 et 6, et ses extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires (Figure 23). Il est assemblé sous forme tétramérique. Ce canal est communément un homotétramère, même si des hétérotétramères peuvent se former avec d'autres monomères de la famille des TRP.



**Figure 23** - Représentation d'un monomère de TRPV4. En A, la structure du monomère avec ses 6 segments transmembranaires (S ou TM1 à 6, avec les acides aminés associés à chacun en bas à droite). Aa est le site de liaison du 4 alpha PDD, agoniste spécifique de TRPV4 illustré entre les segments transmembranaires 3 et 4. La liaison de cette molécule à ces segments se fait par les Leu584, Trp586 et Tyr556. La Met587 participe également mais de manière indirecte. Les Tyr 591 et Arg594 du segment 4 (partie carboxy-terminale) sont impliqués dans le mécanisme d'ouverture du canal (Vriens et al, 2004). En B, la représentation structurale en ruban des domaines répété d'ankyrine, sans ATP en bleu, et avec liaison à l'ATP en violet, l'ATP étant représenté en bâtonnets orange (Janssen et al, 2011). En C, la structure de l'homotétramère de TRPV4 avec un monomère représenté en cyan, sa partie N-terminal avant le premier domaine TM est en bleu foncé, avec les domaines répétés de site de liaisons à l'ankyrine en vert. La partie C-terminale qui suit le dernier segment transmembranaire est représenté



en jaune (Garcia-Elias et al, 2015). La figure en elle-même est empruntée à la revue de White et al. (White et al, 2016)

Ce canal nous permet de ressentir les températures ambiantes normales, avec une activation à des températures supérieures à 27°C. Certaines études trouvent cependant des températures d'activation à environ 34°C dans les cellules HEK293T (Güler et al, 2002).

Il a été démontré que les souris n'exprimant pas TRPV4 avaient des réponses réduites aux variations d'osmolarité (Liedtke & Friedman, 2003). Elles buvaient moins d'eau et tendaient vers l'hyperosmolarité. Ce canal est également impliqué dans l'hyperalgésie, il a un rôle physiologique dans la médiation de sensations de douleurs mécaniques et inflammatoires (Zhao et al, 2015, 2014b; Denadai-Souza et al, 2012; Chen et al, 2013, 2014b; Alessandri-Haber et al, 2003, 2006). Ce canal est activé par des pH acides (Suzuki et al, 2003a), par le PLA2 issu de l'acide arachidonique, par l'inflammation, par les dérivés de phorbol comme le 4 alpha PDD et le PMA (Zhan et al, 2015), et modulé par la phosphorylation (Wegierski et al, 2009; Shin et al, 2012), les protéines kinase G (Ma et al, 2010; Takeda-Nakazawa et al, 2007), l'histamine (Ducret et al, 2008; Cenac et al, 2010), les UVB (Moore et al, 2013) et plusieurs molécules végétales comme les vanilloïdes (Peixoto-Neves et al, 2015) et les canabinoïdes (De Petrocellis et al, 2012). TRPV4 est capital pour la physiologie du corps humain, œuvrant non seulement dans le maintien du tonus vasculaire mais également pour le bon fonctionnement des cellules endothéliales (Si et al, 2006; Palmer et al, 1987; De Hert, 2012; Davids et al, 1986). Sa présence et son importance ont déjà été étudiées dans le système cardiaque (Adapala et al, 2013), le système respiratoire (McAlexander et al, 2014; Jia et al, 2004), le système urinaire (Liedtke & Friedman, 2003; Chen et al, 2015b; Mamenko et al, 2013; Birder et al, 2007), les muscles squelettiques (Ho et al, 2012), le système digestif (Ueda et al, 2011; Song et al, 2014), et les systèmes nerveux central (Vennekens et al, 2012; Nilius & Szallasi, 2015) et périphérique (Suzuki et al, 2003b, 2003a).

TRPV4 permet le maintien de l'homéostasie calcique de la cellule partout dans l'organisme (Hill-Eubanks et al, 2014 ; White et al, 2016). Par exemple, dans les vaisseaux sanguins où son activation par le cisaillement permet un influx de calcium dans la cellule endothéliale, et donc le maintien du tonus artériel et la production de facteurs antithrombotiques. En plus d'être responsable de sensations douloureuses dans certaines neuropathies, ce canal est à la source de plusieurs maladies, canalopathies et maladies

héréditaires. Ces maladies peuvent se traduire par différents facteurs tels que la brachyolmie (maladie osseuse caractérisée par un tronc court, une scoliose et une platyspondylie généralisée), des maladies neuromusculaires, comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2C (CMT 2C), des atrophies musculaires spinales (SMA) et des neuropathies motrices et sensorielles héréditaires de type 2 (HMSN 2C)(Dai et al, 2010; Nilius & Voets, 2013; Verma et al, 2010).

#### *b- TRPM8*

Le récepteur transitoire sensible au potentiel Mélastatine 8, aussi appelé TRPM8 (Transient Receptor Potential Melastatin member 8), est un canal ionique cationique non spécifique permettant l'entrée dans la cellule de  $Ca^{2+}$  et de  $Na^{+}$ . A l'inverse des TRPC et des TRPV, les protéines membres de la sous-famille des TRPM n'ont aucun motif ankyrine à leur extrémité N-terminale. Elles contiennent cependant des domaines de liaison particuliers en C-terminal qui permettent l'interaction avec d'autres protéines et qui sont spécifiques pour chaque sous-famille de TRPM (Jiang, 2007). La structure de l'extrémité C-terminale de TRPM8 est caractérisée (Yin et al, 2018). La partie précédant ce domaine C-terminal est indispensable pour la tétramérisation de la protéine (Phelps & Gaudet, 2007).

Cette protéine est un thermosenseur des températures froides modérées allant de 10 à 28°C (Pérez de Vega et al, 2016) et des pH faibles. Les canaux TRPM8 sont exprimés dans la prostate, les poumons, la vessie et dans certains neurones sensoriels où ils provoquent une dépolarisation en faisant entrer du  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Une expression élevée de TRPM8 dans les neurones sensoriels a pour effet une sensibilité augmentée lors d'une exposition à des températures froides normalement inoffensives (allodynie) et aux stimuli légèrement douloureux (hyperalgésie), survenant après une lésion nerveuse ou une inflammation. De même, une augmentation de la quantité de canaux TRPM8 peut être observée dans certains cancers de la prostate (Yamamura et al, 2008). Cependant l'activation de TRPM8 semble également corrélée à une baisse des douleurs aiguës et inflammatoires (Xing et al, 2007). TRPM8 pourrait donc être une cible pharmacologique intéressante, puisqu'outre son activation par les températures froides, ce thermorécepteur est sensible à des molécules chimiques. Ces molécules peuvent être des agonistes comme le menthol (Xu et al, 2020), les dérivés de pyrimidine (Pérez de Vega et al, 2016), certains dérivés hétérocycliques ou bien des antagonistes comme les N-Hétéroaryl-N-benzyl Sulfonamides, les dérivés de l'urée, les dérivés

de la phénylglycine, de la tryptamine et des amides tertiaires (Pérez de Vega et al, 2016). D'autres méthodes indirectes d'activations sont alors envisageables. On sait par exemple que TRPM8 est activable par le PI(4,5)P2, qui serait alors un ligand endogène (Liu & Rohacs, 2020). TRPM8, comme TRPV4 et TRPV1, est une cible pharmacologique importante.

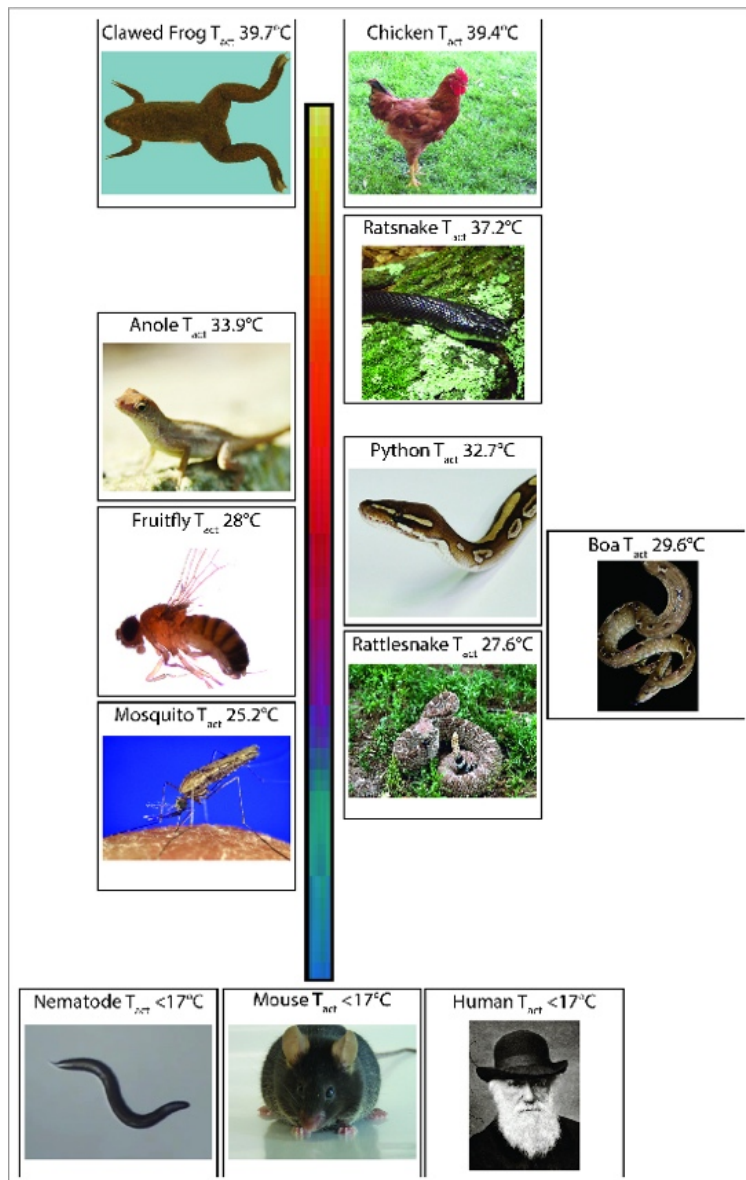
### *c- TRPA1*

Le récepteur transitoire sensible au potentiel Ankyrine 1 (Transient Receptor Potential Ankyrin member 1), ou TRPA1, est un canal ionique cationique non spécifique et le seul membre connu de la sous-famille des TRPA. Comme la plupart des canaux TRP, il laisse passer les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  lors de son ouverture (Christensen et al, 2016; Paulsen et al, 2015). Composé de six segments transmembranaires par monomère, ce canal a la particularité de posséder une queue N-terminale contenant seize répétitions du site de liaison à l'ankyrine (Mosavi et al, 2002). Cette longue région N-terminale est constituée de beaucoup de résidus cystéines, ce qui permet au canal de faire des liaisons dissulfides dans le monomère mais aussi avec les monomères environnants.

Ce canal est un nocicepteur chimique, activable par certains produits ou par une température inférieure à  $17^\circ\text{C}$  (Castillo et al, 2018). Il a été montré que TRPA1 peut amplifier l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par TRPV1 à des températures normales et le sensibiliser de manière dépendante au calcium (Hoffmann et al, 2013). Cela fait donc de ce canal un modulateur essentiel dans la sensibilité à la température. Il est également impliqué dans la sensation mécanique et peut donc être activé par pression. Ce canal est aussi impliqué dans la réponse inflammatoire et peut être activé par des molécules pro-inflammatoires via la voie de signalisation des phospholipases C (Wang et al, 2008). Dans cette situation, TRPA1 est activé par des espèces réactives électrophiles et oxydantes qui viendront réagir sur les lysines et les cystéines. Cependant, des composés non électrophiles comme le menthol et les cannabinoïdes peuvent également activer ce canal (Andersson et al, 2011; Hu et al, 2009; Wang et al, 2012; Eberhardt et al, 2014, 2012). Il est présent dans différentes cellules sensorielles telles que les cellules épithéliales, ainsi que dans certaines sous populations de neurones sensoriels (fibres A $\delta$  et C). Dans ces neurones, TRPA1 permet la dépolarisation de la cellule en permettant l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Na}^+$  dans la cellule. On le retrouve également dans les mélanocytes, mastocytes, fibroblastes, odontoblastes, ainsi que dans les cellules d'entérochromaffine et les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Tout cela fait de TRPA1 une cible

pharmacologique importante à étudier pour le traitement de la douleur (Wang & Woolf, 2005), des démangeaisons (Lieu et al, 2014), mais également pour des maladies telles que les neuropathies périphériques (Andersson et al, 2013; Eberhardt et al, 2012), ou certaines maladies inflammatoires (Bautista et al, 2013).

Nous étudierons ici le canal TRPA1 humain en tenant compte du fait que ce canal occupe des fonctions différentes chez les autres espèces animales qui en disposent. Cela rend difficile la comparaison entre les effets observés sur les canaux TRPA1 chez différentes espèces. En effet, TRPA1 ne réagit pas de la même façon et n'occupe pas les mêmes fonctions suivant le mammifère dans lequel il est exprimé. L'étude "Species-specific pharmacology of Trichloro-(sulfanyl)ethyl benzamides as transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists" menée par Klionsky en 2007 (Klionsky *et al*, 2007) montre que les antagonistes peuvent même avoir des effets opposés à ceux attendus suivant si on étudie le TRPA1 du rat ou de l'humain. D'autres exemples sur la souris sont également intéressants : le menthol peut activer le TRPA1 de la souris à de basses concentrations, ce qui n'est pas observable chez l'humain. La caféine bloque le TRPA1 humain mais ne semble pas avoir d'effet chez la souris (Chen & Kym, 2009). De même, la localisation, et donc l'usage qu'en fait chaque espèce, est différente. Par exemple, le serpent possède TRPA1 dans ses yeux ce qui lui permet de capter les rayonnements infrarouges (Panzano *et al*, 2010). Les différences entre la température d'activation de TRPA1 chez différentes espèces sont également importantes comme le montre la Figure 24 provenant de l'article de Laursen *et al*, 2015.



**Figure 24** - Différences interspécifiques dans les sensibilités à la température des orthologues TRPA1. Tact : Température provoquant l'activation du canal. Le nom commun fait référence aux orthologues de TRPA1 clonés à partir des espèces suivantes : Grenouille - *Xenopus tropicalis* ; Poulet- *Gallus gallus domesticus* ; Couleuvre - *Elaphe obsoleta lindheimeri* ; Anole- *Anolis carolinensis* ; Python- *Python regius* ; Boa- *Corallus hortulanus* ; Crotale- *Crotalus atrox* ; Mouche - *Drosophila melanogaster* ; Moustique - *Anopheles gambiae* ; Nématode - *Caenorhabditis elegans* ; Souris - *Mus musculus* ; Humain - *Homo sapiens*. Les images de couleuvre, de serpent à sonnette, de boa, de moustique et d'humain ont été adaptées de Wikimedia Commons (image boa par Geoff Gallice). La figure elle-même provient de l'article de Laursen et al, 2015.

## IV - Méthodes d'étude utilisées

### 1- Méthodes sans marquage

Au cours des quinze dernières années, des techniques sans marquage ont émergé, offrant la possibilité d'interroger un large panel de molécules médicamenteuses avec une couverture complète des cibles, des voies, des réseaux et des processus cellulaires des cellules natives en temps réel. Ces techniques sont basées sur plusieurs modes de lecture, tels que la mesure de l'impédance cellulaire (également appelée impédancemétrie cellulaire), le réseau de guides d'ondes résonant ou la microscopie holographique numérique, et détectent les changements morphologiques dans les cellules soumises à des produits chimiques. De telles techniques sont puissantes pour révéler des réponses lorsqu'il y a peu ou pas de connaissances sur le mécanisme d'action du médicament ou du facteur de stress, et elles sont parfaitement adaptées à la recherche en bioélectromagnétisme.

#### A- Holomicroscopie

##### a- Principe

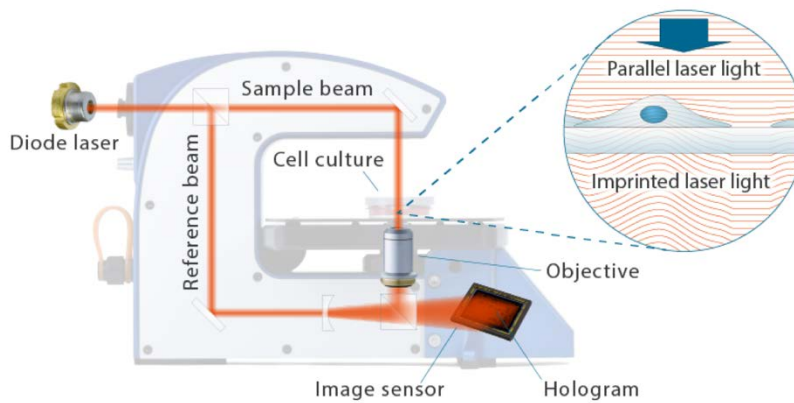
L'holographie est une méthode interférométrique permettant de caractériser les informations tridimensionnelles d'objets contenus dans un milieu transparent. Son utilisation a été notamment permise par le Nobel de physique de 1971, Dennis Gabor (Gabor, 1948; The Nobel Prize in Physics 1971). La variante numérique de l'holographie a été apportée par O. Coquoz et son équipe (Coquoz *et al*, 1992) puis par U. Schnars et W. Jüptner quand ils ont modernisé le système en utilisant une caméra CCD à la place d'un support photographique comme support d'enregistrement (Schnars & Jüptner, 1994). En 1999, Cuche et ses collaborateurs ont alors capitalisé sur ces travaux pour exploiter l'holographie numérique dans le cadre d'études en microscopie. Ils ont prouvé qu'une seule image d'holographie numérique permettait l'obtention de valeurs quantitatives précises. En se basant sur les valeurs quantitatives de la phase et de l'amplitude, on obtient une résolution de l'ordre de celle obtenue en microscopie conventionnelle (Cuche *et al*, 1999a, 1999b).

Cette technique repose sur le principe de l'interférométrie, c'est-à-dire la comparaison de la phase de deux faisceaux électromagnétiques ayant la même phase et fréquence initiale (Kim, 2009). Lorsque deux ondes de même fréquence se combinent, deux événements

peuvent survenir. Une interférence constructive si les ondes sont en phase ou une interférence destructive si elles sont déphasées. Le diagramme d'intensité obtenu pour une onde qui n'est ni totalement en phase, ni totalement déphasée sera dit intermédiaire. L'holographie microscopique repose sur ces techniques. Un faisceau de lumière cohérente (tel qu'un laser) est scindé en deux faisceaux. Chaque faisceau prendra un chemin différent mais de distance égale pour se réunir au niveau d'un détecteur (caméra CCD). Un des faisceaux servira de référence, tandis que l'autre traversera un objet à caractériser. Si aucun objet n'est rencontré sur le chemin optique, la différence de phase des deux faisceaux est nulle et il n'y a pas d'apparition d'hologramme. S'il y a un objet sur le trajet optique d'un des faisceaux, une différence de phase apparaît avec le faisceau de référence. Le diagramme d'intensité alors obtenu permettra alors d'obtenir des données sur l'objet traversé. On peut ainsi obtenir une reconstitution 3D de l'objet étudié, en temps réel, en continue, sur le laps de temps souhaité, tout en enregistrant une grande quantité de paramètres. En 2005, il a été prouvé que la forme des cellules pouvait également être représentée quantitativement à l'aide de cette technique (Marquet *et al*, 2005). Puisque l'image est reconstituée numériquement, il est également possible d'améliorer la qualité des images par ordinateur. Cette technique de microscopie a ainsi pu être utilisée en biologie pour l'imagerie de micro-organismes (Garcia-Sucerquia *et al*, 2006; Malkiel *et al*, 2003) et de cellules vivantes (Alm *et al*, 2013; Verduijn *et al*, 2021; Balvan *et al*, 2015).

#### *b- Système utilisé*

Dans cette étude nous avons choisi d'utiliser un microscope holographique Holomonitor M4. Il s'agit d'un microscope permettant l'étude sans marquage de cultures de cellules vivantes en temps réel. Il utilise un laser rouge (635 nm), qui est scindé en deux faisceaux par un premier miroir, et un objectif de microscope (x20). Lorsqu'un des deux faisceaux traverse l'échantillon cellulaire, il se retrouve déphasé par rapport à l'autre faisceau servant de référence. Ces deux faisceaux sont ensuite réunis par un nouveau miroir et le faisceau restant est projeté sur une caméra CCD (Figure 25).



**Figure 25** - Microscope holographique Holomonitor M4 avec la représentation du chemin parcouru par le faisceau. Le laser est scindé en deux par un miroir dichroïque. Le faisceau traversant l'échantillon est grossi d'un facteur 20 par un objectif situé en dessous de l'échantillon. Le changement de phase dépendant de la surface cellulaire traversée est représenté à droite. Le faisceau de référence suit un parcours et un grossissement identique. Les deux lasers se réunissent sur une Caméra CCD. Image issue du site : <https://phiab.com/landing-page/learn-more-about-holomonitor/>

Le profil interférométrique obtenu est utilisé pour reconstruire numériquement une image de phase analysée (Mölder *et al*, 2008). Ce microscope donne accès à 42 paramètres, cellule par cellule, ou sur la culture entière. Parmi ces paramètres on retrouve : l'heure d'acquisition de chaque image, le décalage de phase, le nombre de cellule, la confluence, la largeur des cellules à plusieurs niveaux, l'épaisseur, l'irrégularité, le volume, la convexité, le périmètre... La résolution de cet appareil est de 1  $\mu\text{m}$  et il permet d'acquérir jusqu'à 1 image par seconde sur plusieurs jours. Il supporte l'humidité et la température présente dans un incubateur ce qui permet des études dans des conditions compatibles avec la culture de cellules humaines. Chaque variation morphologique est calculée à partir d'une variation de phase du laser incident. La variation de phase (P) peut ainsi être utilisée pour le calcul de différents paramètres. Si nous prenons l'exemple du calcul de l'épaisseur de cellules (Équation 5) dans un milieu de réfraction  $n$ , et connaissant la longueur d'onde  $\lambda$  :

Équation 5 :

$$\text{Épaisseur} = P \times \frac{\lambda}{(n_{\text{cell}} - n_{\text{medium}})}$$

Où P est la variation de phase,  $\lambda$  la longueur d'onde, et  $n_{\text{medium}}$  l'indice de réfraction du milieu utilisé et  $n_{\text{cell}}$  l'indice de réfraction de la cellule. L'indice de réfraction des cellules est basé sur plusieurs publications (Dunn & Richards-Kortum, 1996; Rappaz *et al*, 2005; Farinas & Verkman, 1996). En mesurant la variation de phase P en tout point de la cellule, il devient aisé de calculer la surface cellulaire et une multitude d'autres paramètres liés entre eux.



## B- Impédancemétrie

### *a- Principe*

Les biocapteurs d'impédance cellulaire sont généralement constitués d'un réseau d'électrodes sur substrat isolant, sur lequel sont cultivées des cellules. Chaque électrode est donc recouverte d'un groupe de cellules.

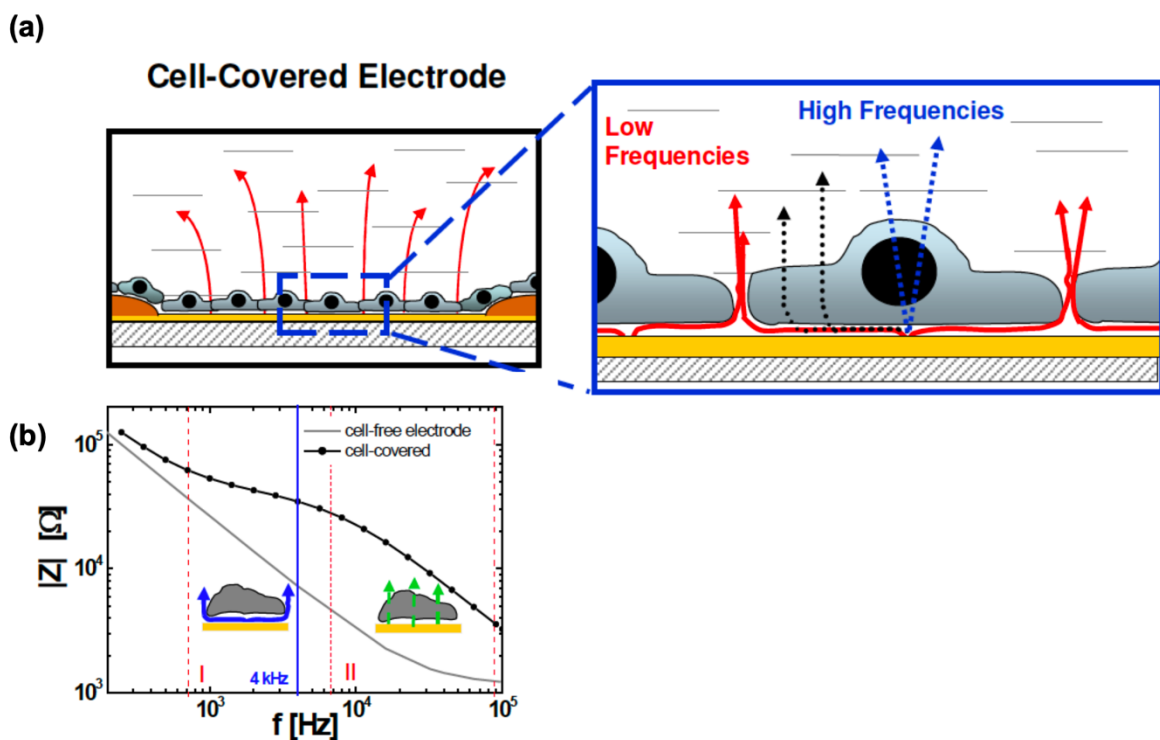
L'impédance mesure l'opposition d'un système à l'application d'une contrainte physique. L'impédance électrique caractérise l'intensité du courant circulant dans un échantillon soumis à une tension électrique. L'impédance ( $Z$ , en ohm) se définit comme le rapport de la tension (en Volt) sur l'intensité (en Ampère). Il s'agit d'une variante de la loi d'Ohm qui s'applique aux courants alternatifs. La mesure de l'impédance électrique est utilisée depuis des décennies pour la caractérisation des tissus biologiques (Grimnes & Martinsen, 2015). L'impédance dépend des composants constituant l'échantillon à tester, dans notre cas des ions du milieu de culture et des cellules biologiques avec leur membrane délimitant les milieux extra- et intra-cellulaire. Un milieu salin contribuera à l'impédance de par ses propriétés conductrices, une membrane cellulaire à l'inverse par ses propriétés capacitives. La spectroscopie d'impédance électrique (EIS) est réalisée sur plusieurs fréquences réparties dans un intervalle donné. Selon la fréquence du signal de mesure, on peut explorer l'échantillon à différentes échelles ; un courant à basse fréquence circule préférentiellement dans l'espace extracellulaire, tandis qu'un courant à haute fréquence peut « traverser » les membranes cellulaires et circuler à la fois dans l'espace intra- et extracellulaire.

### *b- Système utilisé*

Dans nos manipulations nous avons utilisé un appareil XCELLigence de chez Agilent. Il donne accès en temps réel au niveau d'adhésion des cellules sur la plaque de culture, leur prolifération et leur migration (Cellular Impedance | Agilent). Cette machine permet des études en présence de stress exogène comme en conditions physiologique. Le rôle d'électrolyte est tenu par le milieu de culture qui permet la circulation du courant entre les électrodes de l'appareil grâce aux ions qu'il contient. Les électrodes représentent 80 % de la surface du puits de culture. Constituées d'or (métal inerte), elles allient une excellente

conductivité et une compatibilité aux traitements de surface tels que la poly-lysine. Elles reposent sur une base de polytéréphtalate d'éthylène (PET).

A confluence, la circulation du courant et donc l'impédance, dépendront de la fréquence utilisée. Si nous utilisons une fréquence inférieure à 4 KHz, le courant circulera en majorité dans les espaces intercellulaires, nous donnant ainsi des informations sur les contacts des cellules. Ces contacts peuvent être entre les cellules et le support, ou entre les cellules elles-mêmes. Nous pourrions ainsi avoir des informations sur la prolifération et l'adhésion cellulaire. Si une fréquence dépassant les 10 kHz est utilisée, nous aurons des renseignements sur l'état des cellules (morphologie, nombre et adhésion)(Figure 26).



**Figure 26** - Déplacement du courant au niveau des cellules suivant la fréquence du courant alternatif utilisé. (a) Les flèches rouges représentent un courant contournant les cellules à faible fréquence (moins de 4 kHz). Les flèches noires et bleues représentent un courant traversant la cellule à des fréquences supérieures à 10 kHz. (b) Impact de la présence de cellules sur les électrodes aux différentes fréquences testées. Dans ce Diagramme de Bode, on visualise dans la partie (I) les courants majoritairement extracellulaires jusqu'à 10 kHz (II) où ils commencent à traverser la cellule. Image issue du site web de la plateforme ARPEGE, 2016

Lors des expérimentations, la valeur fournie par l'instrument est le cell index (CI) qui est calculé comme suit (Équation 6) :

Équation 6 :

$$CI(t) = \frac{R(f_n, t) - R(f_n, t_0)}{Z_n}$$

Où  $f_n$  est la fréquence à laquelle la mesure d'impédance est effectuée,  $R(f_n, t)$  est l'impédance mesurée à la fréquence  $f_n$  à l'instant  $t$ ,  $R(f_n, t_0)$  est l'impédance mesurée à la fréquence  $f_n$  à  $t_0$  (instant de la mesure de fond), et  $Z_n$  est le facteur de fréquence correspondant de  $f_n$ . Le système xCELLigence mesure l'impédance à trois fréquences discrètes :  $f_1 = 10$  kHz,  $f_2 = 25$  kHz et  $f_3 = 50$  kHz, les facteurs de fréquence correspondants sont :  $Z_1 = 15 \Omega$ ,  $Z_2 = 12 \Omega$  et  $Z_3 = 10 \Omega$  respectivement. Le CI est une moyenne des signaux mesurés à ces trois fréquences (Cimpan *et al*, 2013).

Lorsqu'il n'y a pas de cellules sur les microélectrodes, l'impédance mesurée dépend de la géométrie des électrodes et des propriétés électriques de la solution ionique dans le puits. Lorsque des cellules sont attachées aux microélectrodes, à ces fréquences elles agissent en général comme des isolants et conduisent donc à une augmentation de la valeur de l'impédance.

## 2- Méthodes d'étude utilisant des sondes moléculaires encodées génétiquement

### A- Transfert d'énergie en résonance de Förster

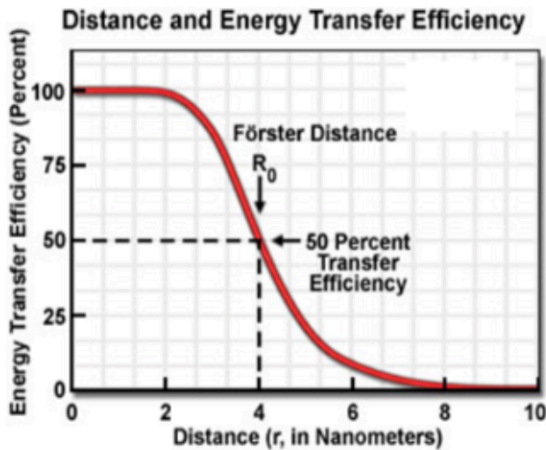
Pour étudier les interactions entre protéines, certaines techniques utilisent le transfert d'énergie en résonance (RET). Il s'agit d'un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de photon) entre un donneur d'énergie excité et un accepteur fluorescent compatible via une interaction dipôle-dipôle entre les nuages électroniques de chacun des groupes donneur et accepteur. Ce mécanisme quantique a été découvert et caractérisé en 1948 par Théodor Förster (qui donna son nom à la technique de transfert d'énergie en résonance de Förster ou FRET). L'efficacité du transfert d'énergie de cette technique est dépendante de 3 paramètres : la distance entre les dipôles donneur et accepteur, l'orientation respective de leurs moments dipolaires et le recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur d'énergie et le spectre d'excitation de l'accepteur d'énergie.

La distance entre les dipôles donneur et accepteur d'énergie est une condition importante du RET puisque l'efficacité du transfert ( $E$ )(Équation 7) est inversement proportionnelle à la puissance six de la distance séparant le dipôle donneur d'énergie du dipôle accepteur d'énergie (Cardullo, 2013) :

Équation 7 :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Dans cette équation,  $r$  est la distance et  $R_0$  est le rayon de Förster (Förster, 1948), qui définit comme étant la distance permettant 50 % du transfert maximal d'énergie (une constante dépendante du couple donneur / accepteur) telle qu'illustré Figure 27.

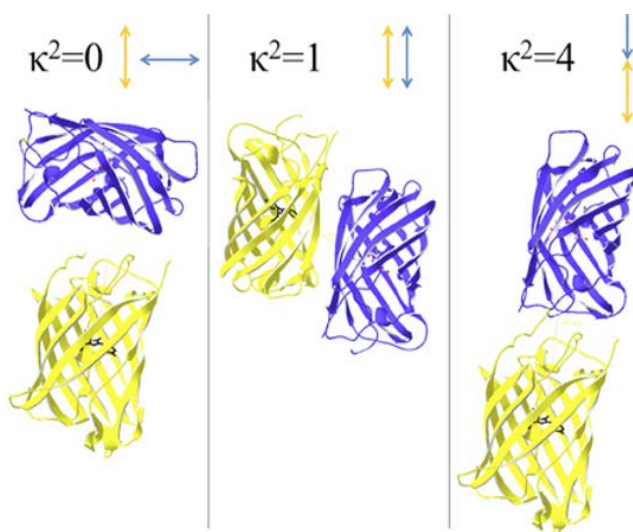


**Figure 27** – Représentation de l'efficacité d'un transfert d'énergie en fonction de la distance donneur-accepteur ( $r$ ).  $R_0$  est la distance de Förster définie comme étant la distance permettant 50% de l'efficacité maximale du transfert pour un couple donneur-accepteur donné.

Source : [http://studbooks.net/1863587/meditsina/printsip\\_fret](http://studbooks.net/1863587/meditsina/printsip_fret)

Cette équation et le graphique ci-dessus montrent que le transfert d'énergie a lieu à des distances de l'ordre de 10 nm (30 Å à 150 Å suivant le couple donneur accepteur (Förster, 1948). Cela montre également que les variations de RET seront très grandes pour une faible variation de distance.

L'orientation des moments dipolaires des donneurs et accepteurs d'énergie est un autre point important pour que le transfert d'énergie ait lieu. Le transfert d'énergie sera nul si les moments dipolaires sont perpendiculaires ( $k^2=0$ ), fonctionnel s'ils sont parallèles ( $k^2=1$ ) et optimal s'ils sont alignés ( $k^2=4$ ) comme représenté Figure 28.

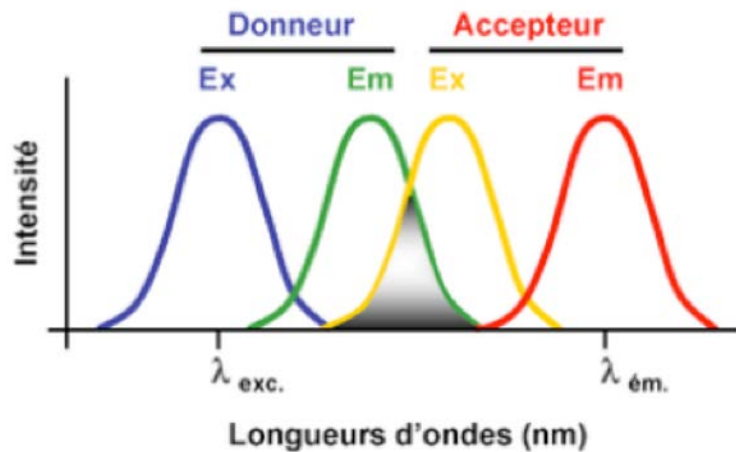


**Figure 28** - Représentation schématique de l'orientation des moments dipolaires entre un donneur et un accepteur d'énergie. L'énergie transférée est maximale lorsque les moments dipolaires du donneur et de l'accepteur d'énergie sont alignés, et nulle lorsqu'ils sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre. Source: [https://fr.wikipedia.org/wiki/Transfert\\_d%27%C3%A9nergie\\_entre\\_mol%C3%A9cules\\_fluorescentes](https://fr.wikipedia.org/wiki/Transfert_d%27%C3%A9nergie_entre_mol%C3%A9cules_fluorescentes)

$k^2$  est le facteur d'orientation qui dépend de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur. Théoriquement, sa valeur est comprise entre 0 et 4. En pratique,

sa valeur est assimilée à 2/3. Il s'agit de la valeur attribuée lorsque le donneur et l'accepteur présentent un degré de liberté suffisant pour être aléatoirement orientés dans l'espace (Stryer, 1978). Cette condition est souvent remplie lorsque les protéines fluorescentes sont fusionnées à une autre protéine (Dale *et al*, 1979).

La dernière condition pour l'obtention d'un RET est le recouvrement spectral du spectre d'émission du donneur par le spectre d'excitation de l'accepteur (Figure 29).



**Figure 29** - Représentation du recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur d'énergie et le spectre d'excitation de l'accepteur d'énergie.

Source : [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1e/Conditions\\_du\\_FRET.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1e/Conditions_du_FRET.png)

La notion de compatibilité entre le donneur et l'accepteur dépend des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de chacun d'eux. Le spectre d'émission du donneur doit se superposer le plus possible au spectre d'excitation de l'accepteur. Étant donné que la longueur d'onde est inversement proportionnelle à la puissance transportée par l'onde, le recouvrement spectral ici invoqué indique que l'énergie des états excités du donneur d'énergie correspond à l'énergie nécessaire pour entrainer le passage à l'état excité de la protéine acceptrice d'énergie.

#### B- Transfert d'énergie en résonance de fluorescence (FRET)

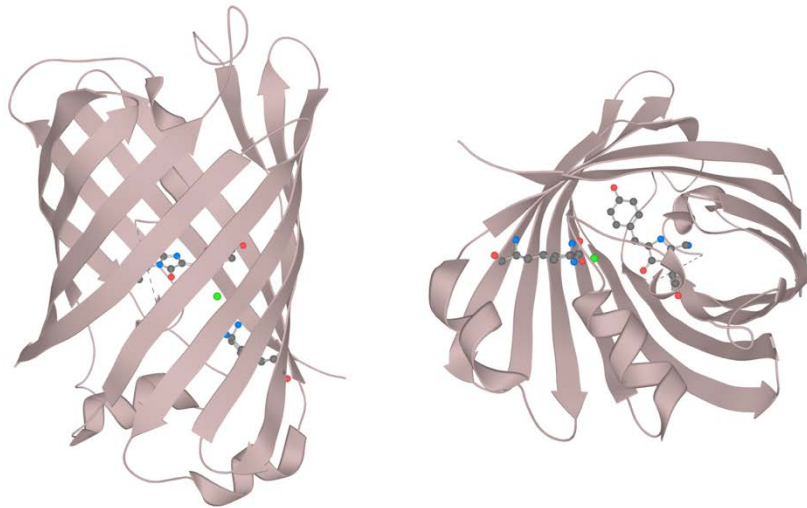
La technique de transfert d'énergie en résonance de fluorescence (FRET) repose sur les principes du transfert d'énergie en résonance de Förster énoncés dans le chapitre précédent. Le FRET a l'avantage de pouvoir être combiné à la microscopie pour permettre la localisation d'interactions protéiques en cellule vivante, en temps réel, et sur cellules adhérentes. La possibilité du suivi en temps réel rend possible la mesure en cinétique de l'activité d'une protéine ou de ses interactions au sein de la cellule. En prenant une protéine d'intérêt en sandwich entre un donneur et un accepteur d'énergie exprimés génétiquement, on peut obtenir une sonde intramoléculaire qui rendra compte des changements de conformation de

la protéine. Ces changements étant liés à l'activité protéique, les sondes intramoléculaires permettent de suivre en temps réel les variations d'activité de la protéine. Cependant, il faut prendre en considération la possibilité d'excitation croisée des fluorophores. Lors de l'excitation du donneur d'énergie avec une lumière monochromatique, une faible stimulation de l'accepteur est possible. Si ce paramètre n'est pas contrôlé, cette excitation sera prise en compte lors de l'analyse des résultats.

Une grande quantité de protéines fluorescentes ont été développées pour s'adapter aux besoins de la technique de FRET. Des tableaux réunissent les différents couples donneurs et accepteurs compatibles. Par exemple le site <https://www.fpbase.org/fret/> offre la possibilité de choisir parmi 7 289 possibilités d'interactions suivant les différents paramètres dont dépend le FRET : le rendement quantique, le coefficient d'extinction, l'intégrale de la superposition spectrale des couples ( $J(\lambda)$ ), le rayon de Förster ( $R_0$ ), l'indice de réfraction ( $n$ ) et l'orientation ( $k^2$ ). Grâce à ce type de site web, il est possible de choisir les protéines fluorescentes les plus adaptées à l'application que l'on souhaite en faire.

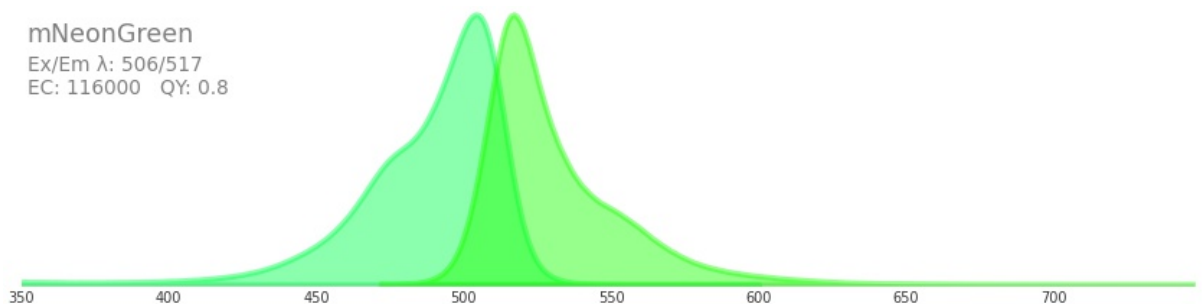
#### C- Accepteur d'énergie fluorescent : La mNeonGreen

Parmi la large gamme de choix en matière de protéines fluorescentes que nous avons à notre disposition, nous avons choisi d'utiliser dans ce manuscrit la mNeonGreen (mNG) (<https://www.fpbase.org/protein/mneongreen/>). Il s'agit d'une protéine de 236 acides aminés (26,6 kDa), active sous forme monomérique, et qui ne nécessite pas de cofacteur pour fonctionner. En 2013, il a été dit qu'elle est « la plus brillante des protéines monomériques fluorescentes vertes ou jaunes jamais décrite à notre connaissance » (Shaner et al, 2013). Cette protéine reste encore aujourd'hui utilisée dans la littérature actuelle (Zhong et al, 2021; McCulloch et al, 2020). Elle est une version modifiée de la protéine fluorescente LanYFP provenant du *Branchiostoma lanceolatum*, qui est un animal marin. La structure de la mNG a été caractérisée en cristallographie (Clavel et al, 2016). Son identifiant sur PDB (Protein DataBase) est 5LTR (Figure 30).



**Figure 30** - Structure de la mNeonGreen vue de côté (à gauche) et du dessus (à droite) d'après la modélisation rayon X à 1,21 Å de Clavel et al, 2016. On y voit le feuillet  $\beta$  en  $\beta$ -barrel qui contient le fluorophore. D'après le site : <https://www.fpbase.org/protein/mneongreen/>

La structure de la mNGreen forme un tonneau d'environ 42 Å de hauteur pour environ 25 Å de largeur. Ce tonneau est constitué de 11 brins  $\beta$  en conformation antiparallèle et d'un chromophore supporté par des hélices  $\alpha$  en son centre. Cette protéine possède un maximum d'excitation et d'émission respectivement à 506 et 517 nm, son coefficient d'extinction est de 116 000 et son rendement quantique est de 0,8 (Figure 31).



**Figure 31** – Spectre d'émission et d'excitation de la mNGreen d'après le site : <https://www.fpbase.org/protein/mneongreen/>

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

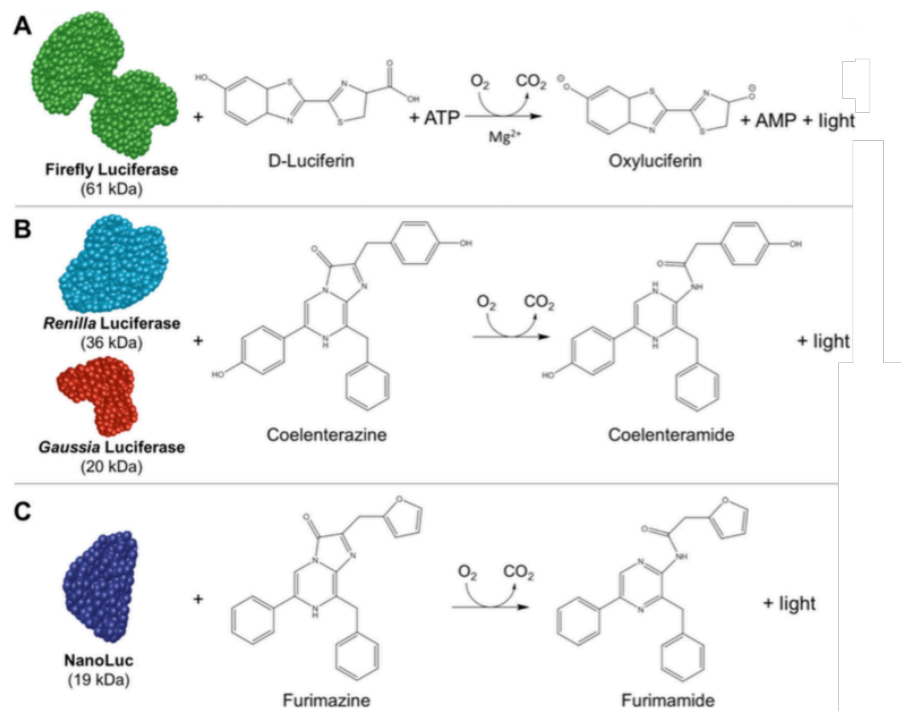
Le BRET est une technique biophysique utilisée pour étudier les interactions et les changements conformationnels des protéines en mesurant le transfert d'énergie non radiatif entre un donneur d'énergie bioluminescent (luciférase ou Luc (Wilson & Hastings, 1998)) et un accepteur fluorescent, telle que la mNeonG, fusionnées à des protéines d'intérêt. Le BRET est une technique utilisant le même principe que le FRET. Le BRET est donc soumis aux règles de distance, d'orientation des dipôles et de recouvrement spectral énoncées plus haut. Le transfert non radiatif de l'énergie du donneur vers l'accepteur provoque 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 (Xu *et al*, 1999). On calcule alors le BRET comme décrit dans l'Équation 8.

Équation 8 : 
$$\text{Ratio de BRET} = \frac{\text{Intensité d'émission de l'accepteur}}{\text{Intensité d'émission du donneur}}$$

Le BRET utilise la luciférase comme protéine donneuse d'énergie. Suivant l'organisme d'origine ces luciférases ont des séquences d'acides aminés différentes avec différents mécanismes de production de la lumière (Wilson & Hastings, 1998) comme illustré Figure 32.



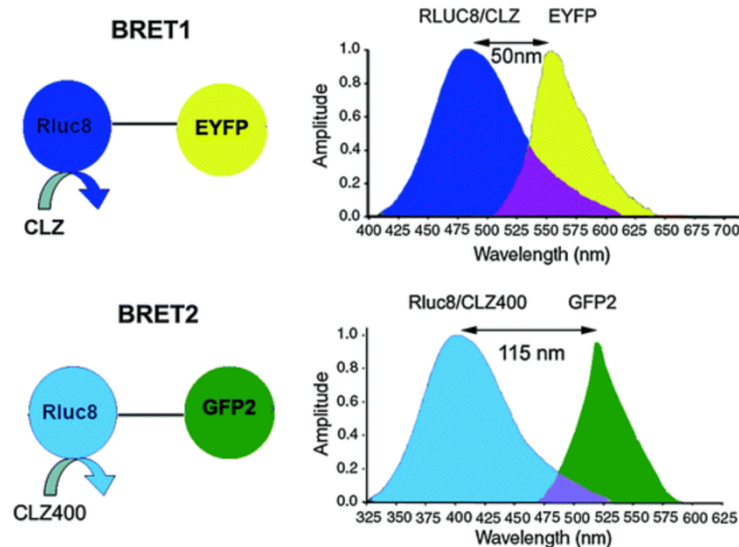
**Figure 32** – La bioluminescence est basée sur une réaction chimique qui se produit entre l'enzyme luciférase et le substrat correspondant. (A) La luciférase de luciole (FLuc) réagit avec la D-luciférine en présence d'adénosine triphosphate (ATP), d'oxygène et de magnésium pour produire de la lumière. (B) Renilla (RLuc) et Gaussia luciférase (GLuc) ne nécessitent que de la coelentérazine et de l'oxygène pour produire de la lumière. (C) La bioluminescence du système NanoLuc (NLuc) se produit lorsque le substrat optimisé appelé furimazine réagit avec NLuc en présence d'oxygène. Cette réaction produit de la furimamide et de la lumière. Source : England *et al*, 2016

Le BRET est un phénomène naturel qui se produit chez certains être vivants, telle la pensée de mer *Renilla reniformis* et la méduse *Aequorea victoria*. Chez ces organismes, l'enzyme luciférase effectue une dégradation oxydative de son substrat, la coelentérazine, qui s'accompagne d'une émission de lumière avec un pic d'émission à 480 nm. Dans ces organismes, l'énergie d'activation de la luciférase est transférée à une protéine GFP (Green



Fluorescent Protein), mais expérimentalement on utilise des protéines bioluminescentes et fluorescentes modifiées et dont la brillance a été améliorée par génie génétique (Hamdan *et al*, 2006a).

Différentes générations de BRET ont été développées au cours du temps (Borrito-Escuela *et al*, 2013). La première méthode développée est appelée BRET1. Elle utilise la Renilla Luciferase (RLuc) et la coelentérazine H comme complexe enzyme/substrat donneur d'énergie. Elle se caractérise par des signaux puissants et une longue durée de vie. La réaction d'oxydation de la coelenterazine H par la RLuc s'accompagne d'une émission de lumière avec un pic d'émission à 480 nm. La YFP, dont le spectre d'excitation recouvre significativement le spectre d'émission de la luciférase (en présence de coelenterazine H), a historiquement été choisie comme protéine fluorescente acceptrice dans les tests de BRET dits de première génération (BRET1)(Hamdan *et al*, 2006b). Une seconde génération de BRET, le BRET2 (Borrito-Escuela *et al*, 2013) dispose d'une meilleure séparation des maximums d'émission du donneur et de l'accepteur grâce à l'utilisation de la coelentérazine 400A, aussi appelée DeepBlue, comme substrat de la RLuc, et de la GFP2 comme accepteur d'énergie. Ce test permettait une plus grande résolution entre les maximums d'émission des protéines donneuse et acceptrice d'énergie (Figure 33).



**Figure 33** - Représentation schématique du recouvrement spectral des couples donneur et accepteur avec leurs substrats (identifiés sur la gauche) utilisés dans les techniques de BRET1 et BRET2 (à droite de l'image). La résolution spectrale de chaque système est marquée par une flèche bidirectionnelle et la région de chevauchement spectral est marquée par une zone de couleur violette à l'intersection de l'émission du donneur et de l'accepteur. Les

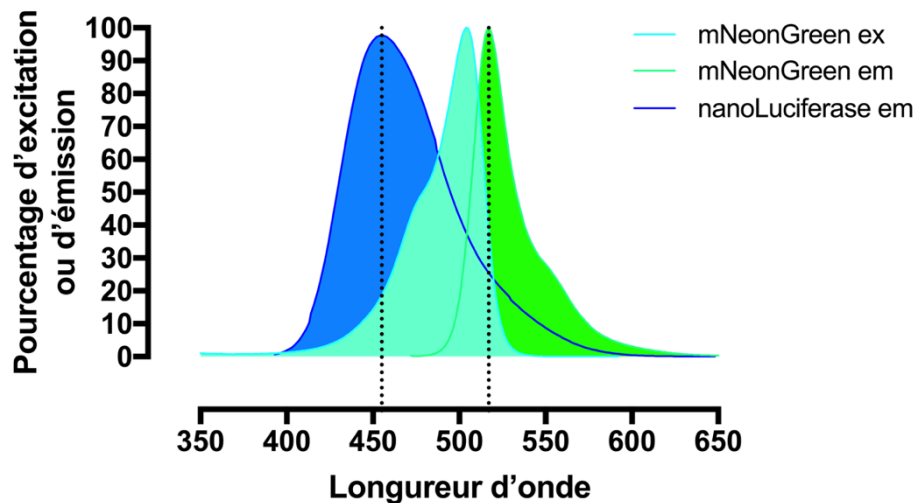
plages et les intensités d'émission du donneur et de l'accepteur sont représentées à titre d'illustration et ne sont pas représentative de l'intensité réelle. CLZ signifie Coelenterazine et CLZ400 Coelenterazine 400 (aussi appelée DeepBlue). Illustration issue de l'article De *et al*, 2017. Source : <https://basicmedicalkey.com/engineering-aspects-of-bioluminescence-resonance-energy-transfer-systems/>

Cependant, les signaux bioluminescents en BRET2 sont moins lumineux et durent moins longtemps que pour le BRET1. Le BRET2 a ensuite été amélioré en utilisant la RLuc8 (modification de la RLuc), donnant lieu au eBRET. Cette version utilise le même substrat et a le même pic d'émission que le BRET2 mais produit 5 fois plus de photons. Une troisième génération de BRET (De *et al*, 2009) se sert de la luciférase Firefly qui utilise la luciférine comme substrat. Cette fois, sa longueur d'onde d'émission est cette fois décalée sur la droite (565 nm), et l'accepteur d'énergie le plus utilisé est le DsRed (émission à 583 nm). Les signaux sont faibles et les spectres d'émissions du donneur et de l'accepteur se chevauchent, ce qui entraîne une perte de résolution. Cependant, le décalage de l'émission vers le rouge rend cette technologie plus efficace pour mesurer le BRET dans les tissus d'animaux.

Le CODA-RET est également une technologie BRET utilisant la RLuc8, mais scindée en 2 parties (Urizar *et al*, 2011). Lorsque la RLuc8 est reconstituée par complémentarité entre ses deux moitiés, elle peut de nouveau émettre normalement. Cette technologie permet d'étudier plus de deux partenaires protéiques simultanément.

Une autre génération de BRET nommée Quantum Dot-BRET (QD-BRET)(Barroso, 2011) utilise de nouveau la coelentérazine comme substrat pour la RLuc ou la RLuc8, retrouvant une longueur d'onde d'émission à 480 nm. L'accepteur utilisé est alors Quantum Dot (QDot), qui dispose d'une émission à 605 nm, ce qui est très éloigné de la longueur d'onde d'émission du donneur d'énergie. La séparation des pics permet une excellente résolution. L'inconvénient de cette technique est que l'accepteur d'énergie QDot est large (10 à 30 nm) ce qui peut gêner le mouvement et l'interaction des protéines de fusion. De plus, il est impossible de produire cet accepteur dans une cellule, il faut obligatoirement l'amener de l'extérieur (Barroso, 2011).

Dans mon équipe, nous avons choisi d'utiliser la technologie NanoBRET (Dale *et al*, 2019). Cette technologie utilise une luciférase nommée NanoLuciférase (NLuc) qui utilise la furimazine comme substrat. Elle émet à 460 nm, ce qui correspond au spectre d'excitation de la mNeonGreen que nous avons utilisé comme accepteur d'énergie (Figure 34). Le couple NLuc-mNeonG est un couple BRET donneur-accepteur dont les caractéristiques spectrales sont connues (Aird *et al*, 2019) et qui a déjà montré son efficacité lors de tests BRET (den Hamer *et al*, 2017; Schmidt *et al*, 2020).



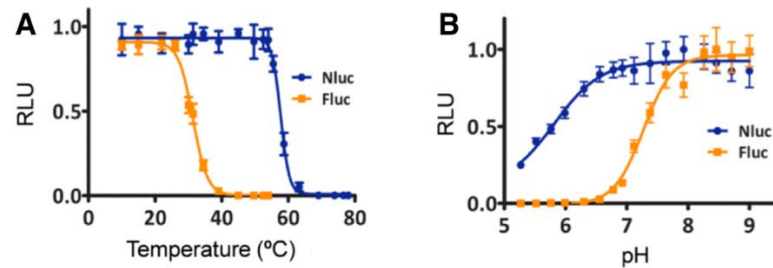
**Figure 34** - Spectres de luminescence de la construction NLuc et de la mNeonG, avec pour substrat la furimazine. En bleu, le spectre d'émission de la NLuc, en cyan, le spectre d'excitation de la mNeonGreen et en vert le spectre d'émission de la mNeonGreen. L'axe Y est la luminescence normalisée pour la normalisation de l'excitation de la mNeonGreen en cyan. Pour les courbes bleu et verte, il s'agit de la normalisation de la luminescence par rapport au maximum d'émission de la nanoLuciferase et de la mNeonGreen respectivement. La longueur d'onde de ces maximums d'émission est représentée par des pointillés. En théorie, l'émission de la nanoluciférase dans une construction NLuc-mNeonG devrait représenter 60 % du pourcentage de luminescence du spectre d'émission de la mNeonG (Aird et al, 2019).

#### E- Donneur d'énergie bioluminescent : la nanoLuciferase

Puisque nos études vont se baser sur le NanoBret, la luciférase que je détaillerai est celle utilisée dans cette technique, la NLuc. Il s'agit à l'origine d'une petite sous-unité de 19 kDa de l'enzyme luciférase de la crevette *Oplophorus gracilirostris*. Celle-ci a été améliorée et stabilisée pour obtenir une meilleure brillance sur la durée (Hall et al, 2012). La luciférase d'origine comprenait 4 sous-unités, 2 de 35 kDa et 2 de 19 kDa. Des études ont montré que seules les 2 sous-unités de 19 kDa étaient responsables de la bioluminescence de l'enzyme (Inouye et al, 2000). Plusieurs substrats ont ensuite été criblés sur la protéine NLuc issue de la mutagenèse. Celui produisant le plus de luminescence était le 2-furanylméthyl-désoxy-coelenterazine, aussi appelé furimazine (Hall et al, 2012).

La NLuc est une sous-unité catalytique de la OLuc (Oplophorus Luciferase), mutée pour obtenir une activité catalytique 150 fois supérieure à celle de la RLuc avec une plage spectrale plus étroite de 20 % (Hall et al, 2012) tout en ayant un encombrement stérique minime. La NLuc reste stable à plus de 55°C, à différents pH, et est distribuée de manière uniforme dans la cellule (Hall et al, 2012). La NLuc est par exemple plus stable que la FLuc dans le temps, sur

une plus large gamme de pH et de température (England *et al*, 2016)(Figure 35). La NLuc possède également une bioluminescence cent fois plus élevée que celle de la RLuc ou de la FLuc (Hall *et al*, 2012). Ajouté au décalage hypochrome de sa bande d'émission par rapport à la RLuc (ce qui augmente la sensibilité de la détection du signal de BRET), la NLuc permet de réaliser des expérimentations avec des quantités moindres de protéines exprimées dans les cellules, et donc de limiter les artéfacts liés à la surexpression des protéines.



**Figure 35** - Comparaison de l'intensité de luminescence de NLuc et FLuc. NLuc et FLuc ont été comparés lors de tests portant sur la sensibilité à la température (A) et au pH (B). Figure tirées de (England et al, 2016).



V - Étude de l'impact des radiofréquences sur le développement et la mort cellulaire à l'aide de méthodes non discriminantes





Article

# Label-Free Study of the Global Cell Behavior during Exposure to Environmental Radiofrequency Fields in the Presence or Absence of Pro-Apoptotic or Pro-Autophagic Treatments

Alexandre Joushomme<sup>1</sup>, André Garenne<sup>1</sup>, Mélody Dufossée<sup>2</sup>, Rémy Renom<sup>1</sup> , Hermanus Johannes Ruigrok<sup>1</sup>, Yann Loick Chappe<sup>1</sup>, Anne Canovi<sup>1</sup>, Lorenza Patrignoni<sup>1</sup>, Annabelle Hurtier<sup>1</sup>, Florence Poullietier de Gannes<sup>1</sup>, Isabelle Lagroye<sup>1,3</sup>, Philippe Lévêque<sup>4</sup>, Noëlle Lewis<sup>1</sup>, Muriel Priault<sup>2</sup> , Delia Arnaud-Cormos<sup>4,5</sup> and Yann Percherancier<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Univ. Bordeaux, CNRS, IMS/UMR 5218, F-33400 Talence, France; alexandre.joushomme@u-bordeaux.fr (A.J.); andre.garenne@u-bordeaux.fr (A.G.); remy330@msn.com (R.R.); hruigrok@sebia.com (H.J.R.); yann.chappe@u-bordeaux.fr (Y.L.C.); anne.canovi@u-bordeaux.fr (A.C.); lorenza.patrignoni@u-bordeaux.fr (L.P.); annabelle.hurtier@ims-bordeaux.fr (A.H.); florence.poullietier@ims-bordeaux.fr (F.P.d.G.); isabelle.lagroye@ephe.psl.eu (I.L.); noelle.lewis@u-bordeaux.fr (N.L.)
- <sup>2</sup> Univ. Bordeaux, CNRS, IBGC/UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France; melody.dufossee@ibgc.cnrs.fr (M.D.); muriel.priault@ibgc.cnrs.fr (M.P.)
- <sup>3</sup> Paris Sciences et Lettres Research University, F-75006 Paris, France
- <sup>4</sup> Univ. Limoges, CNRS, XLIM/UMR 7252, F-87000 Limoges, France; philippe.leveque@unilim.fr (P.L.); delia.arnaud-cormos@unilim.fr (D.A.-C.)
- <sup>5</sup> Institut Universitaire de France (IUF), F-75005 Paris, France
- \* Correspondence: yann.percherancier@ims-bordeaux.fr; Tel.: +33-5-40-00-27-24



**Citation:** Joushomme, A.; Garenne, A.; Dufossée, M.; Renom, R.; Ruigrok, H.J.; Chappe, Y.L.; Canovi, A.; Patrignoni, L.; Hurtier, A.; Poullietier de Gannes, F.; et al. Label-Free Study of the Global Cell Behavior during Exposure to Environmental Radiofrequency Fields in the Presence or Absence of Pro-Apoptotic or Pro-Autophagic Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 658. <https://doi.org/10.3390/ijms23020658>

Academic Editor: Elena López-Martín

Received: 8 November 2021

Accepted: 24 December 2021

Published: 8 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** It remains controversial whether exposure to environmental radiofrequency signals (RF) impacts cell status or response to cellular stress such as apoptosis or autophagy. We used two label-free techniques, cellular impedancemetry and Digital Holographic Microscopy (DHM), to assess the overall cellular response during RF exposure alone, or during co-exposure to RF and chemical treatments known to induce either apoptosis or autophagy. Two human cell lines (SH-SY5Y and HCT116) and two cultures of primary rat cortex cells (astrocytes and co-culture of neurons and glial cells) were exposed to RF using an 1800 MHz carrier wave modulated with various environmental signals (GSM: Global System for Mobile Communications, 2G signal), UMTS (Universal Mobile Telecommunications System, 3G signal), LTE (Long-Term Evolution, 4G signal, and Wi-Fi) or unmodulated RF (continuous wave, CW). The specific absorption rates (S.A.R.) used were 1.5 and 6 W/kg during DHM experiments and ranged from 5 to 24 W/kg during the recording of cellular impedance. Cells were continuously exposed for three to five consecutive days while the temporal phenotypic signature of cells behavior was recorded at constant temperature. Statistical analysis of the results does not indicate that RF-EMF exposure impacted the global behavior of healthy, apoptotic, or autophagic cells, even at S.A.R. levels higher than the guidelines, provided that the temperature was kept constant.

**Keywords:** label-free techniques; radiofrequency electromagnetic fields; bioelectromagnetics; digital holographic microscopy; impedancemetry; human cell lines; rat cortex primary cells; apoptosis; autophagy

## 1. Introduction

In the last thirty years, thousands of in vitro studies have been conducted to assess the potential physiological impacts of exposure to radiofrequency (RF) and extremely low-frequency fields [1–3]. These studies showed how extremely low-frequency fields induce nerve stimulation and how high-level RF exposures cause tissue heating at the



biophysical level. As a result, recommendations and standards have been established to protect populations from the associated health risks. Moreover, the potential non-thermal effects of low-level RF fields (i.e., at levels below the international guidelines) have been extensively studied without providing a definite answer based on physical knowledge. Two main challenges hinder the complete description of low-level RF effects: (i) the lack of knowledge about low-level effective field parameters and (ii) the complexity of the living machinery, making it challenging to define which cellular or molecular processes are targeted or impacted by RF exposure. In the context of health-risk assessment, this double challenge can only be addressed by continuing the search for the biological effects of RF exposure at levels below the guidelines using innovative methods.

Regarding co-exposures with environmental mutagens/carcinogens or chemical stressors such as pollutants, the situation is even more complex. For example, such co-exposures might affect DNA repair mechanisms, stimulate reactive oxygen species, or prevent free radical scavenging. Furthermore, one should still assess whether co-exposures between RF and known physical or chemical stresses lead to additive or synergistic adverse effects triggering cell death by apoptosis or autophagy [4,5].

The approaches previously used to study the cellular and molecular effects of low-level RF exposure have produced at best either large-scale data (such as “omics”) [6–8] or data acquired in real time and live cells, but focusing only on one cellular or molecular mechanism (e.g., the BRET approach that we developed recently [9–11]). Unfortunately, large-scale data are obtained from cell extracts following RF exposure, using, in most cases, stringent preparative steps. Such techniques help to identify cumulative stressor-triggered effects. Nonetheless, since cells exist in a metastable and often reversible equilibrium state, the risk is to overlook the RF effect due to the inability of these techniques to follow the dynamics of the living process. On the other hand, analyzing the dynamics of one specific cellular or molecular process in real-time under RF exposure requires knowledge of the RF interaction mechanism with living matter.

In summary, after decades of international research, whether RF exposure at levels below guidelines causes biological effects is still a matter of debate. Moreover, difficulties were encountered in interpreting and replicating the data of earlier studies, often acquired using ill-defined exposure conditions [2]. As a consequence, bioelectromagnetics research has stalled while societal concerns increased.

One solution to overcome these limitations is to use an empirical approach integrating the global cellular response during RF exposure or co-exposure with either chemicals or stressors. In the last fifteen years, label-free techniques emerged, offering the possibility of interrogating a broad panel of drug molecules with comprehensive coverage in targets, pathways, networks, and cellular processes of native cells in real-time. These techniques are based on several reading modes, such as cellular impedance measurement (also called cell impedancemetry), resonant waveguide grating, or digital holographic microscopy, and they detect morphological changes in cells challenged with chemicals [12–14]. Such techniques are powerful for revealing responses when there is little or no knowledge about the drug or stressor mechanism of action, and they are perfectly fit for bioelectromagnetics research. However, their use requires that cell-culture exposure to RF does not interfere with the read-out of the cell phenotype. To this aim, we first developed an EMF exposure device based on impedancemetry [15] to monitor in real time the phenotypic response of neuronal cells under RF exposure. Using this setup, we exposed cells to modulated-(GSM: *Global System for Mobile Communications*, 2G signal), UMTS (Universal Mobile Telecommunications System, 3G signal), LTE (Long-Term Evolution, 4G signal, Wi-Fi), or continuous-wave (CW) 1800 MHz signals at up to 24 W/kg over three consecutive days at a constant temperature. We then assessed the effect of RF exposure on the global behavior of SH-SY5Y neuroblastoma cells, which are often used as *in vitro* models of neuronal function and differentiation in bioelectromagnetics studies, and of both rat primary astrocytes and rat primary co-culture of neurons and glial cells. We also studied in cells the impact of combined exposures to RF and an environmental pollutant. Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) was

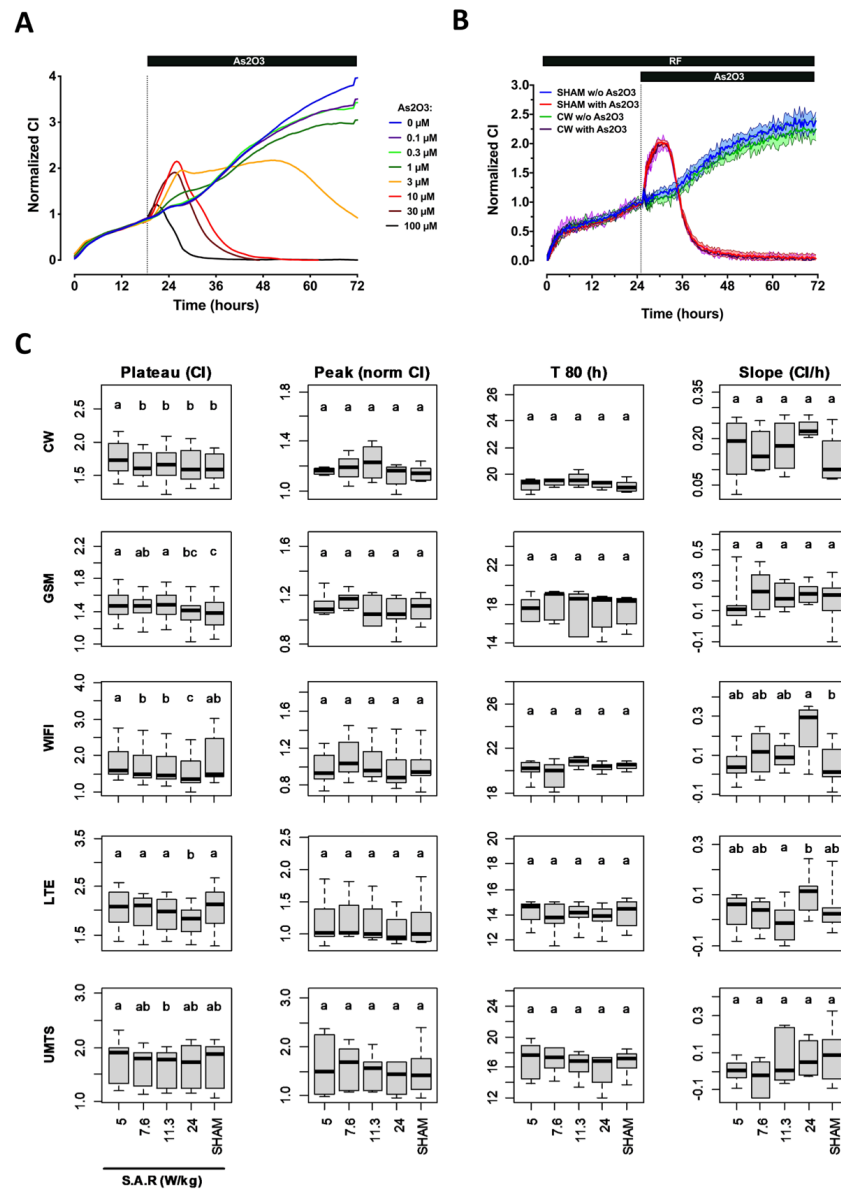
chosen since arsenic is one of the most toxic metals derived from the natural environment. The current major cause of human arsenic toxicity is from contamination of drinking water from natural geological sources [16], and possibly partly upon the medical applications of arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ). Fortunately, the use of arsenical pesticides in agriculture has decreased dramatically [17]. In addition, various studies indicated that the actual molecular mechanism for  $\text{As}_2\text{O}_3$ -induced toxicity could be related to its triggering of apoptosis in many cell lines such as the SH-SY5Y cell line [18,19] and brain cells, including primary neurons [20] and glioma cells [21]. Finally, in a further effort, we also adapted a transverse electromagnetic cell (TEM cell) [22–24] onto a digital holographic microscope platform to assess whether CW or GSM-modulated 1800 MHz signals at up to 6 W/kg and steady temperature impacted the well characterized autophagic response of serum-deprived HCT116 cells [25].

## 2. Results

### 2.1. Temporal Signature of SH-SY5Y Cells Behavior in the Presence or Absence of $\text{As}_2\text{O}_3$ Using Impedanceometry

Using our already described xCELL-RF system [15], we first assessed the temporal signature of the impedance variation of SH-SY5Y neuroblastoma cells over 72 h (Figure 1 A&B, blue curve). The impedance variation is here defined by the Cell Index variable (CI, see Material and Methods). Right after cell seeding, cells started to adhere, thereby inducing a rapid increase of the CI value. The adhesion phase was followed by a first pseudo-plateau during which cells are spreading and preparing for dividing. Finally, 24 h after seeding, cells started to grow exponentially, as indicated by a continuous increase in the CI value. Such temporal signature agrees with data by other groups for proliferating cells [26].

We then assessed the impact of  $\text{As}_2\text{O}_3$  on the temporal signature measured with SH-SY5Y neuroblastoma cells. Eighteen hours after seeding, increasing concentrations of  $\text{As}_2\text{O}_3$  were added to the culture media, and impedance was recorded during the following 54 h (Figure 1A). Immediately after  $\text{As}_2\text{O}_3$  injection, we observed a complex biphasic response which shape depended on the concentration of  $\text{As}_2\text{O}_3$ . For the two lowest concentrations of  $\text{As}_2\text{O}_3$  tested (0.1  $\mu\text{M}$  and 0.3  $\mu\text{M}$ ), the temporal signature of the CI variation followed closely the one obtained with the control group, with a slightly smaller CI at the end of the experiment. When 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{As}_2\text{O}_3$  was added, we measured a slight increase in the relative CI followed by a pseudo-plateau that lasted several hours before cells started to proliferate, and an even more pronounced decrease in the CI at the end of the experiment. Above 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{As}_2\text{O}_3$ , the temporal signature recorded in SH-SY5Y cells behaved as a bell-shaped curve which magnitude peaked at 10  $\mu\text{M}$ . When using 3  $\mu\text{M}$  of  $\text{As}_2\text{O}_3$ , the bell-shaped response was followed by a long plateau lasting approximately 28 h before the CI started to decrease. Above 3  $\mu\text{M}$   $\text{As}_2\text{O}_3$ , such a plateau no longer occurred. At these higher concentrations of  $\text{As}_2\text{O}_3$ , after an initial increase (primary response), the CI gradually decreased to the background (secondary response). This decrease in CI indicates that cells are dying due to the toxicity of  $\text{As}_2\text{O}_3$ , which causes them to detach from the gold electrode array. The onset of this decrease appeared more rapidly as the concentration of  $\text{As}_2\text{O}_3$  increased. Overall, the complex temporal profile of the CI variation indicates that  $\text{As}_2\text{O}_3$  above 1  $\mu\text{M}$  elicited a primary response in SH-SY5Y cells with an immediate increase in the CI. The fate of the cell culture then relies on the biochemical reactions elicited during this primary response with a switch between cell survival and cell death at around 2  $\mu\text{M}$   $\text{As}_2\text{O}_3$ .



**Figure 1.** Characterization of the response of SH-SY5Y cells under RF exposure alone or under co-exposure to RF and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. (A) Characterization of the normalized CI temporal signature of SH-SY5Y cells challenged with increasing concentrations of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The vertical dashed line indicates the time at which cells were either mock-challenged or challenged with the indicated concentration of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The data represent the average of four independent experiments. For better clarity, the measurement error is not represented. (B) Example of the CI temporal signature recorded from SH-SY5Y cell cultures that were either sham-exposed or exposed to unmodulated 1800 MHz (CW signal) at 24 W/kg. The vertical dashed line indicates the time at which cells were either mock-challenged or challenged with 10 μM As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The data represent the average of four independent experiments ± SEM values. (C) Statistical analysis of the effect of CW, GSM, Wi-Fi, LTE, and UMTS-modulated 1800 MHz signals emitted at either 5, 7.6, 11.3, or 24 W/kg on four metrics describing SH-SY5Y cells impedance measurement in the absence or presence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. First left column: average CI measured during the 5 h preceding injection of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or buffer. Second column to the left: magnitude of the CI increase in response to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Third column to the left: time at which 80% of the cell population died following As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection. Last column on the right: cell proliferation rate at day 3 in the absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The number of replicates per condition is indicated in Supplementary Table S1.

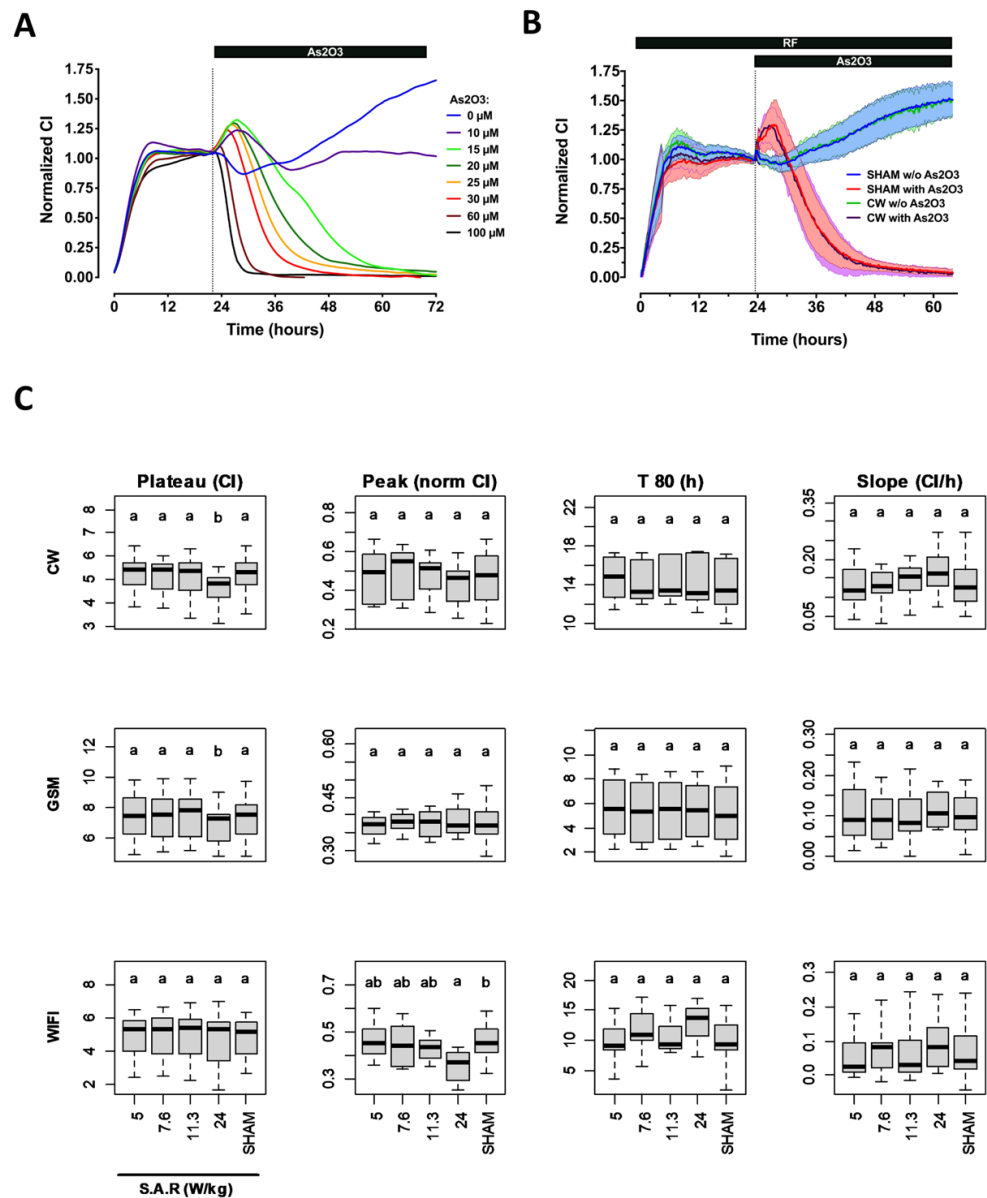
## 2.2. Effect of RF Exposure on SH-SY5Y Cell Behavior Assessed by Impedance Spectroscopy in the Presence or Absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Co-Exposure

We next assessed whether exposure to various 1800 MHz signals (CW, GSM, Wi-Fi, UMTS, and LTE) at S.A.R. of 5, 7.6, 11.3, and 24 W/kg impacted the temporal signature of the SH-SY5Y cells recorded in the absence or presence of 10  $\mu$ M As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. This concentration was chosen since it induced an intermediate temporal signature that allows the detection of either a positive or a negative effect of RF exposure on the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> efficacy to induce cell death in SH-SY5Y cells (Figure 1A). RF exposure started immediately after the cells were seeded in the wells of the xCELLigence plates, and continued throughout the experiment.

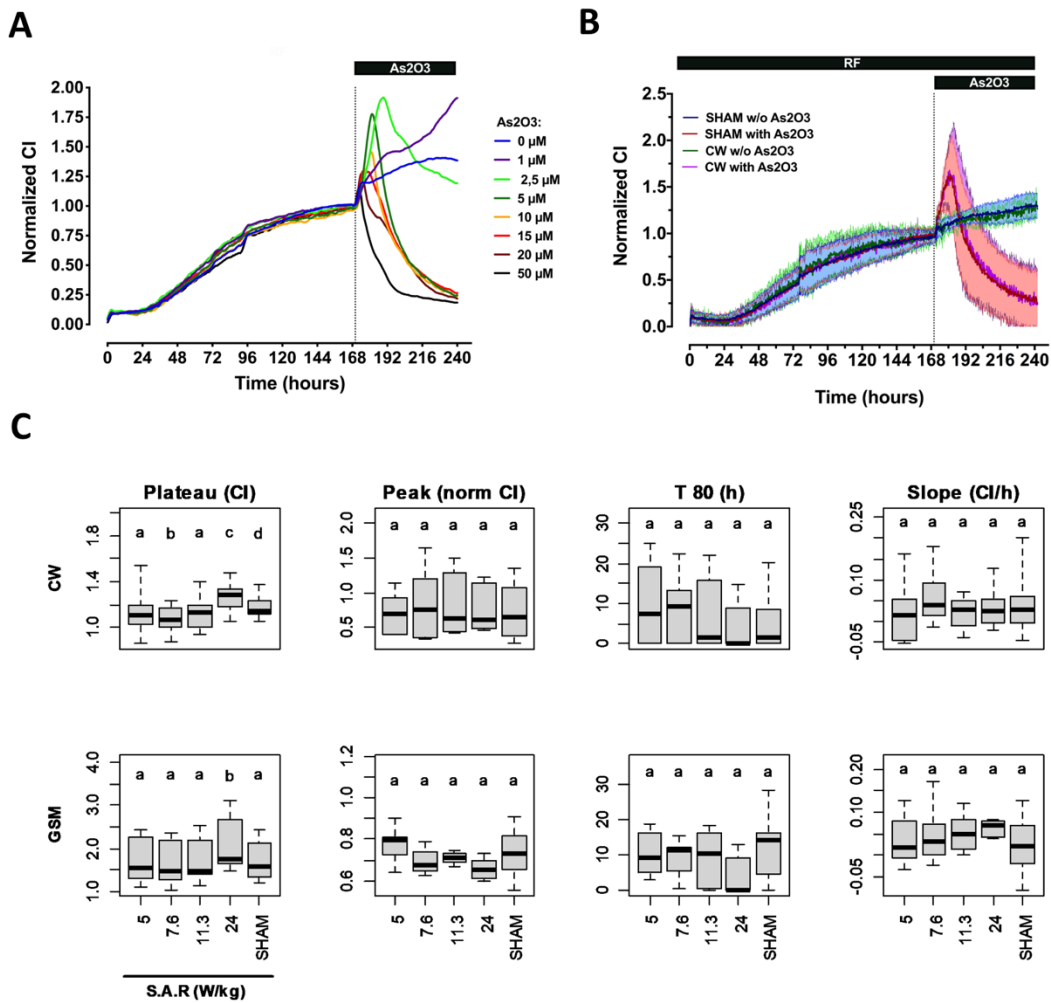
As exemplified in Figure 1B, there was no qualitative difference between the temporal signatures recorded from sham-exposed cells or cells exposed to a CW 1800 MHz RF signal, whatever SH-SY5Y cells were treated with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or mock-treated. Therefore, to quantitatively characterize the potential effect of RF alone or in co-exposure with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, we defined four metrics: (i) the relative quantity of cells that successfully attached and spread onto the interdigitated electrode array as measured by the average CI of the plateau phase acquired during the 5 h preceding injection of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or buffer (metric 1), (ii) the magnitude of the CI increase in response to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (metric 2), (iii) the time moment at which 80% of the cell population was dead following As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection (metric 3), and (iv) the cell proliferation rate obtained by measuring the slope of the growth phase recorded in the absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (metric 4). As shown in Figure 1C, we only measured minors but significant differences between sham and some exposed conditions when considering metric 1 (e.g., Wi-Fi and LTE signals on SH-SY5Y cells). The only other difference measured between sham- and exposed-conditions concerned a slight increase of SH-SY5Y cell proliferation rate in the absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (metric 4) under exposure to a Wi-Fi signal at 24 W/kg.

## 2.3. Effect of RF Exposure on Cortical Astrocytes and Neuron-Glia Co-Culture Cell Behavior Assessed by Impedance Spectroscopy in the Presence or Absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Co-Exposure

We next wanted to assess the potential effect of RF on the global behavior of primary astrocytes (Figure 2) and mixed cortical neuron-glia co-cultured cells (Figure 3). These cells are considered the ones most at risk when a cell phone is in the head proximity. Neonatal rats' cortex astrocytes and a neuron-glia co-culture were processed as the SH-SY5Y neuroblastoma cells. We first assessed whether the CI temporal variation of these primary cells was similar to the one observed with the SH-SY5Y cell line. Following the seeding of astrocytes in the xCELLigence plate wells, the CI increased rapidly until reaching a plateau approximately 10 h after the beginning of the experiment. At 22 h postseeding, astrocytes were then challenged with increasing concentrations of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or mock challenged, and the CI variation was measured up to 72 h postseeding (Figure 2A). As observed for the SH-SY5Y cells, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection induced a rapid and immediate bell-shaped variation of the CI index, with an initial increase (primary response) followed by a dramatic CI drop that decreased to zero for all concentrations tested except the lowest one (10  $\mu$ M). At that concentration, the magnitude of the primary response was already close to maximal, and cell growth resumed compared with the mock-activated condition. Above 10  $\mu$ M, the primary response's magnitude and length inversely varied with the increase in As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The highest and longest primary response was obtained with 15  $\mu$ M of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Above 15  $\mu$ M, both magnitude and duration of the primary response decreased while cells died more rapidly, as indicated by an early drop of the CI when As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> concentration increased.



**Figure 2.** Characterization of the response of primary astrocytes cells under RF exposure alone or under co-exposure to RF and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **(A)** Characterization of the CI temporal signature of primary rat astrocytes cells challenged with increasing concentrations of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The vertical dashed line indicates the time at which cells were either mock-challenged or challenged with the indicated concentration of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The data represent the average of three independent experiments. For better clarity, the measurement error is not represented. **(B)** Example of the normalized CI temporal signature recorded from primary astrocytes cell cultures that were either sham-exposed or exposed to unmodulated 1800 MHz (CW signal) at 24 W/kg. The vertical dashed line indicates when cells were either mock-challenged or challenged with 30 μM As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The data represent the average of 9 to 11 independent experiments ± SEM values. **(C)** Statistical analysis of the effect of CW, GSM, and Wi-Fi-modulated 1800 MHz signals emitted at 5, 7.6, 11.3, or 24 W/kg on four metrics describing primary astrocyte cells impedance measurement in presence or absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. First left column: average CI measured during the 5 h preceding injection of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or buffer. Second column to the left: magnitude of the CI increase in response to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Third column to the left: time at which 80% of the cell population died following As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection. Last column on the right: cell proliferation rate at day 3 in the absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The number of replicates per condition is indicated in Supplementary Table S1.



**Figure 3.** Characterization of the response of primary cortical cells co-culture under RF exposure alone or co-exposure to RF and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **(A)** Characterization of the CI temporal signature of primary cortical cells co-culture challenged with increasing concentrations of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The vertical dashed line indicates the time at which cells were either mock-challenged or challenged with the indicated concentration of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The data represent the average of three independent experiments. For better clarity, the measurement error is not represented. **(B)** Example of the normalized CI temporal signature recorded from primary cortical cells co-culture that were either sham-exposed or exposed to unmodulated 1800 MHz (CW signal) at 24 W/kg. The vertical dashed line indicates when cells were either mock-challenged or challenged with 5 μM As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The data represent the average of 5 to 6 independent experiments ± SEM values. **(C)** Statistical analysis of the effect of CW or GSM-modulated 1800 MHz signals emitted at 5, 7.6, 11.3, or 24 W/kg on four metrics describing primary cortical cells co-culture impedance measurement in absence or presence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. First left column: average CI measured during the 5 h preceding injection of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or buffer. Second column to the left: magnitude of the CI increase in response to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Third column to the left: time at which 80% of the cell population died following As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection. Last column on the right: Cell proliferation rate during the last day of the experiment in the absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The number of replicates per condition is indicated in Supplementary Table S1.

Assessing the temporal signature of neurons and glial cells co-culture needed longer experiments since the CI was very low during the initial plateau phase that followed cell seeding. At 24 h postseeding, the cortical cell culture showed a continuous increase in the CI due to the proliferation of glial cells [27] (Figure 3A). Culture media was thus refreshed 90 h postseeding, and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was injected in the culture media 170 h post seeding. Injection of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> again induced a complex response with an increase in cell culture growth rate

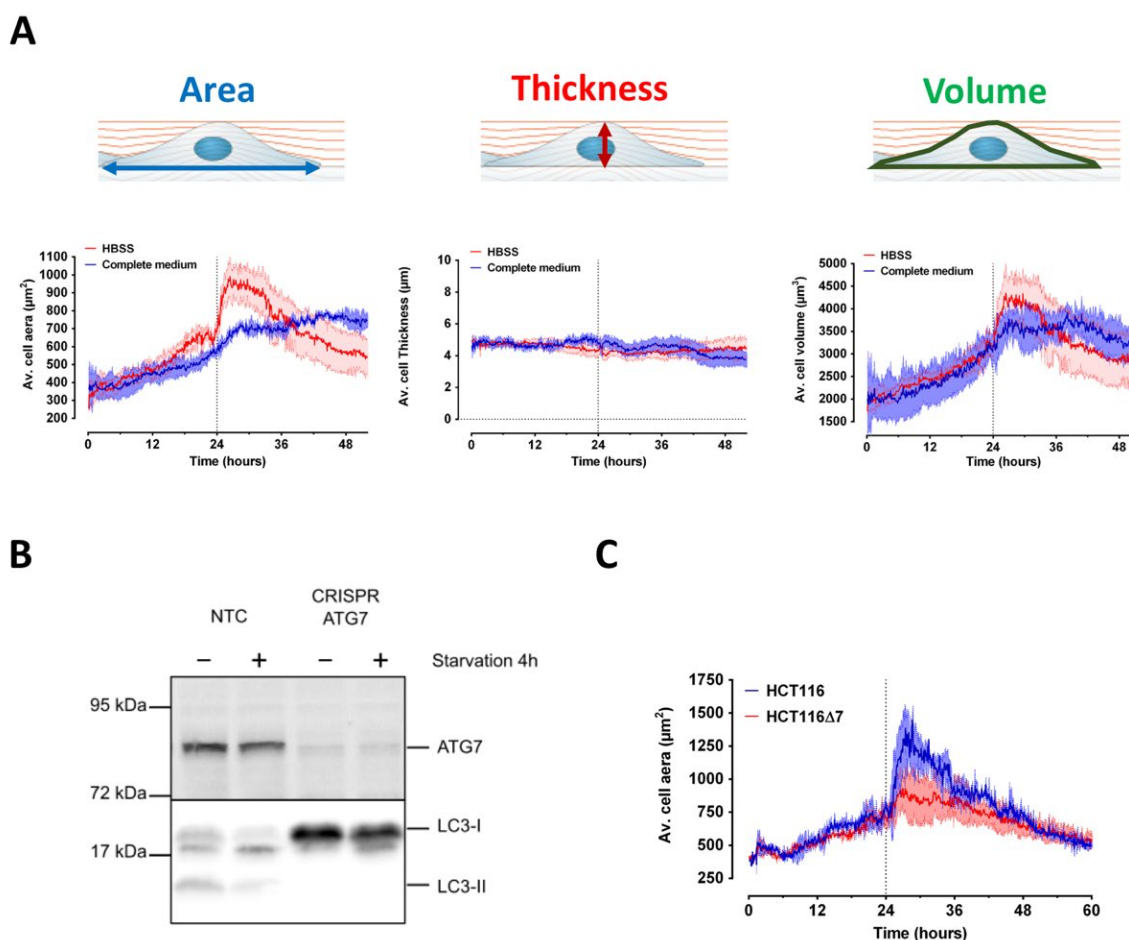


at the lowest concentration tested (1  $\mu\text{M}$ ) and a bell-shaped response above 1  $\mu\text{M}$ . The magnitude of the primary response was maximal at 2.5  $\mu\text{M}$  and then decreased with the increase in  $\text{As}_2\text{O}_3$  concentration. This decrease of the primary response to  $\text{As}_2\text{O}_3$  is due to a sooner onset of the CI decrease, indicating that increasing  $\text{As}_2\text{O}_3$  concentration accelerated cell death. In sharp contrast with what was observed on SH-SY5Y and astrocytes cells, we did not measure any difference in the shape of the CI decrease, except for the highest concentration of  $\text{As}_2\text{O}_3$ .

Based on these concentration-response data, we used  $\text{As}_2\text{O}_3$  concentrations of 5 and 30  $\mu\text{M}$ , to trigger an intermediate response within the cortical cells co-culture and the astrocytes culture respectively. Of note, mock activation induced a moderate and transient change of the cortical cells co-culture temporal signature, indicating that physical constraints such as shear stress can modify cortical cell growth or behavior. Having characterized the temporal signature of the CI variation in astrocytes and cortical cells co-cultures in the presence or absence of a suboptimal concentration of  $\text{As}_2\text{O}_3$ , we assessed whether RF exposure modified such signals. As shown in Figures 2B and 3B for both primary cell cultures, whether or not cells were challenged with  $\text{As}_2\text{O}_3$ , no qualitative differences were shown when comparing the temporal signature of the CI variation in cells exposed to 1800 MHz CW signal at 24 W/kg and in sham-exposed cells. This was confirmed by the lack of differences between RF and sham conditions for almost all metrics considered (Figures 2C and 3C). We only measured a small but significant variation of the CI reached before  $\text{As}_2\text{O}_3$  or mock injection (metric 1) when astrocytes and cortical cell co-cultures were exposed to CW or GSM-modulated 1800 MHz signals at 24 W/kg. Under those conditions, the CI decreased slightly in RF-exposed astrocytes and increased slightly in RF-exposed cortical cell co-culture. This parameter was not impacted when astrocyte cells were exposed to Wi-Fi-modulated 1800 MHz signals, whatever S.A.R. was used. We also measured a slight decrease of the primary response magnitude (metric 2) following  $\text{As}_2\text{O}_3$  treatment of astrocytes cells exposed to Wi-Fi signal.

#### *2.4. Characterization of Serum Starvation-Induced Autophagy in HCT116 Colon Cancer Cells Using Digital Holographic Microscopy*

In a complementary label-free approach, we combined a TEM cell, previously adapted for microscopy [22,24], with digital holographic microscopy (DHM) to assess whether RF exposure could impact cell autophagy (see Material and Methods). Thanks to this setup, the morphology of HCT116 cells, a well-known model for the study of autophagy induced by serum-deprivation [25], was first assessed in absence of RF exposure (Figure 4). The evolution of various parameters such as cells thickness, volume and contact area of cells with culture plate were derived from the DHM images. As shown in Figure 4A, both HCT116 cells average area and volume slowly increased over time reaching a plateau at approximately 28 h after the beginning of the experiment. Refreshing the cell culture media (control condition with complete medium) did not induce any detectable perturbation in the average cell volume and area temporal evolution. Interestingly, the thickness of the cells varied only once the culture medium was refreshed, decreasing slightly with a wave-like pattern. Replacing the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) complete culture medium (see Material and Methods for culture conditions) with serum-free Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), a treatment known to induce autophagy in HCT116 cancer colon cells [25], elicited an immediate response which led to a significant change in cell morphology (Figure 4A). During the first 6 h following serum deprivation, the cell area increased dramatically compared to the control condition. Then, after reaching a peak, the cell area suddenly decreased progressively to a value lower than that measured under control conditions. The temporal evolution of the average cell volume followed a similar although less marked pattern. The average cell thickness remained, however, unchanged after serum deprivation.



**Figure 4.** Effect of serum deprivation-induced autophagy on HCT116 cells area, thickness, and volume assessed by DHM. (A) HCT116 cells were left in culture for 24 h before the culture medium was either refreshed or replaced with HBSS serum-free medium at the time indicated with a vertical dashed line. DHM measurement of HCT116 cells area (left column), thickness (middle column), or volume (right column) was performed throughout the experiment that lasted up to 55 h. The data represents average of three to four independent experiments  $\pm$  SEM values. (B) Functional validation of autophagy-deficient HCT116 cells: HCT116 cells transduced with non targeting sg-RNA (NTC) or with ATG7 sg-RNA (CRISPR-ATG7) were grown in complete medium or transferred to HBSS for 4 h (serum deprivation induced autophagy). The efficiency of ATG7 gene edition was verified by western blot on the top panel (Cell Signaling Rabbit monoclonal antibody D12B11). The absence of lipidation of the autophagy protein LC3-I into PE-conjugated LC3-II in HCT116-CRISPR-ATG7 cells confirms that autophagy was functionally impaired in these cells compared to NTC cells (bottom panel—Sigma anti-LC3B rabbit antibody L7543). (C) HCT116 or HCT116-CRISPR-ATG7 cells were left in culture for 24h before the culture medium was replaced with HBSS serum-free medium at the time indicated with a vertical dashed line. Cells area was measured throughout the experiment using DHM. The data represents the average of three independent experiments  $\pm$  SEM values.

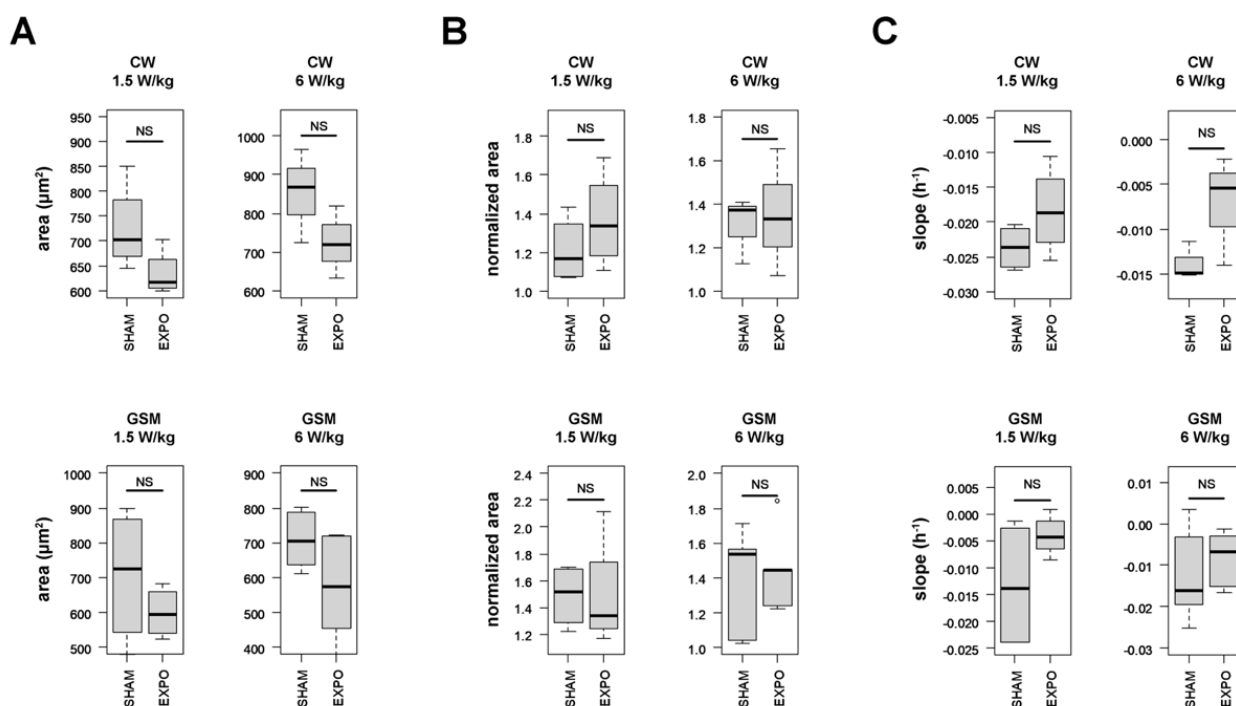
To assess whether the initial increase in the average cell area is indicative of an autophagic response, we generated the HCT116-CRISPR-ATG7 cell line that does not express the ATG7 gene (Figure 4B), which is mandatory to promote autophagy [28]. As expected, ATG7 knock-out rendered the HCT116-CRISPR-ATG7 cell line deficient for autophagy as demonstrated by the abrogation of LC3-I/II conversion following serum deprivation by replacement of the DMEM culture medium by HBSS buffer (Figure 4B). As shown in Figure 4C, in contrast to the wild-type HCT116 cells, the initial increase of the average cell area measured during the first six hours following serum deprivation was abolished in HCT116-CRISPR-ATG7 cells. Instead, serum deprivation induced a slow



decrease of the HCT116-CRISPR-ATG7 average cell area which continued until the end of the recording, reaching a similar value to the control cell line. This last result indicates that the autophagic process in serum-deprived HCT116 cells is accompanied by an increase in the cell area in contact with the cell culture plate. Cell volume also increased during the first six hours following serum deprivation while the thickness of the cells remained constant. The cell area decrease observed after this initial response likely reflects the cell failure to overcome the absence of serum and the subsequent cell death. The median value of the cell area measured during the last 3 h before serum deprivation, the relative magnitude of the autophagic response during the 3 h following serum deprivation, and the cell death rate in the last 20 h of the experiments represent therefore good indicators for quantitatively evaluating the HCT116 cell signature in our experiments.

### 2.5. Effect of RF Exposure on the Autophagic Response of HCT116 Cells

We then assessed the impact of RF exposure on autophagy in HCT116 cells. The cells were sham-exposed or exposed to CW or GSM-modulated 1800 MHz signals at 1.5 and 6 W/kg, two levels that are slightly below and above the guidelines, respectively. The average cell area was measured in real-time under sham or RF exposure before and after serum deprivation, which occurred 24 h after the beginning of RF exposure. Whatever the signal considered and whatever the specific absorption rate (S.A.R.) considered, we could measure a slight decrease of both the median cell area measured during the last 3 h before serum deprivation (Figure 5A) and the cell death rate during the last 20 h of the experiment (Figure 5C). Nonetheless, none of these effects reached statistical significance. The magnitude of the autophagic response following serum deprivation remained unchanged under RF exposure (Figure 5B).



**Figure 5.** Statistical analysis of the effect of CW (upper panels) and GSM (lower panels)—modulated 1800 MHz signals emitted at either 1.5 or 6 W/kg on the average cell area measured during the last four hours before serum deprivation (A), the relative magnitude of the autophagic response during the 6 h following serum deprivation (B), and the cell death rate in the last 20 h of the experiments (C). Three to four biological replicates were performed for each experimental condition. NS: the difference is not significant between “SHAM” and “EXPO” conditions.

### 3. Discussion

It remains controversial whether exposure to environmental radiofrequency signals impacts cell status or response to cellular stress such as apoptosis or autophagy. We here took advantage of the impedancemetry and holographic microscopy techniques to assess the overall cellular response during RF exposure alone or during co-exposure to RF and chemical treatments known to induce either apoptosis or autophagy.

Regarding the cell types used in our study (e.g., SH-SY5Y human glioblastoma cell line, HCT116 human colon cancer cells, rat primary astrocytes and rat primary neurons—glia co-culture), many research groups have evaluated the potential impact of RF signals on cell proliferation or cell death, including apoptosis and autophagy.

Ten studies reported experiments in which cell proliferation and/or cell death were studied in SH-SY5Y cells exposed to RF-EMF [29–38]. Half of these studies exposed SH-SY5Y cells to RF-EMF in the 872–935 MHz band, while the other studies were in the 1760–2100 MHz band. In addition, half of the studies focused on CW or GSM-modulated signals, while the others used pulsed, intermittent, W-CDMA, or LTE modulated signals. The S.A.R. levels ranged from 0.086 W/kg [38] to 5W/kg [34], and the duration of exposure was from several minutes [35] to 3 days [32]. Eight studies reported no effect of RF-EMF exposure on apoptosis [29–31,38], cell proliferation [33,34], cell viability [36], or cell differentiation [37]. Only two studies reported that RF-EMF exposure impacted SH-SY5Y cell proliferation after a 24 h exposure to a GSM modulated 900 MHz signal at 1 W/kg [35] or after a 72 h exposure to an LTE-modulated 1760 MHz signal at 2 W/kg [32]. Of note, two studies from the Scarfi group described that SH-SY5Y cells previously exposed for 20 h to an UMTS-modulated 1950 MHz signal at 0.3 W/kg developed an adaptive response to subsequent treatment with menadione [39,40]. While in our study we also exposed SH-SY5Y cells to RF for a similar duration before challenging cells with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, we did not measure any effect related to an adaptive response in our experimental conditions. Both studies cannot however be compared since we used a very different RF signal (in terms of carrier wave frequency, S.A.R., and modulation) and since we challenged cells with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> instead of menadione. Whether our xCELL-RF setup could help investigating an RF-induced adaptive response in SH-SY5Y cells or other cell types needs to be evaluated in future studies.

Two research articles described the effect of various RF signals on human colon cancer HCT116 cells. First, the impact of high power and short duration oscillatory pulses of electromagnetic fields with a signal frequency of either 150 or 1500 MHz on various biological parameters, including cell growth and apoptosis, was investigated by Gibot et al. (2019) without showing any significant effect [41]. More recently, Ozgur et al. (2021) showed increased apoptosis and inflammatory response in HCT116 cells exposed for 1 and 4 h to an intermittent (15 min on / 15 min off) GSM-EDGE modulated signals at 900, 1.800, and 2.100 MHz at 2 W/kg [42]. However, no numerical dosimetry was performed in this research work, and the temperature of the culture medium during exposure was not monitored, casting doubt on the occurrence of a non-thermal effect.

Regarding the effects of RF on primary cell cultures from brain origin, nine articles reported the effects of 900, 1800, and 1950 MHz RF signals on neonatal cortical cells [43–47], microglial cells and astrocytes [46,48,49], embryonic neural stem cells [50,51], and spiral ganglion neurons [48]. Six of these studies focused on GSM-modulated signals, while the others used either a CW signal or a TD-SDMA-modulated signal. The S.A.R. used ranged from 0.25 W/kg [46,50,51] to 5.36 W/kg [49] and the duration of exposure ranged from 15 min [51] to 3 days [50]. Six studies reported no effects of RF exposure on cell proliferation, cell viability, apoptosis, or autophagy [43,46–48,50,51]. A small but significant increase in autophagy could be measured when spiral ganglion neurons were co-exposed to lipopolysaccharide and an intermittent (5 min on/10 min off) GSM-modulated 1800 MHz signal emitted at 4 W/kg for 24 h [48]. A decrease in neonatal cortical cells viability was measured by Zhu et al. (2008) after exposure of the ex-vivo cell culture to a 900 MHz signal at 0.1 mW/cm<sup>2</sup> [44]. Unfortunately, in this last article, the exposure system was ill-defined and the modulation of the signal was not indicated, preventing any conclusion. In the study

by [51], differentiation was highly diminished in neural stem cells but not in astrocytes, following exposure to a GSM-modulated 900 MHz signal emitted for 2 h at a 2.287 W/kg using a GSM mobile phone simulator. Again, the lack of proper characterization of the exposure system precluded any conclusion regarding the reported effects. In the study by Joubert et al. (2008), an increased apoptosis rate was measured in rat primary cortical neuronal cultures exposed to 900 MHz CW RF fields for 24 h at 2 W/kg [45]. Interestingly, this effect was more pronounced 24 h after exposure. The authors indicated that, despite state-of-the-art dosimetry of their experiments and assessment of temperature bias, thermal effects of the RF field at the interface between the culture medium and the support could not be ruled out. In the study by Liu et al. (2012), a marked decrease in cell proliferation, increased cell apoptosis, and morphological changes in the cells were detected in mouse primary astrocytes after 48 h of exposure to 1950-MHz TD-SCDMA at 5.36 W/kg [49]. The RF-EMF were emitted from a calibrated standard dipole, but no numerical dosimetry of the exposure was described. Moreover, no details were given about the temperature regulation of the cell plate. Therefore, it might be possible that local thermal effects caused the cells to undergo apoptosis.

Overall, most of the studies herein discussed have shown no effects on apoptosis, autophagy, or cell proliferation following in vitro exposure of either SH-SY5Y and HCT116 cell lines or primary culture from rodent brain. Furthermore, many of the studies showing an effect are questionable in terms of exposure condition characterization, which casts doubts on the reports of a pure non-thermal effect. Some research groups have emphasized the negative association between the outcome of cellular response in bioelectromagnetics studies and the quality of the experimental procedures, particularly the exposure conditions [52]. Nonetheless, many studies mentioned above relied on endpoints measured after various exposure durations. Consequently, such studies may have missed a transient effect due to RF exposure.

In our study, both impedancemetry and holographic microscopy techniques gave access to the temporal variation of different endpoints in cell cultures under RF exposure, thus precluding to overlook any transient effect of RF exposure. Using impedancemetry, any response that induces changes in cell morphology (size, volume, shape, or spreading), cell number (proliferation or death), or movement (migration or extravasation) are investigated through the monitoring of a unique index. The setup design allows simultaneous measurement of multiple wells, including sham-exposed and RF-exposed cells at four different S.A.R. Digital holographic microscopy gives access to a more precise analysis of the cell phenotype since, in addition to cell proliferation, we can measure about twenty different parameters in real-time, including cell volume, length, and area. However, we measured only one sample per microscope under sham or RF exposure.

Using impedancemetry, we measured the effects of five signals (CW, GSM, Wi-Fi, UMTS, and LTE) on SH-SY5Y cells, three different signals on astrocytes (CW, GSM, and Wi-Fi), and two signals on cortical neurons and glial cells (CW and GSM). The exposure lasted 70 h for SH-SY5Y and astrocytes and 110 h for co-cultured cortical neurons and glial cells. Each time, the effect of a given signal was measured simultaneously at four levels above the guidelines (5, 7.6, 11.3, and 24 W/kg) in addition to the sham condition. All assays were performed in the absence or presence of a suboptimal concentration of  $As_2O_3$  to assess both the effects of RF alone and a potential effect of co-exposure to RF with a chemical stressor. Consequently, 110 different experimental conditions were tested. We measured four different metrics on the acquired temporal signatures, that describe the cell behavior at critical time points and give insights into how RF could have impacted (i) cells adherence and spreading, (ii) the capacity of the cells to respond to  $As_2O_3$ , (iii) cell death rate following  $As_2O_3$  injection, and (iv) cell proliferation rate in the absence of  $As_2O_3$ . Our results indicate that, whatever the RF signal, S.A.R., or the cell type considered, there is almost no difference in the capacity of the cells to respond to  $As_2O_3$  (metrics 2 and 3) and in cell proliferation rate (metric 4). We only measured a ~20% decrease in the amplitude of the initial CI increase occurring following  $As_2O_3$  injection (primary response)

when astrocytes were exposed to a Wi-Fi signal at 24 W/kg, and an increase of the cell proliferation rate when SH-SY5Y cells were exposed also to Wi-Fi signal at 24 W/kg. Slight but statistically significant variations were however measured for cell attachment and cell spreading (metric 1) between sham and exposed conditions, especially at 24 W/kg, a value significantly higher than the guidelines. This can be due to an increase in the metallic losses of the electrodes. Whatever the experimental conditions considered, no transient effect of RF exposure on the temporal signature of both resting and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-challenged cells was observed.

In a further effort to unravel potential RF effects on resting and stressed cells, we also used DHM to study the effect of CW or GSM-modulated 1800 MHz RF-EMF, at 1.5 and 6 W/kg, on HCT116 colon cancer cell lines. We selected this cell line since it is a well-known model to study autophagy in serum deprived conditions [25]. We first assessed whether DHM was prone to detect phenotypic changes in autophagic cells following serum deprivation. Using DHM, we measured the average HCT116 cell volume, thickness, and area before and after serum deprivation. All these parameters are informative to discriminate between apoptosis and necrosis, the two different types of cell death, but nothing has been described so far for autophagy [53]. According to Alm et al. (2013) [53], a decrease in cell area with a slight increase in volume and thickness occur at the onset of the apoptosis process. Following this first transient response, the thickness of cells increases gradually until reaching a plateau and finally decreases, while both cells area and volume concomitantly and continuously decrease. This indicates that cells basis shrinks during apoptosis while the cells bodies stretch and fragment. The temporal signature of necrosis is slightly different with a decrease of both thickness and volume but with an increase in cells area. This indicates that during necrosis, contrary to apoptosis, the cells spread out and flatten while dying [53]. We here complete the observations of Alm et al. [53] by describing the temporal signature of autophagy. Autophagy is characterized by a first transient response where both the average cell areas and volumes transiently and rapidly increase following serum privation. From the molecular standpoint, autophagy onset in response to stress is known to be very fast, as it only takes 20 min to form functional autophagosomes. Our study analyses autophagy from the morphological standpoint, and shows that three-to-four hours following serum deprivation, both average cell areas and volumes reach a plateau and then continuously decrease until the end of the experiment. During this process, the thickness of the cells remains almost identical, indicating that the basis of the autophagic cells enlarges before contracting. Notably, the first transient response (an increase in average cell volume, characterized by a broader cell basis and no change in cell thickness) was not observed in HCT116-CRISPR-ATG7 autophagy-deficient cells, thereby showing the specificity of our read-out. After this first period, the time signatures for HCT116 WT and HCT116-CRISPR-ATG7 overlap, probably indicating that the autophagic process did not compensate for the lack of nutrients, leading to cell death.

In a second step, we assessed the impact of RF fields on healthy and autophagic cells by measuring the cell area which was the lead parameter for assessing the autophagic response. Wild-type HCT116 cells were continuously exposed under CW or GSM-modulated 1800 MHz signals at 1.5 and 6 W/kg for 24 h before autophagy was triggered by serum deprivation. In addition, the temporal signature of both sham and RF-exposed HCT116 cells was measured for a further 36 h. Quantitative analysis of the temporal signature revealed that RF exposure, whatever the signal or the S.A.R. considered, slightly decreased both average cell area before serum deprivation and cell death rate in the last 20 h of the experiments, with no change in the autophagic response. Such difference nonetheless did not reach statistical significance.

Overall, our time-resolved analysis under experimental conditions where the temperature was kept constant did not show any effects of RF on the cellular response in healthy, apoptotic, or autophagic cells, even at S.A.R. levels above the international guidelines. Further studies complying with rigorous and standardized experimental methodology [52,54] will help consolidate our findings.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Reagents

Arsenic trioxide (ATO, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) was acquired from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

### 4.2. Cell Culture

Undifferentiated SH-SY5Y cell line (ATCC, Cat. No. CRL2266, Manassas, VA, USA) cells were cultured in Dulbecco's minimal essential medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) with 15% fetal bovine serum, 1% non-Essential Amino Acids supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

HCT116 human colorectal carcinoma cells were initially obtained from Dr. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA). Using the lentiCRISPR system detailed in O'Prey et al. (2017) [55], HCT116 cells deleted for ATG7, and therefore deficient for autophagy (noted HCT116-CRISPR-ATG7) were generated. Both HCT116 and HCT116-CRISPR-ATG7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM, Cat. No. D6429; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units ml<sup>-1</sup> penicillin, and streptomycin.

The primary neuronal cells were obtained from the cortex of embryonic (E18) Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France). After 5% isoflurane anesthesia, the gestating rat was sacrificed by elongation. Next, embryo cortices were dissected in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-penicillin/streptomycin (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and treated for 30 min with an enzymatic solution containing 20 units ml<sup>-1</sup> of papain and 0.005% of DNase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, CO, USA). The fragments were then subjected to mechanical dissociation using a 10-mL serological pipette and centrifuged at 300 × g for 5 min at room temperature. Next, the supernatant was eliminated, and the pellet was resuspended in a solution with DNase. This latter mixture was placed above an albumin-inhibitor solution to create a discontinuous density gradient and then centrifuged at 70 × g for 6 min at room temperature. In this last step, the dissociated cells (in the pellet) were separated from membrane fragments of dead cells in the supernatant. Finally, the pellet containing cortical cells was suspended in the culture medium composed of neurobasal medium supplemented with 2% B-27, 1% GlutaMAX, and 1% penicillin/streptomycin (Fisher Scientific). Each well was plated with a suspension of 200,000 cells in 100 µL. Laminin (L2020, Sigma-Aldrich, St. Quentin-Fallavier, France) was used at the concentration of 50 µg/mL to coat xCELLigence wells 3 h before seeding to promote attachment of primary neurons cells.

Rat primary cortical astrocytes (N7745100, Thermo Fisher Scientific) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Fisher Scientific). Cells were seeded at a density of 20,000 cells per well in an xCELLigence E-plate 16 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). No coating was used to promote the attachment of primary astrocytes.

When indicated, apoptosis was induced in SH-SY5Y cells, astrocytes, and co-culture of neurons and glial cells by adding As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> directly in the culture media at the indicated concentration. Autophagy was induced in HCT116 cells by serum deprivation following replacement of the DMEM nutrient rich culture medium by Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Cat. No. 14025092; Thermo Fisher Scientific) containing 1 g/L Glucose and buffered with NaHCO<sub>3</sub> (2.2 g/L) [25].

### 4.3. Cellular Impedance Assay

Cellular impedance measurement of global cellular activity was monitored in a humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C using the xCELLigence apparatus (Agilent). Using this setup, changes induced in the local ionic environment at the electrode/solution interface yield an increase in electrode impedance. Changes in cell morphology and/or adhesion that modulate the physical contact between cells and electrodes are reflected in impedance



changes. The change in impedance is reported as a dimensionless parameter called Cell Index (*CI*) according to Equation (1):

$$CI = \frac{\text{impedance at time point } n - \text{impedance without cells}}{\text{nominal impedance}} \quad (1)$$

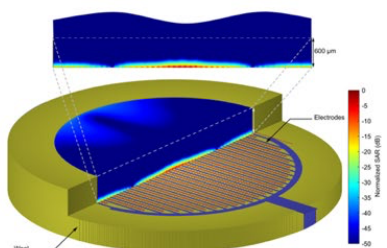
As no commercial system allowed cellular impedance measurement under RF exposure, we adapted the xCELLigence apparatus to our requirement. Using a parallel electrical circuitry bridging the RF signal generator to the gold connectors of the xCELLigence plates, we simultaneously performed impedance measurement while delivering the RF signals (CW, GSM, Wi-Fi, UMTS, and LTE) to the attached cells. The numerical and experimental dosimetry and the setup of the exposure system formed by the xCELLigence and RF devices (xCELL-RF) were presented in detail in Garcia-Fernandez et al. (2016) [15]. We used the internal design of our xCELL-RF setup to deliver 1800 MHz RF signals at various input powers resulting in S.A.R.s of 5, 7.6, 11.3, and 24 W/kg.

A vector generator (SMBV100A, Rohde & Schwarz, Munich, Germany) delivering 1800 MHz RF signals was connected to a bidirectional coupler (ZGBDC30-372HP+, Mini-circuits, Brooklyn, NY, USA). The coupler was followed by a 2-way power splitter (PE2088, Pasternack, Irvine, CA, USA), and each way was connected to a 3-way power splitter (PE2090, Pasternack) which delivered the required powers to the xCELLigence Eplate (Figure 6A). The setup's incident and reflected powers were monitored using two power sensors (N1921A, Agilent, Santa Clara, CA, USA) and a power meter (Agilent) connected to the bidirectional coupler. High values of RF electric field and S.A.R. are mainly localized in the proximity of the electrodes and within the cells layer, as attested by Finite Difference Time Domain (FDTD)-based numerical dosimetry (Figure 6B).

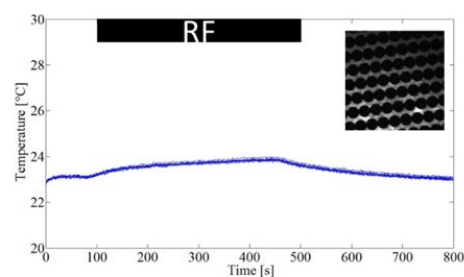
**A**



**B**



**C**



**Figure 6.** xCELL-RF system for simultaneous RF exposure and impedance measurements of cells. (A) xCELL-RF device with the RF connections to the dock. (B) Normalized S.A.R. distribution in the delivery system at 1800 MHz. For better readability, only half of the S.A.R. distribution and a vertical cut plane (top inset) are represented on the figure. (C) Experimental measurement of temperature elevation at the cell level using a S.A.R. of 240 W/kg, inset: example of picture acquired during temperature measurement.

The temperature variation was measured using an optical probe (Luxtron, Santa Clara, CA, USA). The temperature at the cell level was increased by 0.5 °C when the culture dish was exposed at the high S.A.R. value of 240 W/kg (Figure 1C). This slight temperature increase associated with a high S.A.R. value is due to the rapid heating diffusion by the whole culture media that buffered the temperature increase. The temperature at the cell level during exposure to RF at 24 W/kg monitored in a separate experiment did not evidenced any detectable variation.

The E16 xCELLigence plates were prepared by adding cells in a complete medium (100 µL) as indicated in the cell culture section. When indicated, 100 µL of PBS buffer or a 2X ATO solution was added to the culture medium.

#### 4.4. Impedance Data Analysis

Four metrics were defined to characterize the possible effects of applied physical and chemical stimuli on the evolution of cell indexes.

Metric 1 (post-seeding plateau) is the median value of cell index in the 5 h preceding the moment of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection. This metric highlights a possible effect of the exposures on the cell index before the injection of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

The three following metrics were calculated on normalized data, taking the time of the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection as a reference point (with a relative value of 1). The metric 2 (peak) is the maximal CI variation following As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection. Metric 3 (T80) was calculated only for experiments with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection and represents the time at which CI decreased by 80% following As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection. Finally, metric 4 (slope) is calculated only on experiments without As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> injection (chemical sham) and represents the slope of the cell index increase during the last 10 h of the experiments.

#### 4.5. Exposure to RF and Holographic Image Acquisition

Digital holographic microscopy images were obtained using a HoloMonitor<sup>®</sup> M4, (Phase Holographic Imaging AB (PHIAB), Lund, Sweden).

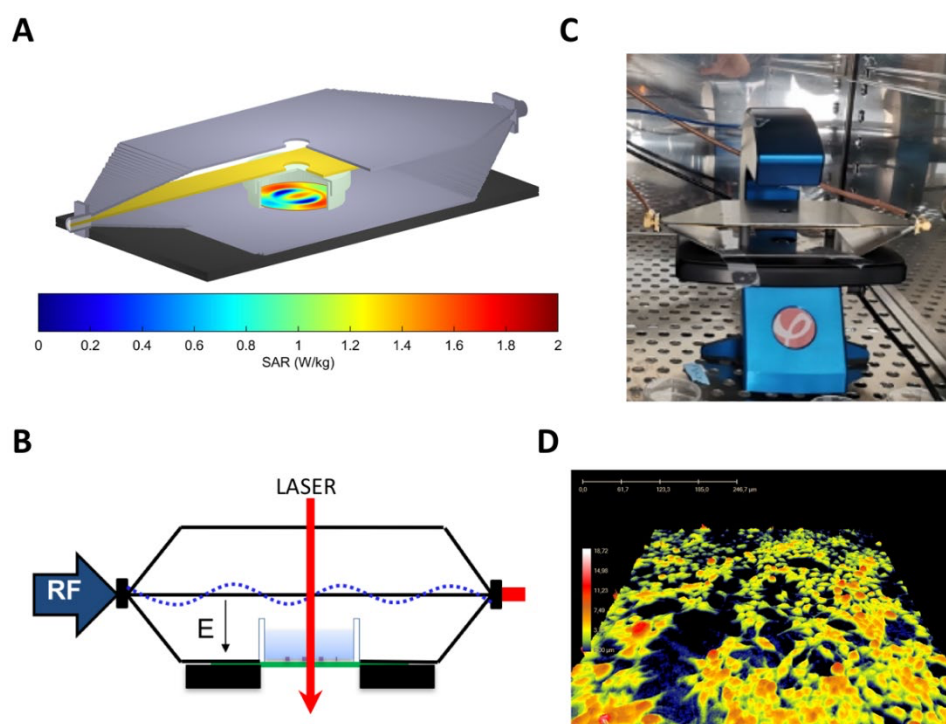
The RF exposure system was a tri-plate open transverse electromagnetic (TEM) cell allowing RF signals propagation [56]. Both TEM cell ground plates had apertures to allow for light propagation through the cell culture. Numerical modeling and simulations of aperture's effect on cell exposure were performed as described previously [22,24]. A vector generator (SMBV100A, Rohde & Schwarz, Munich, Germany) connected to a 10-W amplifier (RF14002600-10, RFPA, Artigues-Près-Bordeaux, France) with around 40-dB gain was used to deliver 1800 MHz RF signals (CW and GSM) to the exposure system.

The effect of CW and GSM-modulated signals, using an 1800 MHz carrier wave, at S.A.R. of 1.5 and 6 W/kg was studied. Experimental dosimetry was carried out using temperature assessment measured with an optical probe (Luxtron). Numerical simulations with an in-house FDTD allowed the extraction of S.A.R. distribution at the cell layer level within the Petri dish exposed in the TEM cell (Figure 7A). The cell culture medium temperature increased by 0.5 ± 0.1 °C at 1.5 W/kg and 2 ± 0.1 °C at 6 W/kg during the first hour of exposure. The cell culture incubator temperature was decreased accordingly to maintain the cell culture medium temperature at 37 °C during RF exposure, as verified in a separate experiment using an optical probe (Luxtron). Cells were temperature equilibrated for several hours before the experiment started.

DHM images were acquired over a small area in the Petri dish center where the S.A.R. is homogenous (Figure 7B).

Twenty-four hours before exposure, cells were seeded at a density of 300,000 cells in a 35 mm petri dish and left in culture in a humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C. On the day of the experiment, the Petri dishes' lid was replaced by a HoloLid<sup>™</sup> (PHIAB). Next, cell culture dishes were placed in an exposure system within the HoloMonitor<sup>®</sup> M4 platforms (PHIAB) (Figure 7C). Two identical setups were used for sham and RF-exposure conditions, but no RF was delivered to the sham condition's cell culture.

A time-lapse movie was created using the software H-studio™ (PHIAB) for both RF- and sham-exposure, with one capture taken every 5 min for up to 72 h in total in a humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C (Figure 7D). The effect of CW and GSM-modulated signals (using an 1800 MHz carrier wave) at 1.5 and 6 W/kg was studied. Twenty-four hours after the start of the exposure phase, the culture medium was replaced with 4 mL HBSS medium without fetal bovine serum (serum deprivation) to trigger autophagy [57]. Average cell area, cell volume, and cell thickness were computed using the software H-studio™.



**Figure 7.** Experimental device for exposing cells to RF while acquiring digital holographic microscopic images. (A) Normalized S.A.R. distribution at the cell level in the delivery system at 1800 MHz. (B) Cross-section of the TEM cell in which a cell culture dish has been placed. The picture indicates the propagation of the RF electric field and the LASER path only at the center of the cell culture plate. (C) Photography of the TEM cell placed on the HoloMonitor M4 platform. A hole has been drilled in both ground planes and septum of the TEM cell to allow light to go through the cell culture. (D) Example of a digital holographic microscopy image of a SH-SY5Y cell culture. The color scale provides information on the height of the cells.

#### 4.6. DHM Data Analysis

Three metrics were used to analyze the DHM data. Metric 1 describes the median value of the signal in a 3 h interval before serum deprivation. Metric 2 is the median value of the signal during the 3 h after the media change. Metric 3 is the slope calculated by linear regression in a time interval corresponding to 40 to 60 h after the beginning of the RF exposure.

Metric 1 is calculated on the raw signal values. Metrics 2 and 3 are calculated on the normalized data, following normalization of the average cell area to 1 at time  $t = 24$  h.

#### 4.7. Statistics

Two samples comparisons were made using Wilcoxon signed-rank test. Multiple comparisons were made using Kruskal-Wallis tests and posthoc Conover tests. The significance results are all given at the  $\alpha = 5\%$  risk. The tools used for these analyses were the R



language [58] and the following packages: tidyverse [59], FreqProf [60], stringi [61], and PMCMRplus [62].

Statistically significant differences between pairwise comparisons resulting from post hoc tests are labeled with letters (a, b, c...). This compact letter representation (CLD) is a method for correctly representing significance statements resulting from pairwise comparisons: for example, the graph with “ab” is not significantly different from a graph labeled with “a” or “b” but is statistically different from a graph labeled with “c” [63].

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23020658/s1>.

**Author Contributions:** Participated in research design: M.P., P.L., I.L., D.A.-C. and Y.P.; conducted experiments: A.J., Y.L.C., F.P.d.G., A.H., R.R., H.J.R., A.C., L.P. and M.D. Performed data analysis: A.G., A.J., R.R., H.J.R. and Y.P. Wrote or contributed to the writing of the manuscript: A.J., A.G., I.L., P.L., N.L., D.A.-C., M.P. and Y.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The research leading to these results received funding from the European Community’s Seventh Framework Program (FP7/2007–2013) under grant agreement no. 603794 (the GERONIMO project), the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES) under grant agreement EST-2015/2 RF/19 (the MOTUS project) and 2017/2 RF/012 (the ADAPT project), and from the New Aquitaine regional council under grant agreement 2017-1R50217-00013458 (the EFISIA project).

**Institutional Review Board Statement:** All procedures were carried out in compliance with the European Community Council Directive for the Care and Use of laboratory animals (2010/63/EU) and protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation CEEA 50 of Bordeaux.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are available upon request by writing to the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank Bernard Veyret for his wise advice and proofreading of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

1. SSM’s Scientific Council on Electromagnetic Fields. *Recent Research on EMF and Health Risk-Fourteenth Report from SSM’s Scientific Council on Electromagnetic Fields, 2019*; Swedish Radiation Safety Authority: Stockholm, Sweden, 2020.
2. ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to electromagnetic fields (100 KHz to 300 GHz). *Health Phys.* **2020**, *118*, 483–524. [[CrossRef](#)]
3. SCENIHR. Opinion on potential health effects of exposure to electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* **2015**, *36*, 480–484. [[CrossRef](#)]
4. Kostoff, R.N. The role of toxic stimuli combinations in determining safe exposure limits. *Toxicol. Rep.* **2018**, *5*, 1169–1172. [[CrossRef](#)]
5. Schuermann, D.; Mevissen, M. Manmade Electromagnetic fields and oxidative stress—Biological effects and consequences for health. *IJMS* **2021**, *22*, 3772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Whitehead, T.D.; Moros, E.G.; Brownstein, B.H.; Roti Roti, J.L. The Number of genes changing expression after chronic exposure to code division multiple access or frequency DMA radiofrequency radiation does not exceed the false-positive rate. *Proteomics* **2006**, *6*, 4739–4744. [[CrossRef](#)]
7. Chauhan, V.; Qutob, S.S.; Lui, S.; Mariampillai, A.; Bellier, P.V.; Yauk, C.L.; Douglas, G.R.; Williams, A.; McNamee, J.P. Analysis of gene expression in two human-derived cell lines exposed in vitro to a 1.9 GHz Pulse-modulated radiofrequency field. *Proteomics* **2007**, *7*, 3896–3905. [[CrossRef](#)]
8. Zeng, Q.; Chen, G.; Weng, Y.; Wang, L.; Chiang, H.; Lu, D.; Xu, Z. Effects of global system for mobile communications 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on gene and protein expression in MCF-7 Cells. *Proteomics* **2006**, *6*, 4732–4738. [[CrossRef](#)]
9. Poque, E.; Arnaud-Cormos, D.; Patrignoni, L.; Ruigrok, H.J.; Poullietier De Gannes, F.; Hurtier, A.; Renom, R.; Garenne, A.; Lagroye, I.; Leveque, P.; et al. Effects of radiofrequency fields on RAS and ERK kinases activity in live cells using the bioluminescence resonance energy transfer technique. *Int. J. Radiat. Biol.* **2020**, *96*, 836–843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Poque, E.; Ruigrok, H.J.; Arnaud-Cormos, D.; Habauzit, D.; Chappe, Y.; Martin, C.; De Gannes, F.P.; Hurtier, A.; Garenne, A.; Lagroye, I.; et al. Effects of radiofrequency field exposure on proteotoxic-induced and heat-induced HSF1 response in live cells using the bioluminescence resonance energy transfer technique. *Cell Stress Chaperones* **2021**, *26*, 241–251. [[CrossRef](#)]
11. Ruigrok, H.J.; Arnaud-Cormos, D.; Hurtier, A.; Poque, E.; de Gannes, F.P.; Ruffié, G.; Bonnaudin, F.; Lagroye, I.; Sojic, N.; Arbault, S.; et al. Activation of the TRPV1 thermoreceptor induced by modulated or unmodulated 1800 MHz radiofrequency field exposure. *Radiat. Res.* **2018**, *189*, 95–103. [[CrossRef](#)]
12. Croft, L.V.; Mulders, J.A.; Richard, D.J.; O'Byrne, K. Digital holographic imaging as a method for quantitative, live cell imaging of drug response to novel targeted cancer therapies. In *Theranostics*; Batra, J., Srinivasan, S., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2019; Volume 2054, pp. 171–183. ISBN 978-1-4939-9768-8.
13. Kliment, K.; Szekacs, I.; Peter, B.; Erdei, A.; Kurucz, I.; Horvath, R. Label-free real-time monitoring of the BCR-Triggered activation of primary human b cells modulated by the simultaneous engagement of inhibitory receptors. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *191*, 113469. [[CrossRef](#)]
14. Wegener, J. *Label-Free Monitoring of Cells In Vitro*; Bioanalytical Reviews; Wegener, J., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; Volume 2, ISBN 978-3-030-32432-2.
15. Garcia-Fernandez, M.A.; Percherancier, Y.; Lagroye, I.; O'Connor, R.P.; Veyret, B.; Arnaud-Cormos, D.; Leveque, P. Dosimetric Characteristics of an EMF delivery system based on a real-time impedance measurement device. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2016**, *63*, 2317–2325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tsai, C.-L.; Tsai, C.-W.; Chang, W.-S.; Lin, J.-C.; Hsia, T.-C.; Bau, D.-T. Protective effects of baicalin on arsenic trioxide-induced oxidative damage and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *In Vivo* **2021**, *35*, 155–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bencko, V.; Yan Li Foong, F. The history of arsenical pesticides and health risks related to the use of agent blue. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2017**, *24*, 312–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Akao, Y.; Nakagawa, Y.; Akiyama, K. Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro. *FEBS Lett.* **1999**, *455*, 59–62. [[CrossRef](#)]
19. Karlsson, J.; Øra, I.; Pörn-Ares, I.; Pählman, S. Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of bax and does not require P53. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3179–3188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Nampung, U.; Xia, Z. Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-jun n-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 6442–6451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sun, Y.; Wang, C.; Wang, L.; Dai, Z.; Yang, K. Arsenic trioxide induces apoptosis and the formation of reactive oxygen species in rat glioma cells. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2018**, *23*, 13. [[CrossRef](#)]
22. Soueid, M.; Dobbelaar, M.C.F.; Bentouati, S.; Bardet, S.M.; O'Connor, R.P.; Bessières, D.; Paillol, J.; Leveque, P.; Arnaud-Cormos, D. Delivery devices for exposure of biological cells to nanosecond pulsed electric fields. *Med. Biol. Eng. Comput.* **2018**, *56*, 85–97. [[CrossRef](#)]
23. Kohler, S.; Ticaud, N.; Iordache, M.-M.; Moisescu, M.G.; Savopol, T.; Leveque, P.; Arnaud-Cormos, D. Setup for simultaneous microwave heating and real-time spectrofluorometric measurements in biological systems. *Prog. Electromagn. Res.* **2014**, *145*, 229–240. [[CrossRef](#)]
24. Nefzi, A.; Carr, L.; Dalmay, C.; Pothier, A.; Leveque, P.; Arnaud-Cormos, D. Microdosimetry Using rhodamine B within macro- and microsystems for radiofrequency signals exposures of biological samples. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* **2020**, *68*, 1142–1150. [[CrossRef](#)]
25. Priault, M.; Hue, E.; Marhuenda, F.; Pilet, P.; Oliver, L.; Vallette, F.M. Differential dependence on beclin 1 for the regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-XL in HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8755. [[CrossRef](#)]
26. Kho, D.; MacDonald, C.; Johnson, R.; Unsworth, C.; O'Carroll, S.; Mez, E.; Angel, C.; Graham, E. Application of XCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors* **2015**, *5*, 199–222. [[CrossRef](#)]
27. Diemert, S.; Dolga, A.M.; Tobaben, S.; Grohm, J.; Pfeifer, S.; Oexler, E.; Culmsee, C. Impedance measurement for real time detection of neuronal cell death. *J. Neurosci. Methods* **2012**, *203*, 69–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Komatsu, M.; Waguri, S.; Ueno, T.; Iwata, J.; Murata, S.; Tanida, I.; Ezaki, J.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; Uchiyama, Y.; et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-Deficient mice. *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 425–434. [[CrossRef](#)]
29. Joubert, V.; Leveque, P.; Rametti, A.; Collin, A.; Bourthoumieu, S.; Yardin, C. Microwave Exposure of neuronal cells in vitro: Study of apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, *82*, 267–275. [[CrossRef](#)]
30. Kayhan, H.; Esmekaya, M.A.; Saglam, A.S.Y.; Tuysuz, M.Z.; Canseven, A.G.; Yagci, A.M.; Seyhan, N. Does MW Radiation affect gene expression, apoptotic level, and cell cycle progression of human SH-SY5Y Neuroblastoma cells? *Cell Biochem. Biophys.* **2016**, *74*, 99–107. [[CrossRef](#)]
31. Zielinski, J.; Ducray, A.D.; Moeller, A.M.; Murbach, M.; Kuster, N.; Mevissen, M. Effects of pulse-modulated radiofrequency magnetic field (rf-emf) exposure on apoptosis, autophagy, oxidative stress and electron chain transport function in human neuroblastoma and murine microglial cells. *Toxicol. Vitro* **2020**, *68*, 104963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Choi, J.; Min, K.; Jeon, S.; Kim, N.; Pack, J.-K.; Song, K. Continuous exposure to 1.7 GHz LTE electromagnetic fields increases intracellular reactive oxygen species to decrease human cell proliferation and induce senescence. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9238. [[CrossRef](#)]

33. Su, L.; Wei, X.; Xu, Z.; Chen, G. RF-EMF Exposure at 1800 MHz did not elicit dna damage or abnormal cellular behaviors in different neurogenic cells: RF-EMF and DNA damage in neurogenic cells. *Bioelectromagnetics* **2017**, *38*, 175–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hoyto, A.; Luukkonen, J.; Juutilainen, J.; Naarala, J. Proliferation, oxidative stress and cell death in cells exposed to 872 MHz radiofrequency radiation and oxidants. *Radiat. Res.* **2008**, *170*, 235–243. [[CrossRef](#)]
35. Buttiglione, M.; Roca, L.; Montemurno, E.; Vitiello, F.; Capozzi, V.; Cibelli, G. Radiofrequency Radiation (900 MHz) Induces Egr-1 gene expression and affects cell-cycle control in human neuroblastoma cells. *J. Cell Physiol.* **2007**, *213*, 759–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Marjanovic Cermak, A.M.; Pavicic, I.; Trosic, I. Oxidative stress response in SH-SY5Y cells exposed to short-term 1800 MHz radiofrequency radiation. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **2018**, *53*, 132–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. von Niederhäusern, N.; Ducray, A.; Zielinski, J.; Murbach, M.; Mevissen, M. Effects of radiofrequency electromagnetic field exposure on neuronal differentiation and mitochondrial function in SH-SY5Y cells. *Toxicol. Vitro.* **2019**, *61*, 104609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Calabro, E.; Condello, S.; Curro, M.; Ferlazzo, N.; Caccamo, D.; Magazu, S.; Ientile, R. Modulation of heat shock protein response in SH-SY5Y by mobile phone microwaves. *World J. Biol. Chem.* **2012**, *3*, 34–40. [[CrossRef](#)]
39. Falone, S.; Sannino, A.; Romeo, S.; Zeni, O.; Santini, S.; Rispoli, R.; Amicarelli, F.; Scarfi, M.R. Protective effect of 1950 MHz electromagnetic field in human neuroblastoma cells challenged with menadione. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13234. [[CrossRef](#)]
40. Zeni, O.; Romeo, S.; Sannino, A.; Palumbo, R.; Scarfi, M.R. Evidence of bystander effect induced by radiofrequency radiation in a human neuroblastoma cell line. *Environ. Res.* **2021**, *196*, 110935. [[CrossRef](#)]
41. Gibot, L.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Bellard, E.; Chretiennot, T.; Saurin, Q.; Catrain, A.; Golzio, M.; Vézinnet, R.; Rols, M.-P. Evaluations of acute and sub-acute biological effects of narrowband and moderate-band high power electromagnetic waves on cellular spheroids. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ozgur, E.; Kayhan, H.; Kismali, G.; Senturk, F.; Sensoz, M.; Ozturk, G.G.; Sel, T. Effects of radiofrequency radiation on colorectal cancer cell proliferation and inflammation. *Turkish J. Biochem.* **2021**, *46*, 0148. [[CrossRef](#)]
43. Terro, F.; Magnaudeix, A.; Crochetet, M.; Martin, L.; Bourthoumieu, S.; Wilson, C.-M.; Yardin, C.; Leveque, P. GSM-900MHz at low dose temperature-dependently downregulates  $\alpha$ -synuclein in cultured cerebral cells independently of chaperone-mediated-autophagy. *Toxicology* **2012**, *292*, 136–144. [[CrossRef](#)]
44. Zhu, Y.; Gao, F.; Yang, X.; Shen, H.; Liu, W.; Chen, H.; Jiang, X. The effect of microwave emission from mobile phones on neuron survival in rat central nervous system. *Prog. Electromagn. Res.* **2008**, *82*, 287–298. [[CrossRef](#)]
45. Joubert, V.; Bourthoumieu, S.; Leveque, P.; Yardin, C. Apoptosis Is induced by radiofrequency fields through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons. *Radiat. Res.* **2008**, *169*, 38–45. [[CrossRef](#)]
46. Joubert, V.; Leveque, P.; Cueille, M.; Bourthoumieu, S.; Yardin, C. No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to gsm phone fields. *Bioelectromagnetics* **2007**, *28*, 115–121. [[CrossRef](#)]
47. Su, L.; Yimaer, A.; Xu, Z.; Chen, G. Effects of 1800 MHz RF-EMF Exposure on DNA damage and cellular functions in primary cultured neurogenic cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **2018**, *94*, 295–305. [[CrossRef](#)]
48. Zuo, W.-Q.; Hu, Y.-J.; Yang, Y.; Zhao, X.-Y.; Zhang, Y.-Y.; Kong, W.; Kong, W.-J. Sensitivity of spiral ganglion neurons to damage caused by mobile phone electromagnetic radiation will increase in lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro model. *J. Neuroinflammation* **2015**, *12*, 105. [[CrossRef](#)]
49. Liu, Y.; Tai, J.; Li, G.; Zhang, Z.; Xue, J.; Liu, H.; Zhu, H.; Cheng, J.; Liu, Y.; Li, A.; et al. Exposure to 1950-MHz TD-SCDMA electromagnetic fields affects the apoptosis of astrocytes via caspase-3-dependent pathway. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42332. [[CrossRef](#)]
50. Chen, C.; Ma, Q.; Liu, C.; Deng, P.; Zhu, G.; Zhang, L.; He, M.; Lu, Y.; Duan, W.; Pei, L.; et al. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Eghlidospour, M.; Ghanbari, A.; Mortazavi, S.M.J.; Azari, H. Effects of radiofrequency exposure emitted from a GSM mobile phone on proliferation, differentiation, and apoptosis of neural stem Cells. *Anat. Cell Biol.* **2017**, *50*, 115. [[CrossRef](#)]
52. Simkó, M.; Remondini, D.; Zeni, O.; Scarfi, M. Quality matters: Systematic analysis of endpoints related to “cellular life” in vitro data of radiofrequency electromagnetic field exposure. *IJERPH* **2016**, *13*, 701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Alm, K.; El-Schich, Z.; Falck, M.; Gjrloff Wingren, A.; Janicke, B.; Oredsso, S. Cells and Holograms—Holograms and Digital Holographic Microscopy as a Tool to Study the Morphology of Living Cells. In *Holography—Basic Principles and Contemporary Applications*; Mihaylova, E., Ed.; InTech: London, UK, 2013; ISBN 978-953-51-1117-7.
54. Romeo, S.; Zeni, O.; Sannino, A.; Lagorio, S.; Biffoni, M.; Scarfi, M.R. Genotoxicity of radiofrequency electromagnetic fields: Protocol for a systematic review of in vitro studies. *Environ. Internat.* **2021**, *148*, 106386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. O’Prey, J.; Sakamaki, J.; Baudot, A.D.; New, M.; Van Acker, T.; Tooze, S.A.; Long, J.S.; Ryan, K.M. Application of CRISPR/Cas9 to Autophagy Research. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 588, pp. 79–108, ISBN 978-0-12-809674-1.
56. El Khoueiry, C.; Moretti, D.; Renom, R.; Camera, F.; Orlacchio, R.; Garenne, A.; Poullietier de Gannes, F.; Poque-Haro, E.; Lagroye, I.; Veyret, B.; et al. Decreased spontaneous electrical activity in neuronal networks exposed to radiofrequency 1800 MHz signals. *J. Neurophysiol.* **2018**, *120*, 2719–2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Li, B.; Sun, C.; Sun, J.; Yang, M.; Zuo, R.; Liu, C.; Lan, W.; Liu, M.; Huang, B.; Zhou, Y. Autophagy mediates serum starvation-induced quiescence in nucleus pulposus stem cells by the regulation of P27. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 118. [[CrossRef](#)]

58. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020.
59. Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.D.; François, R.; Golemund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J.; et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **2019**, *4*, 1686. [[CrossRef](#)]
60. Epstein, R.; Boulier, T.; Robertson, R.E. *FreqProf: Frequency Profiles Computing and Plotting*. 2016. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=FreqProf> (accessed on 1 October 2021).
61. Gagolewski, M. stringi: Fast and portable character string processing in R. *Journal of Statistical Software*, 2021. To appear. Available online: <https://stringi.gagolewski.com/> (accessed on 1 October 2021).
62. Pohlert, T. *PMCMRplus: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended*. 2021. Available online: <https://cran.r-project.org/package=PMCMRplus> (accessed on 1 October 2021).
63. Piepho, H.-P. An algorithm for a letter-based representation of all-pairwise comparisons. *J. Comput. Graph. Stat.* **2004**, *13*, 456–466. [[CrossRef](#)]



## VI - Étude de l'impact des radiofréquences sur les voies métaboliques de réponses au stress sur cellules en culture

### **Effects of 5G-modulated 3.5 GHz radiofrequency field exposures on HSF1, RAS, ERK, and PML activation in live fibroblasts and keratinocytes cells.**

Alexandre Joushomme<sup>1</sup>, Rosa Orlacchio<sup>2</sup>, Lorenza Patrignoni<sup>1</sup>, Anne Canovi<sup>1</sup>, Yann Chappe<sup>1</sup>, Florence Poulletier De Gannes<sup>1</sup>, Annabelle Hurtier<sup>1</sup>, André Garenne<sup>1</sup>, Isabelle Lagroye<sup>1,4</sup>, François Moisan<sup>5</sup>, Muriel Cario<sup>5</sup>, Philippe Lévêque<sup>3</sup>, Delia Arnaud-Cormos<sup>2,3</sup>, & Yann Percherancier<sup>2,§</sup>

<sup>1</sup> Bordeaux University, CNRS, IMS laboratory, UMR5218, F-33400 Talence, France

<sup>2</sup> Limoges University, CNRS, XLIM, UMR 7252, F-87000 Limoges, France

<sup>3</sup> Institut Universitaire de France (IUF), F-75005 Paris, France

<sup>4</sup> Paris Sciences et Lettres Research University, F-75006 Paris, France

<sup>5</sup> Bordeaux University, INSERM, BMGIC laboratory, UMR1035, F-33000 Bordeaux, France

§ correspondence to: [yann.percherancier@ims-bordeaux.fr](mailto:yann.percherancier@ims-bordeaux.fr)

Running Title: 5G Radiofrequency-fields molecular effect on skin cells



## **Summary**

The potential health risks of exposure to radiofrequency electromagnetic fields from mobile communications technologies has raised societal concerns. Guidelines have been set to protect the population (e.g., non-specific heating above 1°C under exposure to radiofrequency fields), but questions remain regarding the potential biological effects of non-thermal effects. With the advent of the fifth generation (5G) of mobile communication, assessing whether exposure to this new signal induces a cellular stress response is one of the mandatory steps on the roadmap for a safe deployment and health risk evaluation of 5G signals. Using the BRET (Bioluminescence Resonance Energy-Transfer) technique, we assessed whether continuous or intermittent (5 min ON/ 10 min OFF) exposure of live human keratinocytes and fibroblasts cells to 5G 3.5 GHz signals at specific absorption rate (SAR) up to 4 W/kg for 24 h impact molecular pathways involved in environmental cell-stress responses: basal or chemically-induced activity of Heat Shock Factor (HSF), RAS and ERK kinases, and Promyelocytic Leukemia Protein (PML).

## **Introduction**

Within the fast deployment of mobile telecommunications over the last decades, the 5th generation (5G) of wireless networks was designed to improve on the 4G LTE technology by resolving issues linked with the exponential usage increase, the number of connected devices, and the need for higher reliability and lower latency (Gopal, 2015; Mahmud, 2019). . Such achievements required new frequency bands in addition to those already deployed for the 2G, 3G, and 4G. Among them, the 3.4 - 3.8 GHz band offers a good trade-off between broadband coverage and speed, while the 26 GHz band, characterized by poor propagation and penetration inside buildings, will be deployed at a second stage to cover limited areas with high data traffic. Therefore, the 3.5 GHz band (also known as the C-band), which can use the same cell sites as the current 2.6 GHz and 1.8 GHz mobile antennas, is the core band of the current 5G.

The biological and health effects of exposure to environmental radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) have been the subject of numerous studies since the late 20th century, and are still the focus of societal concerns. This research field was also strengthened



by the International Agency for Research on Cancer (IARC) decision in May 2011 to classify RF-EMFs as 2B carcinogens.

Notably, while the energy of RF photons is not strong enough to trigger chemical modifications in biological targets, such as DNA breaks, living tissue dielectric heating under RF-EMF exposure is fully characterized. Guidelines were therefore established to protect the population against the associated risks (ICNIRP, 2020a). However, whether RF-EMF exposure can trigger "nonthermal" effects (i.e., biological effects not caused by temperature elevation in living tissue) remains a difficult-to-study issue. Since there is no mechanistic support for these effects, the scientific community can only rely on empirical research concerning potential RF-EMF nonthermal effects (vecchia *et al*, 2009b; SSM's Scientific Council on Electromagnetic Fields, 2020; IARC, 2013).

Unfortunately, very few data from scientific studies are available on the potential biological hazard presented by RF-EMF exposure to the new frequency signals used in 5G. To the best of our knowledge, only five articles, performed by three different teams, have already been published that explored the effects of 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF on living matter. Dasgupta *et al*. exposed developing zebrafish to 3.5 GHz RF-EMF at a specific absorption rate (SAR) of 8.27 W/kg for 6 to 48 h post-fertilization under isothermal culture conditions (Dasgupta *et al*, 2020, 2022). These authors measured subtle but persistent sensorimotor effects and a modest transcriptomic disruption at 48 h post-fertilization, with 28 differentially expressed genes in the exposed groups. Whether these effects are still measurable using SAR levels complying with the guidelines remains to be determined. Wang *et al*. assessed the impact of short- and long-term exposures using unmodulated 3.5 GHz RF-EMF at three different SAR (2.6, 26, and 260 mW/kg) on *Drosophila melanogaster* (Wang *et al*, 2021, 2022). These authors showed a moderate but significant impact on insect activity, sleep, and development that was accompanied by a modification in the expression of genes involved in circadian rhythms, thermal stress, oxidative stress, and humoral immunity. Finally, in a third study, Yang *et al*. assessed the effect of unmodulated 3.5 GHz RF-EMF exposure with a SAR of 0, 2, 4, or 10 W/kg for 72 h on anxiety-like behavior and the auditory cortex (ACx) in guinea pigs. This study pointed to a SAR-dependent increase in oxidative stress, apoptosis induction, and ultrastructural damage in ACx with no increase in animals' anxiety and hearing thresholds

(Yang *et al*, 2022). Altogether, these studies suggest a potential effect of 3.5 GHz RF-EMF on several stress response pathways in eucaryotes organisms.

Assessing whether new RF-EMF technologies induce a cellular stress response under well-controlled exposure conditions is thus one of the mandatory steps on the roadmap for health risk evaluation of 5G signals. In particular, at the molecular level, whether Heat-Shock Proteins (HSP) expression and RAS/MAPK signal transduction pathways are induced has been highly debated due to the central role played by these molecular systems stress responses of cells (Poque *et al*, 2021, 2020). Questions also remain regarding the occurrence of oxidative stress in RF-EMF exposed cells (Schuermann & Mevissen, 2021). Therefore, it is crucial to further assess the effect of newly deployed RF signals, such as the 5G signal, on generic molecular mechanisms involved in cellular stress response. In the present study, we investigated the effect of a 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal on basal and chemically-induced Heat-Shock Factor 1 (HSF1), RAS, ERK, and ProMyelocytic Leukemia (PML) activities. HSF1 is the "master regulator" of heat-shock proteins' transcription in eukaryotes (Gomez-Pastor *et al*, 2018a). RAS and ERK kinases are key elements of Ser/Thr mitogen-activated protein-kinase (MAPK) cascades that relay extracellular signals to intracellular processes following the activation of RAS (Kim & Choi, 2015a; Nussinov *et al*, 2018). The RAS/MAPK signaling pathway is pivotal in regulating various cellular processes such as gene expression, cellular growth, and survival. Finally, PML protein is the keystone of the formation of PML Nuclear bodies (PML NBs). They are spherical nuclear domains that form in response to various stress conditions, including oxidative stress, and that are of prime importance for apoptosis, senescence, DNA repair, epigenetic control, as well as control of oncogenesis (Niwa-Kawakita *et al*, 2018). PML NBs formation is therefore a marker of cellular stress responses and is also important for the activity of numerous transcription factors and nuclear proteins, including HSF1 and ERK (Goodson *et al*, 2001; Meng *et al*, 2021b; Alastalo *et al*, 2003; Akerfelt *et al*, 2010; Hong *et al*, 2001). Our study used human skin fibroblasts and keratinocytes as cellular models since skin cells become the primary target tissue of 5G exposure to consider for risk assessment (Kaur & Khan, 2019). These cells were continuously or intermittently (5 min ON / 10 min OFF) exposed to the 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal at 0.25, 1, and 4 W/kg under isothermal conditions for 24 h before HSF1, RAS, ERK, and PML

activities were assessed, thanks to well-worn Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-based molecular probes (Percherancier *et al*, 2009; Poque *et al*, 2021, 2020).

## **Material and methods**

### **Plasmids**

RAS and ERK BRET sensors were developed by replacing the fluorescent energy donor (ECFP or Turquoise-GL) and the fluorescent energy acceptor (YPet-M) of the EKAREV and RaichuEV-ras FRET probes (Komatsu *et al*, 2011) with nanoLuciferase (NLuc (Hall *et al*, 2012)) and mNeonGreen (mNeonG (Shaner *et al*, 2013)), respectively. Mammalian expression vector coding ERK (pEKAREV) and RAS (pRaichuEV-Ras) FRET probes were kindly provided by Dr Matsuda M (Kyoto University, Japan). The cDNA coding for NLuc and mNeonG were first synthesized (Genescript, Rijswijk, The Netherlands) and then cloned in place of the fluorescent energy donor, between *NotI* and *XbaI*, in pEKAREV and pRaichuEV-Ras expression vectors.

The cDNA encoding the NLuc-HSF1 and mNeonG-HSF1 proteins were derived from RLuc-HSF1 and sYFP2-HSF1 expression vectors (Poque *et al*, 2021), in which Renilla Luciferase II and sYFP2 groups were replaced by NLuc and mNeonG, respectively, between *BamHI* and *EcoRI*. The HSP90 expression vector was also described in Poque *et al*. (2021)(Poque *et al*, 2021).

Similarly, the cDNA encoding the NLuc-PMLIII and mNeonG-SUMO1 proteins were derived from RLuc-PMLIII and YFP-SUMO1 expression vectors (Percherancier *et al*, 2009), in which Renilla Luciferase and YFP were replaced by NLuc and mNeonG, respectively, between *BamHI* and *EcoRI*.

### **Reagents**

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (A1010, 330 mM stock solution resuspended in 1 N NaOH) and MG132 (C2211, Z-Leu-Leu-Leu-al, 50 mM stock solution resuspended in DMSO) were from Sigma (Lyon, France). Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) was acquired from Tocris (Bristol, UK), and Coelenterazine H from Nanolight Technology (Pinetop, AZ, USA).

### **Cell culture and transfections**

XP6BE fibroblasts (Gözükara *et al*, 1994) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium – high Glucose (DMEM)(D6429, Sigma) supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin and streptomycin. HaCaT keratinocytes (Colombo *et al*, 2017) were maintained in Keratinocyte-SFM (Ref 17005-034; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

supplemented with Bovine Pituitary Extract (BPE; Catalogue Number 13028-014, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) & Human Recombinant EGF (catalog number 10450-13, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplied with the kit Gibco™ Keratinocyte-SFM Supplement (Ref 37000015, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Twenty-four hours before transfection, cells were seeded at a density of 500,000 cells per well in 6-well dishes. Transient transfections were performed using polyethylenimine (PEI, linear, MW 25,000; catalogue number 23966 Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) with a PEI:DNA ratio of 4:1, as previously described (Percherancier *et al*, 2005). For measurement of HSF1 activity, 0.1 µg of NLuc-HSF1 expression vector was co-transfected with 1.4 µg of mNeonG-HSF1 and 0.5 µg of HSP90 expression vectors. For measurement of RAS and ERK activities, 1 µg of pEKAREV or pRaichuEV-Ras BRET expression vectors were co-transfected with 1 µg of empty vector. For measurement of PML activity, 0.1 µg of NLuc-PMLIII expression vector was co-transfected with 1.9 µg of mNeonG-SUMO1. After overnight incubation, transfected cells were then detached, resuspended in DMEM w/o red phenol (Ref 21063-029, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) and replated at a density of  $10^5$  cells per well in 96-well white plates with clear bottoms (Greiner Bio one, Courtaboeuf, France) pre-treated with D-polylysine (Sigma, Lyon, France) for reading with the Tristar2 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) or onto 12 mm diameter glass coverslips (Knittel Glass, Braunschweig, Germany) treated with D-polylysine for the reading with the SpectraPro 2300i spectrometer (Acton Optics, Acton, MA, USA)(see below). Cells were left in culture for 24 h before being processed for the BRET assay.

### **BRET measurements**

Cells were exposed for 24 h to the indicated RF-EMF exposure conditions with the last 12 h, 4 h or 15 min being in presence or absence (sham) of MG132, PMA or  $As_2O_3$ , respectively. Following chemical activation, 5 µM Coelenterazine H was added to the cell culture medium and the BRET signal was immediately acquired using a TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) equipped with emission filters centered at  $515 \pm 20$  nm for mNeonG ( $I_{acceptor}$ ) and  $460 \pm 20$  nm for NLuc ( $I_{donor}$ ). The BRET signal was determined by calculating the ratio of the emission intensity measured in the acceptor window ( $I_{mNeonG}$ ) over the emission intensity measured in the donor window ( $I_{NLuc}$ ), according to Eq.1:

$$(1) \text{ BRET} = \frac{I_{m\text{NeonG}}}{I_{\text{NLuc}}}$$

Due to the overlapping emission spectra of NLuc and mNeonG, a fraction of the light detected in the mNeonG filter originates from the luciferase emission, resulting in a contaminating signal (Hamdan *et al*, 2006b). In that configuration, the net BRET was therefore defined as the BRET ratio of cells co-expressing NLuc and mNeonG constructs minus the BRET ratio of cells expressing only the NLuc construct in the same experiment.

### **BRET data processing and statistical analysis**

The GraphPad Prism v8.00 for Mac software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for plotting dose-response curves and performing statistical analyses. The size of the error bars indicates the S.D. within the data set. Potencies of chemicals to activate or inhibit the different probes are expressed as pEC50 ± S.E.M (standard error of the mean). Sigmoidal dose-response curves were fitted using Eq. 2:

$$(2) Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{\log \text{EC}_{50} - X}}$$

Where X is the logarithm of agonist concentration and Y is the response; Bottom is the Y value at the bottom plateau; Top is the Y value at the top plateau; and Log EC50 is the X value when the response is halfway between Bottom and Top.

The one sample Wilcoxon signed-rank test was used to assess the statistical significance against the null hypothesis of the difference calculated between Sham and RF-EMF exposure condition for basal BRET, chemicals' potencies and efficacies. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant.

### **Cells exposure, exposure set-up, and dosimetry**

Cells were exposed for 24 h in 96-well tissue culture plates (TCP) at SAR levels of 0.25, 1, and 4 W/kg. Sham exposures were also performed under identical experimental conditions but with the generator turned off, i.e., at SAR equal to 0 W/kg. A novel exposure system, recently designed and characterized, was used for the first time for cells exposures to 5G-modulated 3.5 GHz signals (Orlacchio *et al*, 2022). The system was based on a cell culture incubator that allowed maintaining the desired biological conditions of 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Comprehensive characterization of the system, through experimental measurements and numerical simulations has been described in detail elsewhere (Orlacchio *et al*, 2022). Briefly,

a 150-l incubator (BINDER GmbH, Tullingen, Germany), made of stainless-steel walls, was used as a reverberation chamber, i.e., a metallic large, closed cavity, with a high  $Q$ -factor, where a statistically homogeneous, randomly polarized, and isotropic field distribution was achieved *via* mechanical stirring of the field components (Hill, 1998). Electromagnetic signal at 3.5 GHz was delivered to the biological samples through a printed patch antenna. A plastic holder with five levels was used to accommodate and simultaneously expose ten TCPs of 6- or 96- wells i.e., two per holder level. Each well of the 6- and 96- well TCPs was filled with 2 ml and 200  $\mu$ l of cell culture medium, respectively. To assure experimental reproducibility for exposure, the incubator was loaded with the same configuration used for the electromagnetic characterization, i.e., four and six 6 -and 96-well TCPs, respectively, due to the high SAR dependence on the chamber load.

The signal generation unit, composed of a RF signal generator (SMBV100A, Rohde & Schwarz, Munich, Germany), a 45-dB gain amplifier (Mini-circuits, ZHL-16W-43+, NY, USA), a power circulator (Pasternack, PE83CR1005, CA, USA), and a bidirectional coupler (Mini-circuits, ZGBDC30-372HP+, NY, USA), was located outside the incubator. In addition, to ensure the continuous monitoring of the desired input power into the chamber, incident and reflected powers were monitored with a power meter (Agilent N1912A, USA) connected to the bidirectional coupler.

Local SAR was experimentally retrieved through temperature measurements of the RF-EMF induced heating recorded with a fiber-optic probe (Luxtron One, Lumasense Technologies, CA, USA). Measured SAR in the 96-well TCP was around 1 W/kg per watt antenna input power. To validate our systems, numerical simulations were performed using the finite difference time domain (FDTD)-based electromagnetic methodology (Leveque *et al*, 1992a). Overall, we showed that experimental and numerical SARs were in good agreement with differences < 30% considering the standard deviation that is compliant with ICNIRP guidelines (ICNIRP, 2020a). According to measured and simulated values normalized to 1 W, incident power during biological exposure was adjusted to obtain required exposure levels of 0.25, 1, and 4 W/kg in a 96-well tissue culture plate. Measurements of the induced temperature elevation of the exposed medium were also performed under the specific cellular exposure condition of the study showing a temperature increase of 1.7°C at 4 W/kg, 0.7°C at

1 W/kg and a negligible temperature increase below 0.1°C at 0.25W/kg. The temperature of the incubator was decreased accordingly to maintain the biological samples at 37°C.

## Results

The hypothesis that 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF can impact HSF1, RAS, ERK, or PML basal or chemically-induced activity was tested using BRET-based assays previously described by our team (Percherancier *et al*, 2009; Poque *et al*, 2021, 2020). BRET is a cell-based assay for studying protein-protein interactions and protein conformational changes in real-time and live cells. This technique relies on Forster resonance energy transfer from a bioluminescent donor to a fluorescent acceptor, both fused to the proteins of interest. In our experiment design, BRET probes were expressed in live cells. Since the fibroblast and keratinocyte cell lines used in this study are more difficult to transfect than the HEK293T cells used in our former studies, we systematically replaced the RLuc2 protein in our BRET assays with the brighter nanoLuciferase (NLuc)(Hall *et al*, 2012). We also replaced the fluorescent acceptor sYFP2 with mNeonGreen (mNeonG) in all our assays because of the greater overlap between NLuc emission spectra and mNeonG excitation spectra (Arts *et al*, 2017).

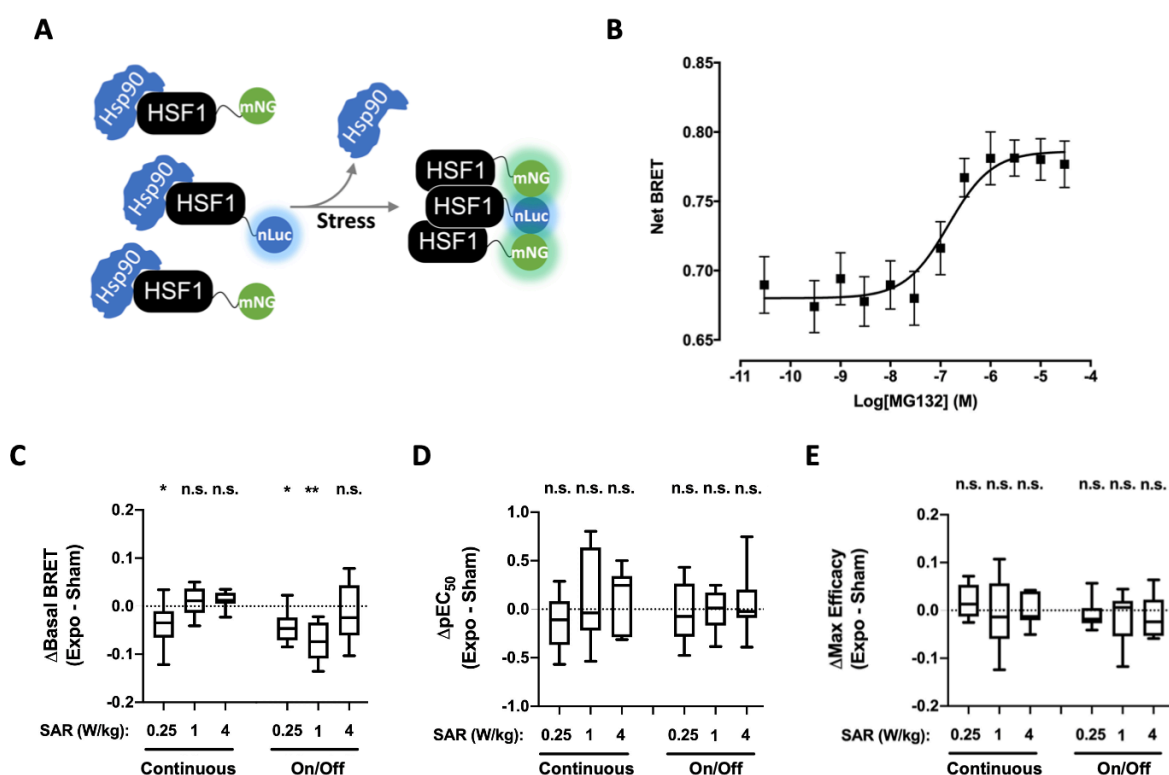
### **Impact of 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF exposure on basal or chemically-induced HSF1 trimerization in XP6BE fibroblasts cells.**

To monitor HSF1 activity, we previously designed an intermolecular BRET test allowing the follow-up of HSF1 trimerization (Poque *et al*, 2021), a key event on the roadmap of HSF1 activation in response to stress conditions such as heat-stress, oxidative-stress or proteotoxic-stress (Barna *et al*, 2018). In this assay, N-terminally NLuc-tagged HSF1 is co-expressed with mNeonG-tagged HSF1 into a given cell line. Given that HSF1 trimerizes upon activation, the resulting BRET signal increases following HSF1 activation since trimerization brings donor and acceptor groups in close proximity (Poque *et al*, 2021)(Fig. 1A).

To assess the functionality of this assay in skin fibroblasts, we co-expressed NLuc-HSF1 with mNeonG-HSF1 in the XP6BE fibroblast cell line (Kraemer *et al*, 1975), and challenged the transfected cells with increasing concentrations of the proteasome inhibitor MG132 to trigger a proteotoxic stress (Mathew *et al*, 2001). As expected, MG132 induced a concentration-

dependent increase in the basal BRET signal with an EC<sub>50</sub> in the hundred nanomolar range (Fig. 1B), showing the assay's effectiveness.

We then assessed whether continuous or intermittent (5 min ON / 10 min OFF) cell exposure to 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal at 0.25, 1, and 4 W/kg under isothermal conditions for 24 h impacted the NLuc-HSF1/mNeonG-HSF1 basal BRET signal, or either the AMG517 potency or efficacy to activate HSF1 in the transfected XP6BE fibroblast cell line. Interestingly, we measured few but significant and reproducible decrease of the HSF1 basal BRET when the XP6BE fibroblast cell line was continuously exposed at 0.25 W/kg for 24 h or intermittently exposed at 0.25 and 1 W/kg for 24 h (Fig. 1C). While this BRET signal decrease represents only ~6 to 10 % of the basal BRET measured, it proportionally corresponds to ~37 to 61 % (in absolute terms) of the effect triggered by MG132 (Table 1 and 2). No effect was measured at 4 W/kg whether the signal was emitted continuously or intermittently. Also, exposure to the RF-EMF signal changed neither the AMG517 potency nor its efficacy to activate HSF1, whatever the SAR and the continuous or intermittent emission mode of the signal (Fig. 1D and E, Table 3 and 4).



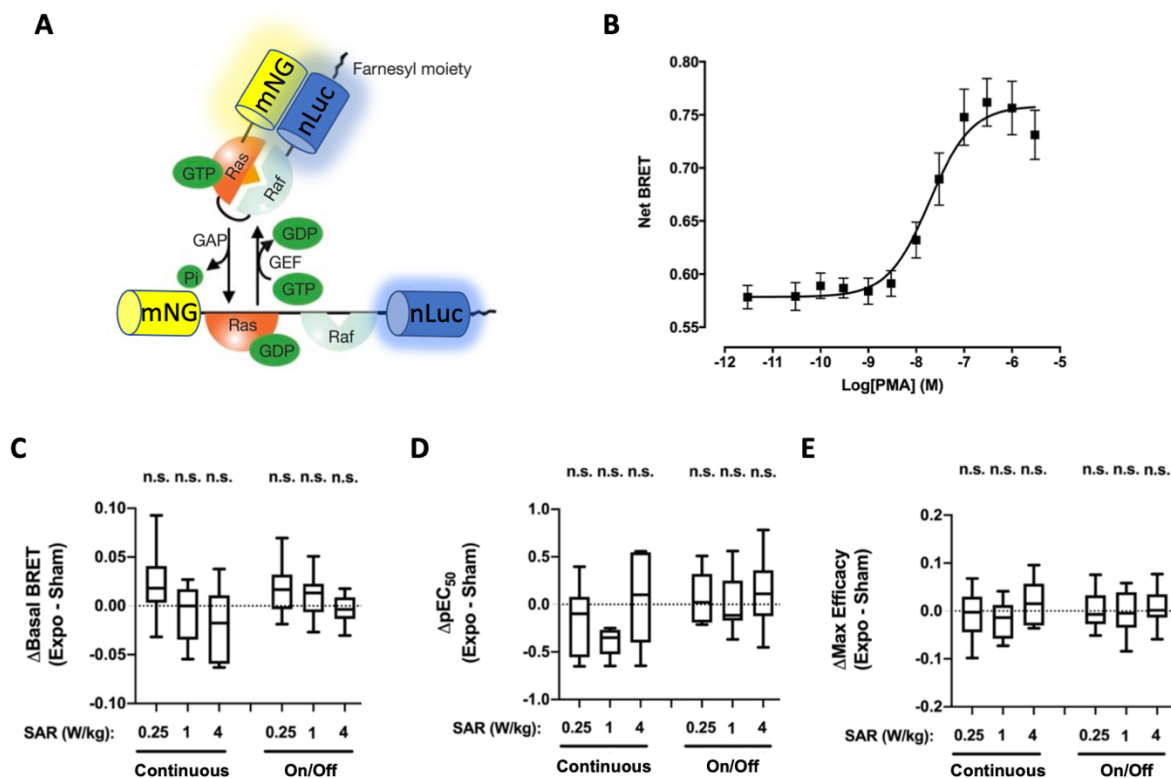
**Figure 1:** Effect of continuous or intermittent 5G signal exposure on HSF1 activation in XP6BE fibroblasts. A) Mode of action of the intermolecular HSF1 BRET assay. B) Dose-response curves of MG132-induced changes in NLuc-HSF1/mNeonG-HSF1 BRET signal. XP6BE fibroblasts cells transiently co-expressing NLuc-HSF1 and mNeonG-HSF1 proteins were activated for 18 h at 37°C with increasing



concentration of MG132 before BRET measurement. The results represent the average  $\pm$  S.E.M. of 10 independent experiments done in duplicate. The pEC50 of MG132 was  $6.83 \pm 0.25$  while the maximal efficacy of MG132 was  $0.106 \pm 0.018$ . C, D and E) XP6BE skin fibroblasts transfected with the NLuc-HSF1 / mNeonG-HSF1 BRET probe were sham-exposed or exposed to 5G-modulated 3.5 GHz at 0.25, 1 or 4 W/kg for 24 h either continuously or intermittently (5 min ON / 10 min OFF). Cells were activated using increasing concentrations of MG132 under sham or RF-EMF exposure for the last 18 h of the RF-EMF exposure period before BRET measurement were performed. C-E) The results in panels C-E represent the Box and whisker plots of the basal BRET variation (C), the MG132-potency variation (D) and the MG132-maximal efficacy variation (E) between the 5G RF-EMF exposed- (Expo) and sham-conditions in both continuous and intermittent exposure mode. Statistical significance of the derivation from the null hypothesis (no difference between sham and RF-EMF exposure) was assessed using the one-Sample Wilcoxon Signed Rank Test. The number of replicates  $n = 6-12$  depending on the experimental condition. n.s.: not significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

### Impact of 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF exposure on basal or chemically-induced RAS and ERK activities in XP6BE fibroblasts cells.

To assess the potential impact of 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF exposures on basal- or chemically-induced RAS activity, XP6BE fibroblast cells were transfected with a BRET probe consisting in sandwiching the H-Ras and the Ras-Binding Domain of Raf (Raf RBD) in-between NLuc and mNeonGreen. This molecular BRET probe is derived from the Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)- probe described by the Matsuda laboratory (Mochizuki *et al*, 2001; Komatsu *et al*, 2011), and relies on the rapprochement of NLuc and mNeonG following the binding of GTP-Ras to Raf RBD (Fig. 2A).



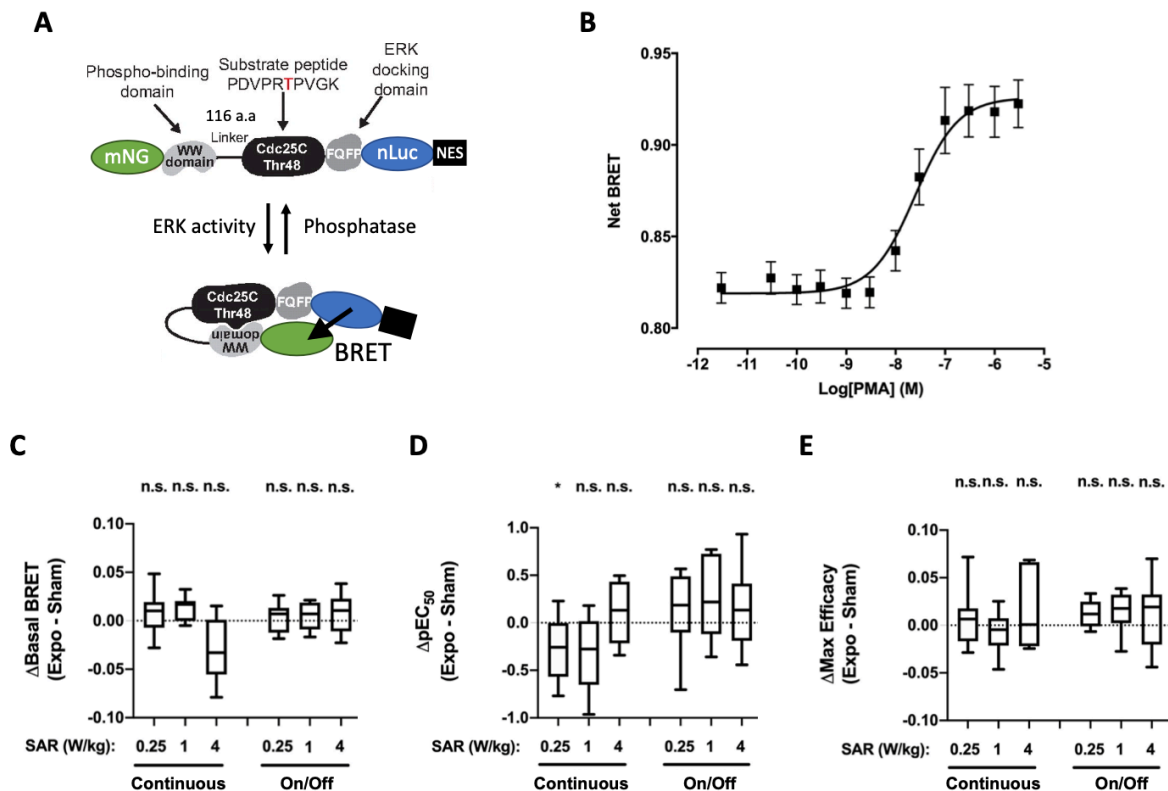
**Figure 2:** Effect of continuous or intermittent 5G RF-EMF exposure on RAS activation in XP6BE skin fibroblasts. A) Mode of action of the RAS BRET biosensor. B) Dose-response curves of PMA-induced change in RAS activity using the pRaichuEV-Ras BRET probe. XP6BE fibroblasts were activated for 15 min at 37°C with increasing concentration of PMA before BRET measurement. The results represent the average  $\pm$  SEM of 10 independent experiments done in duplicate. The pEC<sub>50</sub> of PMA was  $7.60 \pm 0.17$  while the maximal efficacy of PMA was  $0.107 \pm 0.012$ . C, D and E) XP6BE fibroblasts cells transfected with the pRaichuEV-Ras BRET probe were sham-exposed or exposed to 5G-modulated 3.5 GHz at 0.25, 1 or 4 W/kg for 24 h, either continuously or intermittently (5 min ON / 10 min OFF). Cells were activated using increasing concentrations of PMA under sham or RF-EMF exposure for the last 15 m before BRET measurement were performed. The results in panels C-E represent the Box and whisker plots of the basal BRET variation (C), the PMA-potency variation (D) and the PMA-maximal efficacy variation (E) between the 5G RF-EMF exposed- (Expo) and sham- conditions in both continuous or intermittent exposure mode. Statistical significance of the derivation from the null hypothesis (no difference between sham and RF-EMF exposure) was assessed using the one-Sample Wilcoxon Signed Rank Test. The number of replicates n = 6-12 depending on the experimental condition. n.s.: not significant; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01.

Similarly, the potential impact of 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal exposure on basal- or chemically-induced ERK activity was assessed in XP6BE fibroblast cells transfected with a BRET probe comprising a ERK sensor domain and a ERK ligand domain connected by a flexible linker, but sandwiched by a mNeonG and NLuc instead of two fluorescent energy acceptor and donor as initially described (Komatsu *et al*, 2011)(Fig 3A). Once activated, endogenous ERK proteins phosphorylate the sensor part of this BRET probe. This triggers the sensor domain interaction with the ligand domain, thereby inducing the biosensor closure onto itself. Such conformational change brings NLuc in close proximity to mNeonGreen, thereby increasing the BRET efficiency.

XP6BE fibroblasts transiently expressing these RAS and ERK-sensitive BRET probes were therefore challenged for 15 min with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), a well-known phorbol-ester mimicking diacylglycerol leading to PKC-dependent activation of RAS and ERK (Hatzis *et al*, 2006). As expected, PMA induced a concentration-dependent increase of the BRET measured with the RAS (Fig. 2B) and ERK (Fig. 3B) BRET probes. Furthermore, for both BRET probes, the measured EC<sub>50</sub> were in the tens of nanomolar range, again demonstrating the high sensitivity of our BRET-based assays to monitor RAS and ERK activation.

Continuous or intermittent exposure of XP6BE fibroblasts transiently expressing the RAS and ERK probes to 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal for 24 h neither impacted RAS and ERK basal BRET (Fig. 2C and Fig. 3C, Table 1 and 2) nor PMA potency (Fig. 2D and Fig. 3D, Table 3) or maximal efficacy (Fig. 2E or Fig. 3E, Table 4) to activate these kinases. We only measured

a slight decrease in the PMA potency to activate ERK in XP6BE fibroblasts continuously exposed for 24 h at a SAR of 0.25 W/kg (Fig. 3D, Table 3).

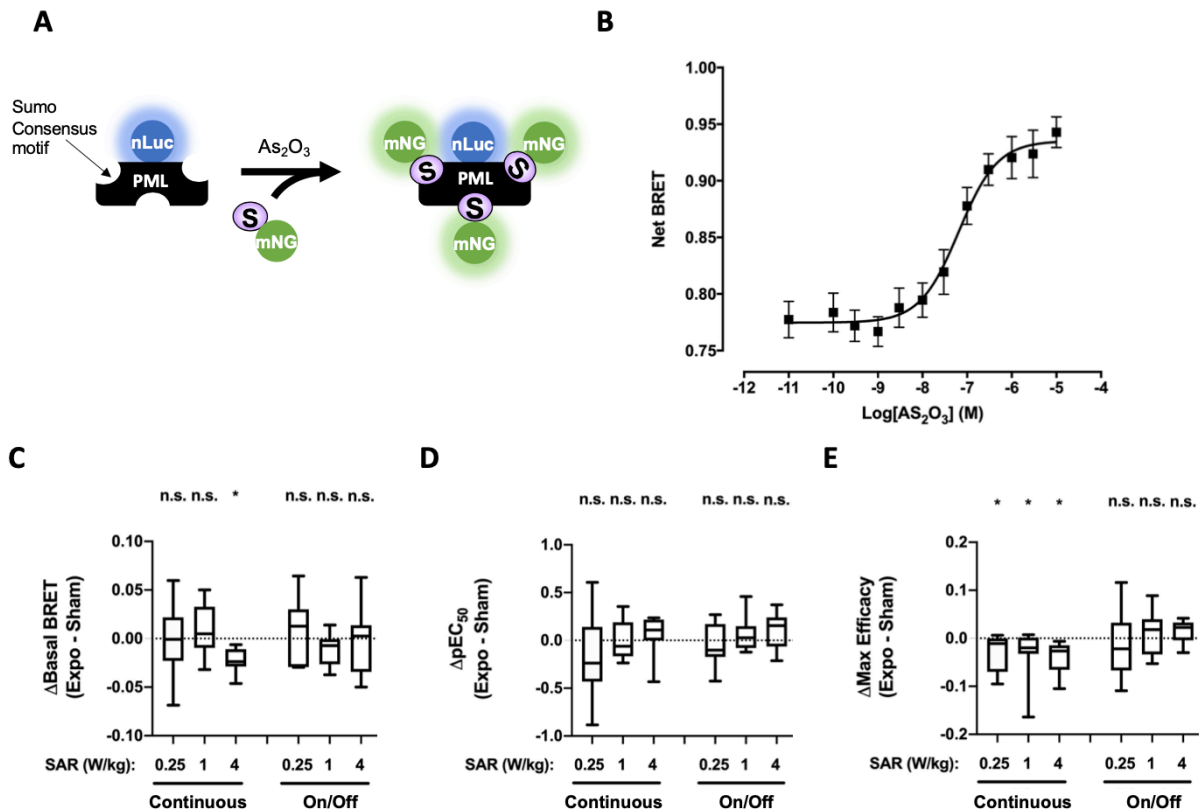


**Figure 3:** Effect of continuous or intermittent 5G RF-EMF exposure on ERK activation in XP6BE skin fibroblasts. A) Mode of action of the ERK BRET biosensor. B) Dose-response curves of PMA-induced change in ERK activity using the pEKAREV BRET probe. XP6BE fibroblasts were activated for 15 min at 37°C with increasing concentration of PMA before BRET measurement. The results represent the average  $\pm$  SEM of 10 independent experiments done in duplicate. The pEC50 of PMA was  $7.72 \pm 0.15$  while the maximal efficacy of PMA was  $0.178 \pm 0.018$ . C, D and E) XP6BE fibroblast cells transfected with the pEKAREV BRET probe were sham-exposed or exposed to 5G-modulated 3.5 GHz at 0.25, 1 or 4 W/kg for 24 h, either continuously or intermittently (5 min ON / 10 min OFF). Cells were activated using increasing concentrations of PMA under sham or RF-EMF exposure for the last 15 m before BRET measurement were performed. The results in panels C-E represent the Box and whisker plots of the basal BRET variation (C), the PMA-potency variation (D) and the PMA-maximal efficacy variation (E) between the 5G RF-EMF exposed- (Expo) and sham- conditions in both continuous or intermittent exposure mode. Statistical significance of the derivation from the null hypothesis (no difference between sham and RF-EMF exposure) was assessed using the one-Sample Wilcoxon Signed Rank Test. The number of replicates  $n = 6-12$  depending on the experimental condition. n.s.: not significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

### Impact of 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF exposure on basal or chemically-induced PML SUMOylation in XP6BE fibroblasts cells.

Finally, knowing that post-translational covalent addition of SUMO to PML, a process known as SUMOylation, is a key-event leading to PML activation and the formation of PML

NBs, we used an intermolecular BRET assay to assess whether continuous or intermittent 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal exposure may affect PML activity (Percherancier *et al*, 2009). In this assay, we measured the BRET signal between a SUMO1 protein N-terminally tagged with mNeonGreen and a PMLIII protein C-terminally tagged to NLuc (Fig. 4A). XP6BE fibroblasts transiently transfected with PMLIII-NLuc / mNeonG-SUMO1 expression vectors were therefore challenged with arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ), a well-known oxidative-stress inducer in cells (Flora, 2011) that efficiently triggers PML SUMOylation (Muller, 1998; Percherancier *et al*, 2009). As expected,  $As_2O_3$  dose-dependently increased the BRET signal between PMLIII-NLuc and mNeonG-SUMO1 in XP6BE fibroblasts cells with an  $EC_{50}$  in the tens of nanomolar range (Fig. 4B), indicating an efficient PML SUMOylation in these cells. Furthermore, neither basal PML SUMOylation nor  $As_2O_3$  potency or maximal efficacy to trigger PML SUMOylation was affected following intermittent exposure of transiently transfected XP6BE fibroblasts to 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal for 24 h, whatever the SAR tested (Fig. 4 C-E). We, however, measured a slight but reproducible decrease in the basal PML SUMOylation when XP6BE fibroblasts were continuously exposed for 24 h at 4 W/kg (Fig. 4C). This variation stood for less than 3.5% of the PML basal BRET signal (Table 1) and for 14.9 % of the  $As_2O_3$  maximal efficacy (in absolute terms)(Table 2). Also, continuous exposure for 24 h did not change  $As_2O_3$  potency to trigger PML SUMOylation (Fig. 4D, Table 3), but led to a slight decrease in  $As_2O_3$  maximal efficacy when compared to the sham condition (Fig. 4E, Table 4).

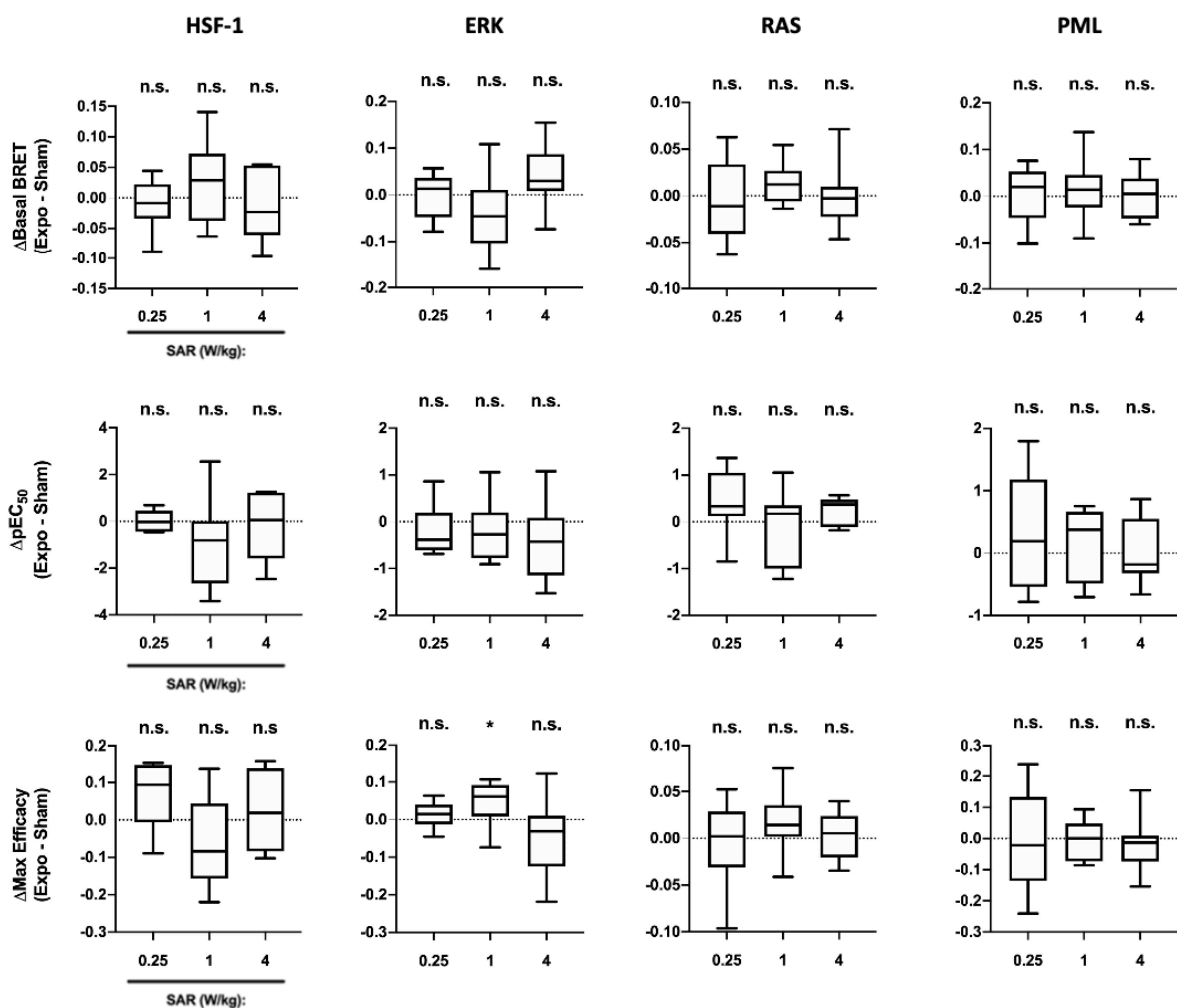


**Figure 4:** Effect of continuous or intermittent 5G-EMF exposure on PML SUMOylation in XP6BE skin fibroblasts. A) Schematic description of the intermolecular BRET assays for the detection of PML SUMOylation. B) Dose-response curves of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced PML SUMOylation using the PML-NLuc / mNeonGreen-SUMO1 intermolecular assay. XP6BE fibroblasts were activated for 4 h at 37°C with increasing concentration of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> before BRET measurement. The results represent the average ± SEM of 10 independent experiments done in duplicate. The pEC<sub>50</sub> of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was 7.19 ± 0.15 while the maximal efficacy of PMA was 0.161 ± 0.014. C, D and E) XP6BE fibroblasts co-transfected with the mammalian expression vector encoding PML-NLuc and mNeonGreen-SUMO1 were sham-exposed or exposed to 5G modulated 3.5 GHz at 0.25, 1 or 4 W/kg for 24 h, either continuously or intermittently (5 min ON / 10 min OFF). Cells were activated using increasing concentrations of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> under sham or RF-EMF exposure for the last 4 h before BRET measurement were performed. The results in panels C-E represent the Box and whisker plots of the basal BRET variation (C), the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-potency variation (D) and the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-maximal efficacy variation (E) between the 5G RF-EMF exposed- (Expo) and sham-conditions in both continuous or intermittent exposure mode. Statistical significance of the derivation from the null hypothesis (no difference between sham and RF-EMF exposure) was assessed using the one-Sample Wilcoxon Signed Rank Test. The number of replicates n = 6-12 depending on the experimental condition. n.s.: not significant; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01.

#### Impact of 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF exposure on basal or chemically-induced HSF1, RAS/ERK and PML activities in HaCAT keratinocyte cells.

In a further effort to study the potential effect of 5G signal on skin cells and given that the upper layers of the skin (epidermis) are primarily composed of keratinocytes, we performed a new set of experiments in the HaCaT keratinocyte cell line to assess whether a

24 h continuous exposure to 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF may impact HSF1, RAS, ERK, and PML activities. HaCaT cells transiently transfected with the BRET probes probing HSF1, RAS, ERK, and PMLIII were respectively challenged with increasing concentration of MG132 (for HSF1), PMA (for RAS and ERK), and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (for PML) following sham or continuous exposure to 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF for 24 h at three different SAR: 0.25, 1, and 4 W/kg. Dose-response curves were generated for each experimental condition (See Supp. Fig. 1 for the curves derived from the sham-exposed condition). Basal BRET of each probe, and the potency and maximal efficacy of each chemical agent were therefore calculated, and the variation of each parameter between sham-exposed and RF-EMF exposed conditions was reported in Fig. 5. We found no difference between sham and exposed conditions, whatever the molecular target, the SAR, or the metric considered. The only exception was a slight increase in the maximal PMA efficacy to activate ERK when HaCaT cells were exposed at 1 W/kg.



**Figure 5:** Effect of continuous or intermittent 5G RF-EMF exposure on HSF1, ERK, RAS and PML activities in HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes cells transiently expressing HSF1, ERK, RAS and

PML constructs were sham-exposed or exposed to 5G-modulated 3.5 GHz at 0.25, 1 or 4 W/kg for 24 h, either continuously or intermittently (5 min ON / 10 min OFF). Cells were activated using increasing concentrations of either MG132 (HSF1), PMA (RAS and ERK) or As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (PML) under sham or RF-EMF exposure for the last 18h (HSF1), 15 min (RAS and ERK) or 4 h (PML) of the RF-EMF exposure period before RF-EMF exposure was stopped and BRET signals were measured immediately. For each dose response curve, basal BRET signal, potency and maximal efficacy of the activating chemical agent were derived and reported as boxes and whisker plots of the variation between the 5G RF-EMF exposed- (Expo) and sham- conditions in both continuous or intermittent exposure mode. Statistical significance of the derivation from the null hypothesis (no difference between sham and RF-EMF exposure) was assessed using the one-Sample Wilcoxon Signed Rank Test. The number of replicates n = 6-13 depending on the experimental condition. n.s.: not significant; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01.

### **Discussion**

In this study, we assessed whether continuous or intermittent (5 min ON / 10 min OFF) exposure to 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF signal at 0.25, 1, and 4 W/kg for 24 h under isothermal conditions impacted human skin fibroblast and keratinocyte cell stress response at the molecular level. Using our own existing BRET-based molecular probes, we focused on HSF1, RAS/ERK, and PML proteins which are at the crossroad of various molecular pathways, ensuring proper cell response to a wide array of environmental stress, including thermal injury, oxidative stress, and proteotoxic stress (Barna *et al*, 2018). We assessed whether 5G-signal exposure affected either basal or chemically-activated activity for each of these cellular stress molecular markers.

We found that the HSF1 basal BRET level was reduced when XP6BE fibroblasts cells were respectively exposed to continuous and intermittent 5G signal for 24 h at 0.25 W/kg and to intermittent 5G signal for 24 h at 1 W/kg. No change in HSF1 basal BRET signal was detected at 1 W/kg when a continuous signal was used or when cells were continuously or intermittently exposed at 4 W/kg.

At first glance, the RF-EMF induced decrease of the HSF1 basal BRET signal may appear relatively small since it represents only 6-11% of the HSF1 basal BRET signal in the sham experiment (Fig. 1B). However, since chemical activation with MG132 only increased the basal BRET by 0.1 BRET unit (i.e., a 14% increase of the basal BRET)(Fig. 1B), the effect of 5G RF-EMF exposure appear important in term of absolute values. Interestingly, these results parallel the ones previously obtained by us with HEK293T cells exposed for 24 h to either unmodulated (continuous wave, CW) or GSM-modulated 1.8 GHz signal (Poque *et al*, 2021). In this former

work, RF-EMF exposure slightly decreased the HSF1 basal activity at the lower SAR tested (1.5 W/kg) but not at higher SAR (4 W/kg). Whether the effect of RF-EMF on basal HSF1 may impact the physiological HSF1-dependent stress response in RF-EMF exposed organisms remains to be determined. In this previous in-vitro study, while we detected that MG132 maximal efficacy to trigger HSF1 trimerization in HEK293T cells was increased following 24 h exposure to CW or GSM signals at 1.5 W/kg and to CW signal at 6 W/kg (Poque *et al*, 2021), we did not detect any variation of the MG132 potency or efficacy to trigger HSF1 activation following 5G RF-EMF exposure (Fig. 1).

Considering the other BRET assays performed on skin fibroblasts, we only detected a slight leftward shift, less than a quarter of a log, of PMA potency to activate ERK at 0.25 W/kg and a small reduction in As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> efficacy to trigger PML SUMOylation, but only when cells were continuously exposed. No other RF-induced effect could be detected on 5G RF-EMF exposed fibroblasts, whatever the molecular probe considered and whatever the SAR or the signal envelope used. Finally, all over the assays performed on keratinocytes, we only detected a ~37% increase in PMA efficacy to activate ERK at 1 W/kg but not at 0.25 or 4 W/kg.

Altogether, these results can appear puzzling at several levels. Considering the cell types used, it is remarkable that RF-EMF exposure with two different carrier waves (1.8 and 3.5 GHz) and with different signal modulation (CW or GSM-modulation in our previous study and 5G-modulation in the present study) can consistently decrease HSF1 basal activity in HEK293T embryonic kidney cells (Poque *et al*, 2021) and XP6BE skin fibroblasts (Fig. 1) but not in HaCaT keratinocytes (Fig. 5). Similarly, we detected that PMA maximal efficacy to activate ERK i) decreased when HEK293T cells were exposed to an CW or a GSM-modulated 1.8 GHz signal, ii) increased in keratinocytes, but iii) was not impacted in 5G RF-EMF exposed skin fibroblasts. Finally, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> maximal efficacy to trigger PML SUMOylation was slightly decreased in skin fibroblasts when exposed continuously but was not modified in keratinocytes.

Several authors have already reported qualitative or quantitative variations in some biomolecular effects induced in different cell lines following their exposure to RF-EMF signals in the GHz range under identical experimental conditions (Szymanski *et al*, 2018a; Choi *et al*,



2020; Xu *et al*, 2013). While it is fully expected that different cell types can respond differently to the same stimulus, to our knowledge, no research team has yet elucidated why and how low-level RF-EMF may impact living matter. Beside the lack of non-thermal mechanisms, it is also intriguing that the few RF-EMF induced effects herein detected on HSF1, ERK, and PML activities do not follow a classical dose-response profile. For example, the RF-EMF induced inhibition of HSF basal activity in human skin fibroblasts could only be detected at 0.25 W/kg but not at 4 W/kg, in both intermittent and continuous exposures. Strikingly, at 1 W/kg, there was no change in the HSF1 basal BRET when the cells were continuously exposed, while the HSF1 basal BRET was further decreased when the cells were intermittently exposed. Similarly, PMA maximal efficacy to activate ERK in keratinocytes was increased at 1 W/kg but neither at 0.25 W/kg nor 4 W/kg (Fig. 5). Only As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> maximal efficacy to trigger PML SUMOylation seemed to decrease dose-dependently with the SAR under continuous exposure, but the magnitude of this effect was small (Table 4).

May RF-EMF exposure at low levels elicit a non-thermal biological effect while RF-EMF exposure at higher levels may not? Several authors in this research field have already reported on the so-called "window" effect, where EMF exposure at specific intensities produces a given biological effects than could not be detected using EMF exposure to lower or higher intensities (Bawin & Adey, 1976; Markov, 2005). Unfortunately, no further experimental proofs were later published concerning such window effect and, accordingly, no explanation concerning the underlying molecular mechanism was provided by the authors

More recently, (Pooam *et al*, 2022) invoked an hormetic dose-response effect to explain that ROS production in HEK293T cells exposed to 1.8 GHz RF-EMF is maximal at an intermediate signal amplitude (Pooam *et al*, 2022). Hormesis is a toxicological concept characterized by a stimulated biological response when exposed to a low, subtoxic amount of stressor and by detrimental effects of high, toxic levels of the same stressor (Agathokleous & Calabrese, 2022). Furthermore, an impressive array of cytoprotective molecular mechanisms and signal transduction pathways have been shown to respond in a hormetic way, including the activation of HSF1 and ERK (Amirkavei *et al*, 2022; Calabrese, 2013). Therefore, whether RF-EMF exposure, alone or in combination with a chemical activating agent, could trigger or magnify a hormetic response on HSF1 or ERK activity needs to be studied more carefully.

Interestingly, hormesis is also a time-dependent process (Calabrese, 2008). Of note, a time-dependent hormetic effect has been proposed to explain that short exposure (1 h) to 1.8 GHz RF-EMF at an average SAR of 4.0 W/kg induces DNA fragmentation in mouse embryonic fibroblasts while more prolonged exposure (36 h) decreased DNA fragmentation to a lower level than for the sham condition (Sun *et al*, 2016). Accordingly, since we only tested one exposure time (24 h), it will be interesting to repeat these experiments in a near future to assess potential time-dose-dependent variation of the herein detected effects.

In conclusion, our BRET study shows very limited evidence that molecular effects can arise when skin cells are exposed to a 5G RF-EMF signal (3.5 GHz) for 24 h, even at levels above the ICNIRP guidelines for far-fields public exposure (0.08 W/kg). Only a few statistically-significant changes were detected that depend on i) the molecular mechanism studied, ii) the type of cells used, iii) the presence of an activating chemical agent, with a most than probable time- and dose-dependency, and iv) the characteristics of the RF-EMF exposure such as SAR, frequency, or modulation of the carrier wave. Given that we used more than 100 different experimental parameters and that all but one of the detected effects were within a risk of 5% error ( $p < 0.05$ ), it was statistically expected to have some false positive data. We reached a similar conclusion when we studied the effect of various 1.8 GHz signals on primary brain cell cultures and neuroblastoma cell lines using label-free techniques (Joushomme *et al*, 2022). As a consequence, apart from the effect of RF EMF on HSF1 basal activity that may deserve further investigations, we found no sufficient evidence toward physiological effect of the tested RF-EMF alone or in combination with chemicals.

**Tables :**

**Table 1:** Percentage of RF EMF-induced basal BRET change relative to the basal BRET under the sham condition. Data were acquired in XP6BE skin fibroblasts transfected with the indicated BRET probe and either sham-exposed or exposed for 24 h to continuous or intermittent 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF at 0.25, 1 or 4 W/kg. ns: no significant changes of the basal BRET has been detected. \* p<0.05. \*\* p<0.01. The number of independent experiments performed is indicated in parenthesis.

	<b>SAR (W/kg)</b>	<b>HSF1</b>	<b>RAS</b>	<b>ERK</b>	<b>PML</b>
<b>Continuous</b>	<b>0.25</b>	<b>-5.4 % * (12)</b>	<b>ns (12)</b>	<b>ns (12)</b>	<b>ns (12)</b>
	<b>1</b>	<b>ns (8)</b>	<b>ns (7)</b>	<b>ns (6)</b>	<b>ns (8)</b>
	<b>4</b>	<b>ns (7)</b>	<b>ns (6)</b>	<b>ns (7)</b>	<b>-3.1 * (7)</b>
<b>Intermittent</b>	<b>0.25</b>	<b>-5.9 % * (8)</b>	<b>ns (8)</b>	<b>ns (8)</b>	<b>ns (8)</b>
	<b>1</b>	<b>-9.5 % ** (8)</b>	<b>ns (9)</b>	<b>ns (9)</b>	<b>ns (9)</b>
	<b>4</b>	<b>ns (13)</b>	<b>ns (13)</b>	<b>ns (13)</b>	<b>ns (13)</b>

**Table 2:** Percentage of RF EMF-induced basal BRET change relative to the maximal efficacy of MG132, PMA and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> to activate HSF1, RAS/ERK and PML, respectively. Data were acquired in XP6BE skin fibroblasts transfected with the indicated BRET probe and exposed for 24 h to continuous or intermittent 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF at 0.25, 1 or 4 W/kg. ns: no significant changes of the basal BRET has been detected. \* p<0.05. \*\* p<0.01. The number of independent experiments performed is indicated in parenthesis.

	<b>SAR (W/kg)</b>	<b>HSF1</b>	<b>RAS</b>	<b>ERK</b>	<b>PML</b>
<b>Continuous</b>	<b>0.25</b>	<b>-34.9 % *(12)</b>	<b>ns (12)</b>	<b>ns (12)</b>	<b>ns (12)</b>
	<b>1</b>	<b>ns (8)</b>	<b>ns (7)</b>	<b>ns (6)</b>	<b>ns (8)</b>
	<b>4</b>	<b>ns (7)</b>	<b>ns (6)</b>	<b>ns (7)</b>	<b>-14.9 % * (7)</b>
<b>Intermittent</b>	<b>0.25</b>	<b>-37.7 % * (8)</b>	<b>ns (8)</b>	<b>ns (8)</b>	<b>ns (8)</b>
	<b>1</b>	<b>-61.3 % ** (8)</b>	<b>ns (9)</b>	<b>ns (9)</b>	<b>ns (9)</b>
	<b>4</b>	<b>ns (13)</b>	<b>ns (13)</b>	<b>ns (13)</b>	<b>ns (13)</b>

**Table 3:** RF EMF-induced change in MG132, PMA and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pEC<sub>50</sub> values measured in XP6BE skin fibroblasts transfected with the indicated BRET probe following continuous or intermittent exposure to 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF at 0.25, 1 or 4 W/kg for 24 h (for each probe, the corresponding drug used in dose-response experiments is indicated). ns: no significant changes of the pEC<sub>50</sub> has been detected. \* p<0.05. When a significant change has been detected, the RF EMF-induced variation of the pEC<sub>50</sub> ± S.E. is indicated. The number of independent experiments performed is indicated in parenthesis.

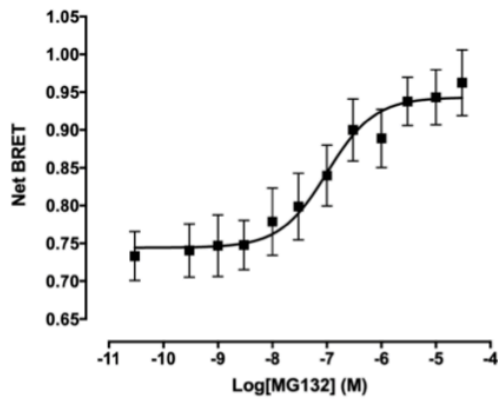
	<u>SAR (W/kg)</u>	<u>HSF1(MG132)</u>	<u>RAS(PMA)</u>	<u>ERK(PMA)</u>	<u>PML(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)</u>
<i>Continuous</i>	<b>0.25</b>	<i>ns (12)</i>	<i>ns (12)</i>	<b>-0.27 * (12)</b>	<i>ns (12)</i>
	<b>1</b>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (7)</i>	<i>ns (6)</i>	<i>ns (8)</i>
	<b>4</b>	<i>ns (7)</i>	<i>ns (6)</i>	<i>ns (7)</i>	<i>ns (7)</i>
<i>Intermittent</i>	<b>0.25</b>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (8)</i>
	<b>1</b>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (9)</i>	<i>ns (9)</i>	<i>ns (9)</i>
	<b>4</b>	<i>ns (13)</i>	<i>ns (13)</i>	<i>ns (13)</i>	<i>ns (13)</i>

**Table 4:** Percentage of RF EMF-induced change in the MG132, PMA and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> maximal efficacy to activate HSF1, RAS/ERK and PML, respectively. Data were acquired in XP6BE skin fibroblasts transfected with the indicated BRET probe and exposed for 24 h to continuous or intermittent 5G-modulated 3.5 GHz RF-EMF at 0.25, 1 or 4 W/kg. ns: no significant changes of the basal BRET has been detected. \* p<0.05. The number of independent experiments performed is indicated in parenthesis.

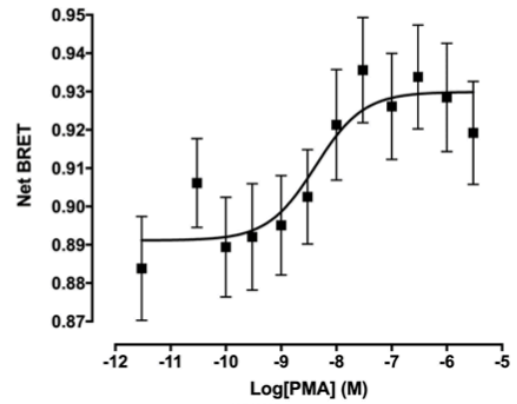
	<u>SAR (W/kg)</u>	<u>HSF1(MG132)</u>	<u>RAS(PMA)</u>	<u>ERK(PMA)</u>	<u>PML(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)</u>
<i>Continuous</i>	<b>0.25</b>	<i>ns (12)</i>	<i>ns (12)</i>	<i>ns (12)</i>	<b>-17.4 % * (12)</b>
	<b>1</b>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (7)</i>	<i>ns (6)</i>	<b>-19.9 % * (8)</b>
	<b>4</b>	<i>ns (7)</i>	<i>ns (6)</i>	<i>ns (7)</i>	<b>-23.6 % * (7)</b>
<i>Intermittent</i>	<b>0.25</b>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (8)</i>
	<b>1</b>	<i>ns (8)</i>	<i>ns (9)</i>	<i>ns (9)</i>	<i>ns (9)</i>
	<b>4</b>	<i>ns (13)</i>	<i>ns (13)</i>	<i>ns (13)</i>	<i>ns (13)</i>

## Supplementary datas

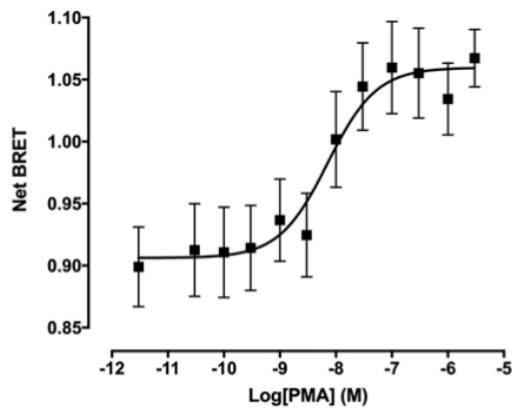
**A**



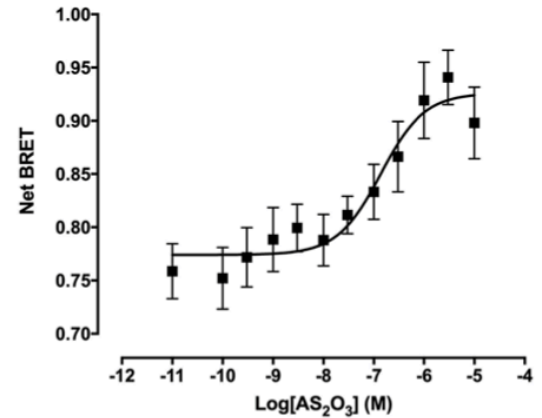
**B**



**C**



**D**



**Supplementary Figure 1:** Dose-response curves obtained in HaCaT transfected cells. A) Dose-response curves of MG132-induced changes in NLuc-HSF1/mNeonG-HSF1 BRET signal. B) Dose-response curves of PMA-induced changes in RAS activity using the pRaichuEV-Ras BRET probe. C) Dose-response curve of PMA-induced change in ERK activity using the pEKAREV BRET probe. D) Dose-response curve of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced PML SUMOylation using the PML-NLuc / mNeonGreen-SUMO1 intermolecular assay. HaCaT keratinocytes were activated for 16h, 15 min or 4 h at 37°C with increasing concentration of MG132, PMA and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, respectively, before BRET measurement. The results represent the average ± SEM of 10 independent experiments done in duplicate.

**Étude de l'activité  
de canaux ioniques  
thermosensibles  
sous exposition RF  
à l'aide du BRET**



## VII - Étude de l'activité de canaux ioniques thermosensibles sous exposition RF à l'aide du BRET

### 1- Introduction

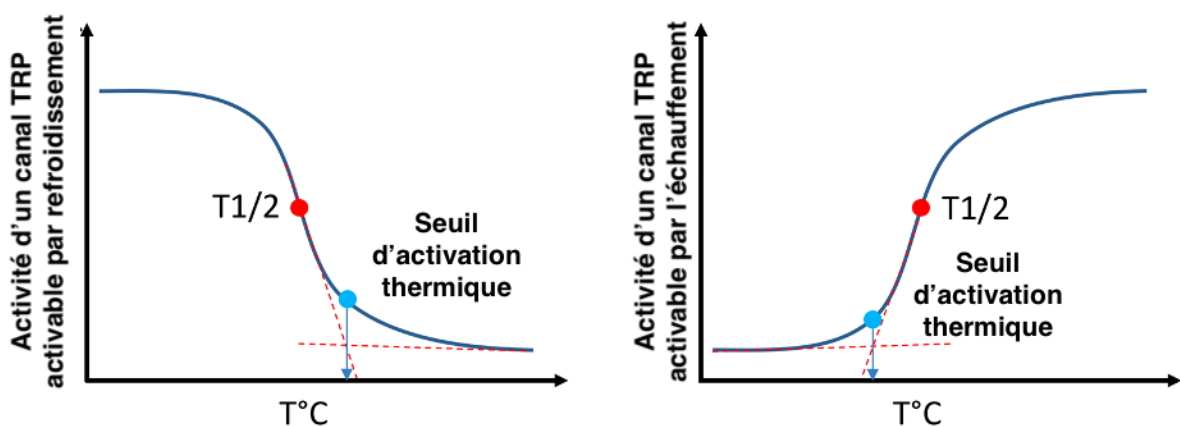
Comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, les canaux thermosenseurs que sont les TRP sont une cible potentielle pour les effets des RF. Ces canaux sont activés de manière polymodale, ce qui signifie qu'ils ont la capacité d'être activés par des stimuli de différentes natures (température, agent chimique, pression, étirement, pH...). Dans le cas des canaux TRP, cette polymodalité s'accompagne d'une interdépendance entre les différents modes d'activation (Brauchi *et al*, 2004). Ce concept a par exemple été discuté dans Matta & Ahern, 2007 où il est dit que «*l'ouverture des canaux TRPV1 et TRPM8 est régulée de manière synergique à la fois par des stimuli physiques, chimiques et thermiques* ». Ainsi il est possible d'imaginer que les RF n'aient pas d'impact sur la réponse des canaux à la température, mais aient un impact sur un autre mode d'activation comme le mode chimique. Plus encore, les RF pourraient interférer dans la dépendance entre deux modes d'activation, et par exemple, modifier l'impact de la température sur la réponse d'un canal thermo-TRP à un agoniste. Pour vérifier cela, nous avons choisi de caractériser la réponse de différents agonistes et antagonistes sur les canaux étudiés, et cela, à différentes températures. Cela permettra par la suite de procéder à l'étude de l'impact des RF sur la réponse des ligands spécifiques aux canaux d'intérêt lors d'une activation thermique concomitante.

Étudier les variations d'activité des canaux ionique au cours d'un changement de température est classiquement réalisé à l'aide de sondes fluorescentes, comme les sondes de type FURA (Kochukov *et al*, 2006; Peier *et al*, 2002) qui mesurent en fait les variations de concentration de calcium cytoplasmique. L'activité du canal étant alors mesurée de manière indirecte, l'existence de biais expérimentaux (comme l'entrée de calcium par une autre structure) n'est pas à exclure. On peut également étudier l'impact de la température sur les canaux thermo-TRP à l'aide du patch-clamp (Liu & Qin, 2019; Peier *et al*, 2002). Cependant, il est connu que le patch-clamp manuel est difficilement réalisable à des températures supérieures à 30°C. Par ailleurs, les canaux thermo-TRP étant également des mécanosenseurs, la technique du patch-clamp qui est invasive par nature, pourrait entraîner des biais expérimentaux. Au contraire, la technique du BRET reste non-invasive et mon laboratoire



d'accueil a déjà montré que des sondes intramoléculaires ciblant le canal TRPV1 rendaient parfaitement compte du caractère thermosensible de ce canal (Ruigrok *et al*, 2017). Dans ce dernier volet de mon travail de thèse, nous allons donc créer et caractériser des sondes BRET ciblant les canaux thermo-TRP TRPV4, TRPA1 et TRPM8 sensibles respectivement aux températures ambiantes ( $\sim 30^{\circ}\text{C}$ ) et aux températures froides ( $<15^{\circ}\text{C}$ ). Une fois ces sondes construites, il s'agira de vérifier si ces sondes BRET permettent effectivement d'analyser la réponse de ces canaux thermo-TRP aux variations de température. Nous espérons obtenir des courbes similaires à celles de la

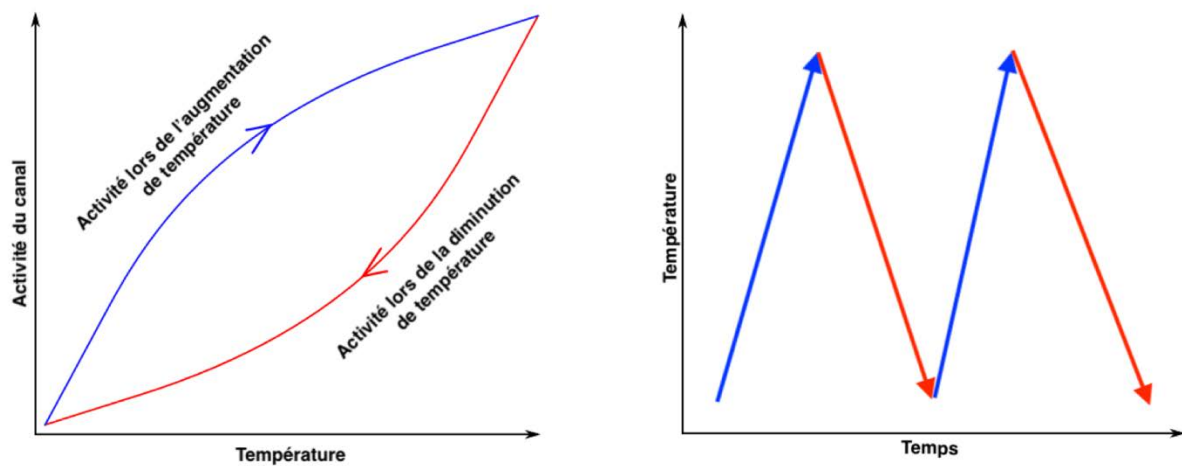
Figure 36 grâce auxquelles nous pourrions déterminer i) le seuil de température à partir duquel la sonde étudiée est activée, ii) la température de demi-activation et iii) l'amplitude maximale de la réponse. Afin d'effectuer ces expériences nous allons devoir mesurer les signaux BRET tout en balayant la plage de températures utiles aux différents canaux thermo-TRP étudiés.



**Figure 36** - Représentation théorique de l'effet de la température sur les canaux ioniques TRP sensibles au froid et au chaud. En dessous d'un seuil de température (point bleu), l'activité des TRP sensibles au froid devrait augmenter tandis que l'activité des canaux TRP sensibles au chaud (ainsi qu'aux températures ambiantes) augmentera au-dessus de leur seuil d'activation thermique. T1/2 est défini comme le point d'activation de la température semi-maximale (points rouges).

Nous chercherons également à caractériser si nos sondes BRET permettent d'étudier l'impact des variations cycliques de la température sur l'activité des canaux thermo-TRP. En effet, lors de précédentes études, il a pu être observé que l'activité des canaux thermo-TRP peut être modulée par des cycles de variation de la température. La variation d'activité des canaux thermo-TRP en fonction de la température est alors différente lorsque la température augmente après une étape de refroidissement ou diminue après un échauffement. Il s'agit là

du phénomène d'hystérèse (ou hystérésis) défini comme la capacité d'un système à emprunter des chemins différents suivant l'augmentation ou bien la diminution d'un même paramètre physique. Des hystérèses de l'activité de canaux thermo-TRP lors de l'application cyclique et répétée de variation de températures ont été rapportées pour TRPV3 (Xu *et al*, 2002), TRPA1 (Sinica *et al*, 2019), TRPM8 (Olivares *et al*, 2015), ou encore TRPV4 (Watanabe *et al*, 2002). Cette variation hystérétique de l'activité serait le résultat d'une sensibilisation ou d'une désensibilisation d'un canal en fonction des cycles de variation de la température (Figure 37). Les hystérèses entraînent, de fait, des non-linéarités dans la relation entre un paramètre physique tel que la température et l'activité du canal, rendant difficile la prédiction des réactions d'un canal lorsqu'on introduit un stimulus externe (chimique ou physique).



**Figure 37** - Schéma représentant une hystérèse théorique de l'activité d'un canal TRP en fonction de la température (à gauche). Les variations de température imposées au système sont représentées à droite.

Enfin, la sensibilité de ces sondes BRET à des composés agonistes et antagonistes sera également testée. Ce n'est qu'une fois ces étapes de validation réalisées, que nous pourrons évaluer l'impact des champs RF sur la pharmacologie et la thermosensibilité des canaux thermo-TRP ciblés. Lors de cette étude, nous utiliserons des champs RF non modulés d'une fréquence de 900 MHz, comme dans les études de Pelletier *et al*. et Mai *et al*. qui ont été à l'origine des hypothèses sur l'impact des RF sur les canaux TRP (Pelletier *et al*, 2013a, 2014; Mai *et al*, 2020). À cet égard, nous étudierons l'impact des RF selon deux modes expérimentaux différents :

- Soit en maintenant fixe la température des essais sous exposition RF, comme cela avait été réalisé par Ruigrok et al (Ruigrok *et al*, 2018), ce qui permet de révéler un effet potentiellement non thermique de l'exposition RF.
- Soit en opérant un cyclage de la température sous exposition RF afin de déterminer si l'exposition impacte le comportement thermique des canaux ici étudiés.

## 2- Matériel et méthodes

### A- Biologie cellulaire

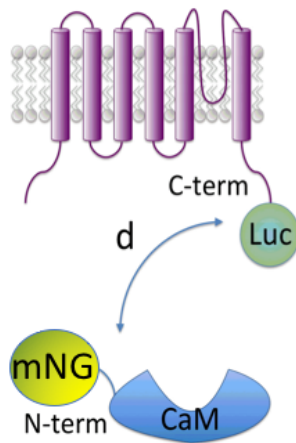
Les cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney, ATCC, Rockville, MD) sont maintenues en culture dans un incubateur à 37°C, avec une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Leur milieu de culture se compose de : DMEM 1X (Ref. D6429 Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) + GlutaMAX™-I (Ref. 35050061, Gibco, Bleiswijk, Netherlands) + 10% SVF inactivé (Ref. S1810, Dominique Dutcher, Issy-les-Moulineaux, France) + 100 unités/ml de Pénicilline et Streptomycine (Ref. 15140122, Gibco). Le renouvellement du milieu de culture se fait toutes les 48 heures. Lorsque les cellules HEK293T atteignent 80% de confluence, elles sont détachées de leur support à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) à 0,5 g.L<sup>-1</sup> (Ref. 25300054, Gibco) et réensemencées à plus faible densité sur des supports adéquats.

### B- Vecteurs d'expression des protéines de fusion d'intérêt

#### a-Sondes intermoléculaires

Les sondes intermoléculaires permettent de mesurer le couplage du canal à une protéine d'interaction qui vient se fixer au canal (ou qui se détache du canal) lors de l'activation du canal. Dans cette configuration, le canal est lié au donneur d'énergie, la nanoluciférase, et la protéine d'interaction est liée à l'accepteur d'énergie, la mNeonGreen. La Calmoduline (CaM), qui est connue pour interagir avec les canaux TRPA1 (Hasan *et al*, 2017), TRPM8 (Sarria *et al*, 2011; Sisco *et al*, 2020), TRPV4 (Masuyama *et al*, 2012; Strotmann *et al*, 2010, 4) et TRPM2 (Sisco *et al*, 2020; Faouzi & Penner, 2014) lors de leur activation, est utilisée comme protéine d'interaction. Dans de précédents articles, mon laboratoire d'accueil a déjà pu montrer que des sondes BRET intermoléculaires entre TRPV1-Luc et YFP-CaM

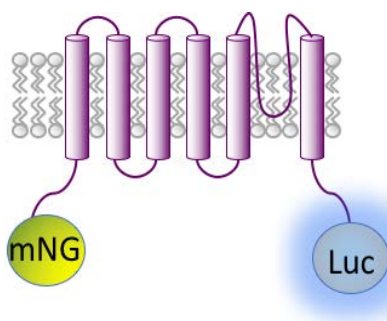
rendaient parfaitement compte de l'activation du canal TRPV1 dans les modes thermiques et chimiques (Ruigrok *et al*, 2018, 2017)(Figure 38).



**Figure 38** - Représentation schématique des sondes BRET intermoléculaires ciblant les canaux TRP. La sonde intermoléculaire TRPV-Luc/mNeonG-CaM où le groupe mNeonG est fusionné à la partie N-terminale de la CaM et le groupe Luc à la partie C-terminale du canal. Il permet de mesurer, suite à l'ouverture du canal et à l'entrée de calcium dans les cellules, le couplage du canal à la calmoduline. Après activation du canal, la distance (d) et/ou l'orientation entre Luc et mNeonG sont modifiées entraînant une variation de l'efficacité du transfert d'énergie.

#### b-Sondes intramoléculaires de première génération

La séquence protéique du canal d'intérêt est ici fusionnée à la nanoluciférase en une extrémité, et la mNeonGreen à son autre extrémité. Cette sonde permet de mesurer les variations de BRET relatives au changement de conformation survenant lors de l'ouverture du canal ciblé, et qui se répercutent sur l'orientation et/ou la distance entre les extrémités N- et C-terminales des monomères du canal. Il s'agit là encore d'une sonde BRET ayant prouvé son efficacité pour l'étude de canaux TRP (Ruigrok *et al*, 2017)(Figure 39.)



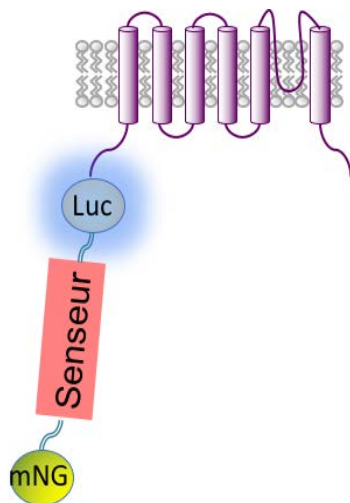
**Figure 39** - Représentation schématique des sondes BRET intramoléculaires ciblant les canaux TRP. La sonde intramoléculaire mNeonG-TRP-NLuc où le groupe mNeonG est fusionné avec l'extrémité N- terminale du canal et le groupe Luc avec l'extrémité C-terminale. Elle permet de mesurer les changements de conformation lors de l'ouverture du canal, qui se répercutent sur l'orientation et/ou la distance entre les extrémités N- et C-terminales des monomères de TRP.

#### c-Sondes intramoléculaires de seconde génération

Dans le cadre de ce travail de doctorat, j'ai pu participer à l'élaboration d'une nouvelle génération de sondes BRET permettant de mesurer la concentration cytoplasmique de différents ions, comme le calcium, dans le nanoenvironnement du pore des canaux ioniques

TRP. Ces sondes reposent sur la fusion d'une sonde BRET sensible aux ions à une extrémité d'un canal thermo-TRP (Figure 40). Lors de l'ouverture du pore du canal, l'ion d'intérêt est capté par le senseur qui subit alors un changement de conformation entraînant le rapprochement de la NLuc et de la mNeonG. L'élaboration de ces sondes et leur caractérisation a donné lieu à deux publications :

- Dans la revue *Biomolecules* où je signe en second auteur pour avoir conçu les sondes en biologie moléculaire, et participé au développement des protocoles de transfections et des protocoles de dose-réponse (Barbeau *et al*, 2022).
- Dans la revue *PNAS*, que je signe en troisième auteur pour ma contribution lors des étapes de biologie moléculaire puis lors de la caractérisation des sondes à l'aide d'agonistes et d'antagonistes (Chappe, 2022).



**Figure 40** - Représentation schématique des sondes BRET intramoléculaires de seconde génération ciblant les canaux TRP. La sonde intramoléculaire mNeonG-senseur-Luc-TRP où le groupe mNeonG est fusionné avec l'extrémité N-terminale du senseur et le groupe Luc avec l'extrémité C-terminale du senseur et N-terminale du canal. Elle permet de mesurer les changements de concentration d'un ion sous le canal lors de l'ouverture du canal, qui se répercutent sur l'orientation et/ou la distance entre les extrémités N- et C-terminales du senseur.

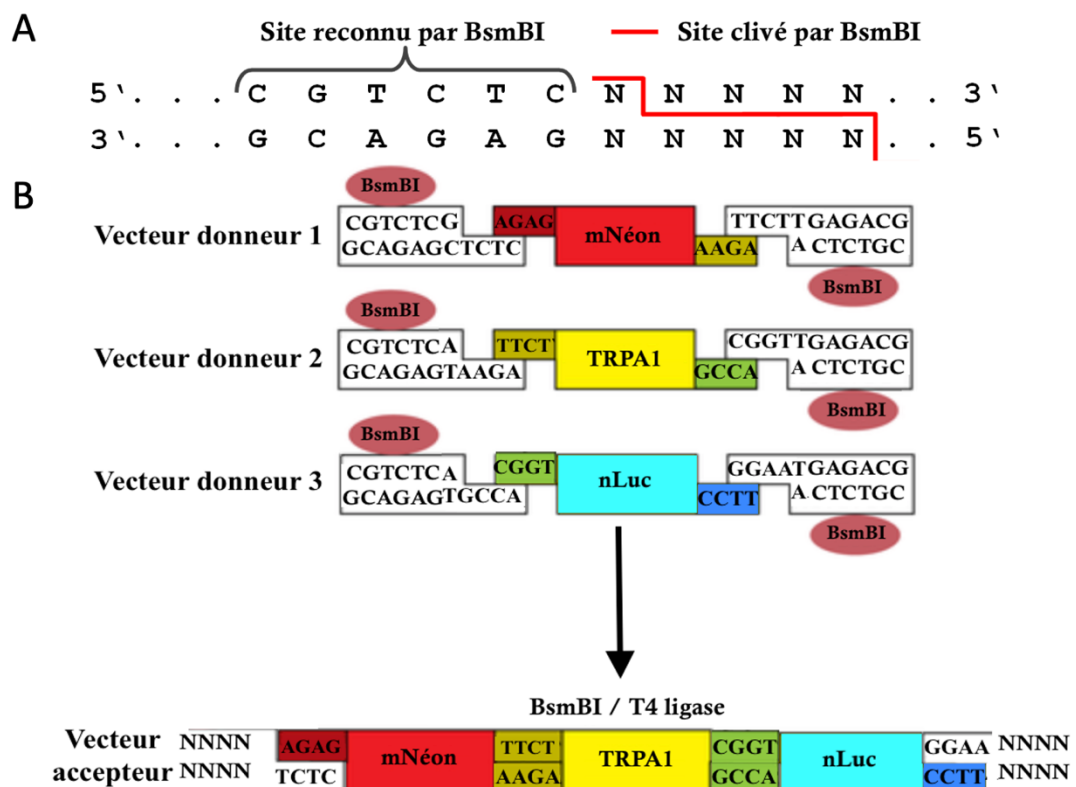
## C- Biologie moléculaire

### a-Clonage par assemblage Golden Gate

Les vecteurs d'expression codants pour les canaux ioniques ont été réalisés via la technique du golden gate, qui permet d'associer de manière ordonnée plusieurs fragments d'ADN dans un vecteur d'accueil (ici pcDNA 3.1 (+)) à partir des vecteurs donneurs au sein d'un seul et même mix réactionnel (Figure 41B; Engler *et al*, 2008). L'assemblage Golden Gate exploite la capacité des endonucléases de restriction de type IIS à cliver l'ADN en n+1 de leur site de reconnaissance (Figure 41A). De fait, comme illustré dans la Figure 41, lorsque les

enzymes de type IIS sont utilisées, le site reconnu par l'enzyme de restriction n'est plus contenu dans la séquence clonée.

Les différents fragments d'ADNc que l'on a cherché à associer ensemble à l'aide du Golden Gate ont tous été synthétisés par la société GenScript. Les séquences d'intérêts sont alors clonées entre deux sites BsmBI bordant les séquences flanquantes (dites d'assemblages) dans le vecteur pUC57 (vecteur donneur). La restriction des différents cDNA d'intérêt à partir de différents vecteurs donneurs et leur ligation ordonnée dans un vecteur pcDNA3.1(+) est ainsi réalisée à l'aide d'un seul mix réactionnel contenant l'enzyme de restriction BsmBI et de la ligase. Pour faciliter le criblage des clones obtenus après transformation des bactéries compétentes, une séquence LacZ flanquée des sites BsmBI a été insérée au sein du multisite de clonage du vecteur pcDNA3.1(+). Ceci a permis de visualiser directement l'efficacité de l'assemblage à l'aide d'un test colorimétrique basé sur l'alpha complémentation. Les différentes constructions obtenues sont répertoriées dans le Tableau 4.



**Figure 41** – Clonage des constructions BRET intramoléculaires ciblant les canaux TRP : exemple du clonage de mNeonG-TRPA1-NLuc. A. Site reconnu par l'enzyme de restriction BsmBI. B. Représentation schématique simplifiée de la stratégie de clonage de l'ADNc de hTRPA1 à l'aide de la technique de goldengate. Image inspirée de (Kirchmaier *et al*, 2013).

Le mix réactionnel (20 µL) comprend 100 ng de vecteur d'accueil, 100 ng des différents vecteurs comportant les séquences d'assemblage, 20 U d'enzyme T4 ADN ligase et 2 µL de T4 ADN ligase buffer 10X, 10 U d'enzymes de restriction BsmBI ; 10 mM d'ATP, et 10 mM de DTT, et subit 30 cycles alternant une incubation à 37°C pendant 1 min, et une incubation à 25°C pendant 1min, avant une étape finale d'inactivation à 55°C durant 5 minutes. Des bactéries E. Coli DH5 α compétentes sont incubées, sur glace, durant 1 heure avec 5 µL du mix de ligation, avec un ratio ADN/Bactéries de 1:10 (v/v). Les bactéries sont alors placées à 42°C dans un bain-marie pendant 20 sec avant d'être replacées sur la glace pendant 2 minutes. Les bactéries transformées sont ensuite placées sur gélose, à 37°C durant 16 à 20 heures après addition de 50 mM de XGal et de 100 mM d'IPTG sur des boîtes contenant du LB-Agar avec 100 µg/ml ampicilline pour sélectionner les bactéries transformées. Les constructions sont alors validées par profil de restrictions puis amplifiées à l'aide d'un kit midiprep, pour enfin être validées lors de transfections transitoires en cellules HEK293T en contrôlant l'activité de la Luciférase et de la mNeonG.

**Tableau 4** – Liste des différentes constructions réalisées durant cette thèse à l'aide de la technique du goldengate :

Type de sonde	Canal
<i>mNeonG-senseur-NLuc-Protéine &amp; Protéine-NLuc-senseur-mNeonG</i>	<i>TRPM8, TRPM2, TRPV4, TRPA1, AQP2, AQP4, CaV3.1, TREK1, BK</i>
<i>NLuc-Protéine &amp; Protéine-NLuc</i>	<i>TRPM8, TRPM2, TRPV4, TRPA1, AQP2, AQP4, BK</i>
<i>mNeonG-Protéine-NLuc &amp; NLuc-Protéine-mNeonG</i>	<i>TRPM8, TRPM2, TRPV4, TRPA1, AQP2, AQP4, BK</i>
<i>mN-Protéine &amp; Protéine-mN</i>	<i>Actine, βArrestin1, Pacsin3, AIP4, OS9, Caveolin1, Serca2, TRPV4, AQP4, AQP2</i>

**Piezo1** a également été cloné dans toutes les conformations énoncées ci-dessus mais en clonage avec des enzymes de restrictions de première génération et des PCR, sans avoir recours au golden gate. La méthode de clonage utilisée est détaillée dans l'article de Ruigrok *et al*, 2017.

#### b-Transfections transitoires

Les cellules HEK293T sontensemencées en flasque T75 la veille de la transfection pour atteindre une confluence de 70-90 % le jour de la transfection. Les transfections transitoires

sont réalisées à l'aide de polyéthylèneimine (PEI linéaire, Mr 25,000; Ref. 23966, Polysciences, Warrington, PA, USA) dans du milieu Opti-MEM (Ref. 31985062, Invitrogen) avec un ratio PEI:ADN de 5:1. La transfection des cellules cultivées au sein d'une flasque T75 utilise 15 µg d'ADN total placé dans 700 µl de milieu Opti-MEM auxquels sont ajoutés 75 µg de PEI. Le mélange est vortexé 5 sec et incubé à 37°C durant 30 min avant d'être ajouté dans le milieu de culture cellulaire. Le lendemain, les cellules sont détachées en utilisant de la trypsine-EDTA 1%, comptées et remises en culture pour 24 heures dans du DMEM sans rouge de phénol (Ref. 21063-029; ThermoFisher Scientific) dans le support adapté à l'expérimentation souhaitée. Ces supports seront soit des plaques 96 puits blanches opaques (Ref. 655083, greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) pour les expériences de dose-réponse (1.10<sup>5</sup> cellules par puits), soit des plaques 24 puits contenant des lamelles de verre de 12 mm de diamètre (Knittel Glass, Braunschweig, Germany) préalablement traités à la L-polylysine (Ref. P4707, Sigma), sur lesquelles sont ensemencées 1.10<sup>6</sup> cellules, pour les expériences en fonction de la température.

#### D- Bioluminescence par transfert d'énergie en résonance (BRET)

Il s'agit de la même technique qu'utilisée dans le second article de ce manuscrit pour l'étude des voies de signalisation du stress. Le principe biophysique de cette technique est expliqué en détail dans l'introduction de ce manuscrit. Le BRET a déjà été utilisé pour l'étude des canaux TRP comme décrit dans de précédents articles de mon équipe (Ruigrok *et al*, 2017, 2018; Chappe *et al*, 2021; Chappe, 2022).

##### a- Doses-réponses de l'effet d'un agoniste sur l'activation des canaux TRP

L'activité des canaux thermo-TRP dans leur mode d'activation chimique a été mesurée à différentes températures. Pour ce faire, les plaques 96 puits contenant les cellules sont préalablement placées sur un appareil Peltier (Eppendorf ThermoStat Plus, Hamburg, Germany) afin d'équilibrer le milieu de culture à la température désirée avant de réaliser la mesure des signaux BRET. La température du milieu de culture est mesurée dans un puits de référence à l'aide d'un thermomètre à fibre optique (Luxtron 812, Lumasense technologie, Santa Clara, CA, USA). Lorsque la température du milieu de culture a atteint la valeur souhaitée, des doses croissantes d'agonistes sont ajoutées au milieu de culture. Lorsque cela est indiqué, les antagonistes HC067047, RN1734, M8B Hydrochloride et AM0902 (Tocris) ont



été ajoutés à une concentration finale de 20 µM préalablement à l'ajout de l'agoniste. Toutes les dilutions de ligands ont été préparées à l'aide d'un tampon salin constitué de 145 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 4mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1mM de MgSO<sub>4</sub>, 10 mM de Glucose, 20 mM d'Hepes (pH 7.4), et 0.2 % de BSA (tampon A). Le substrat coéluentérazine H (Nanolight Technology, Pinetop, AZ, USA) est rajouté à une concentration finale de 5 µM et les signaux de BRET sont mesurés après 5 min d'incubation à l'aide d'un lecteur de plaque multifonction Tristar2 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Le signal bioluminescent de chaque puits est alors intégré durant 1 seconde séquentiellement à l'aide de filtres couvrant les bandes 460±40 nm et 520±35 nm, qui sont les bandes utiles pour mesurer respectivement l'émission de la NLuc et de mNeonG. Le ratio de BRET est alors calculé suivant l'Équation 9:

Équation 9 :

$$BRET = \frac{I_{520}}{I_{460}}$$

Où I représente l'intensité de lumière récoltée à la longueur d'onde indiquée en indice. Le signal de BRET net est ensuite obtenu en soustrayant au BRET mesuré, le BRET imputé à l'émission de lumière de la luciférase seule lorsque la protéine hTRPV4-NLuc est exprimée en absence de mNeonG (Hamdan *et al*, 2006b).

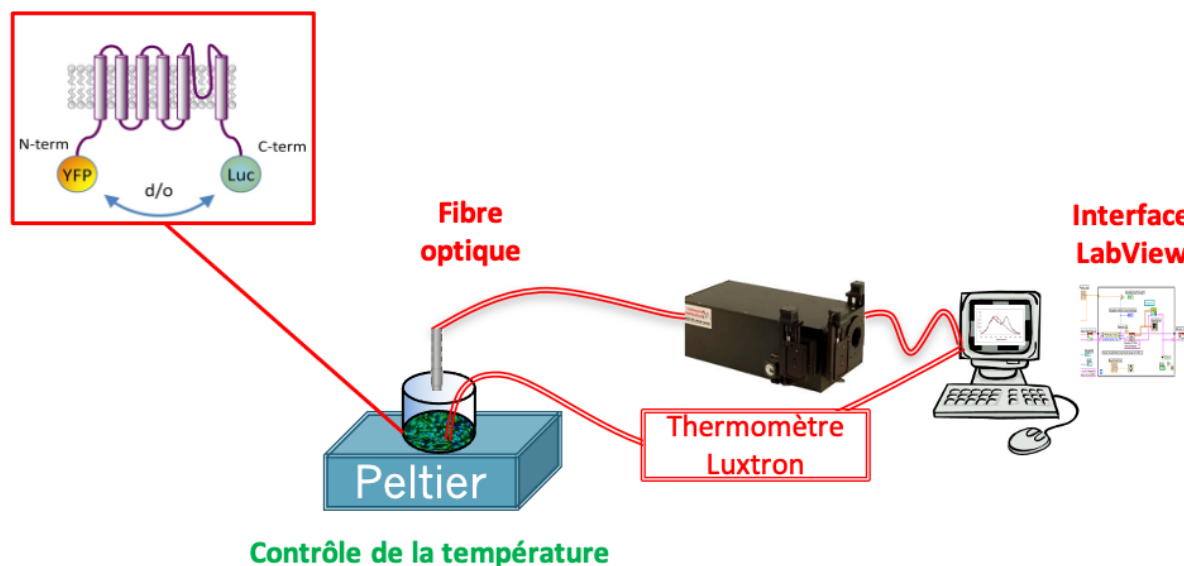
#### b- Effet de la variation de température sur l'activation des canaux TRPV4, TRPM8 et TRPA1

La mesure en temps réel et sur cellule vivante des effets de la température sur l'activation des sondes BRET ciblant TRPV4, TRPA1 et TRPM8 est réalisée de manière déportée à l'aide d'un spectromètre (Iso- Plane SCT320, TELEDYNE, Lisse, France) muni d'une fibre optique, d'un réseau de diffraction et d'une caméra CCD (BLAZE 400, TELEDYNE). Ce système permet une acquisition de l'intégralité du spectre du signal bioluminescent dans le domaine du visible avec une résolution temporelle pouvant aller jusqu'à 30 ms.

La mesure du BRET est réalisée en tampon salin (cf Doses-réponses de l'effet d'un agoniste sur l'activation des canaux ) à partir des cellules transfectées qui ont étéensemencées la veille sur lame de verre, laquelle est placée au fond d'une cupule en téflon neutre électromagnétiquement et dont le fond a été argenté. Un bouchon en téflon, percé en son centre au diamètre de la fibre optique, vient obturer la cupule et permet l'insertion de la fibre optique face à la lamelle de verre. Un autre orifice a été réalisé sur le bouchon directement à côté du premier afin de permettre l'insertion de la fibre optique thermosensible

reliée à l'appareil Luxtron Fluoroptic 812 (Luxtron 812, Lumasense technologie, Santa Clara, CA, USA). La température de l'échantillon a pu être réglée soit à l'aide d'un appareil Peltier placé sous la cupule (Figure 42), soit à l'aide d'un système de thermorégulation fluïdique tel que détaillé dans la partie 1F-Méthodes de thermorégulation expérimentales (

**Figure 43).**



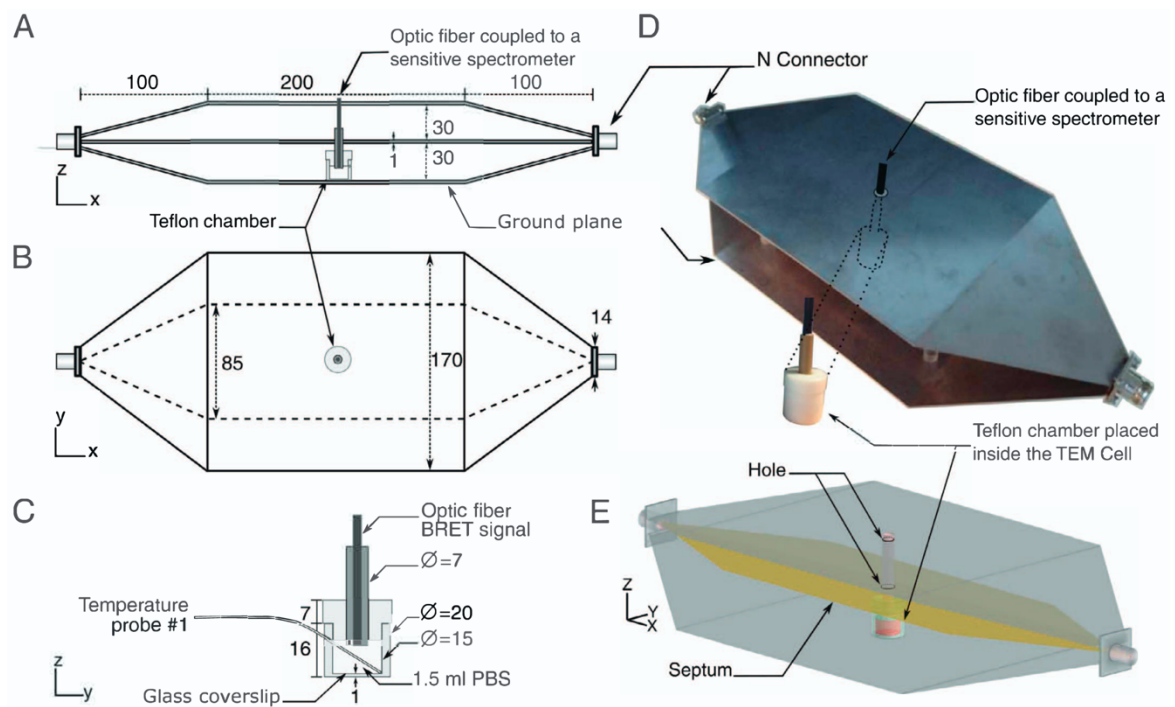
**Figure 42** – Représentation schématique du système de thermorégulation utilisant un système Peltier comme dans Ruigrok et al, 2018. On retrouve de gauche à droite un appareil de thermorégulation Peltier réglé à la température souhaitée par l'expérimentateur. Dessus sont posées les cellules transfectées avec la sonde BRET d'intérêt. Une fibre optique recueille les photons issus de ces cellules au cours de l'expérience. La fibre optique de l'appareil Luxtron permet de mesurer les variations de température en temps réel au cours de l'expérience. La température enregistrée ainsi que le spectre BRET sont transférées à un ordinateur sur une interface Labview.

Après ajout de la cœlenterazine, une interface LabView (National Instrument) réalise la décomposition spectrale des signaux de BRET enregistrés chaque seconde et permet la mesure du ratio de BRET sans l'aide de filtres (Ruigrok *et al*, 2017). La même interface enregistre la température en simultané afin d'automatiser l'analyse des variations du ratio de BRET en fonction de la température et le pilotage du système de thermorégulation fluïdique en boucle fermée et automatisée.

#### E- Système d'exposition aux RF : Cellule TEM adaptée au BRET

Nous utilisons ici un dispositif développé par l'équipe de Philippe Lévêque (XLIM, UMR CNRS 7252, Limoges) qui est constitué d'une cellule transverse électromagnétique (TEM) dimensionnée pour d'une part présenter une impédance caractéristique de 50  $\Omega$  et d'autre

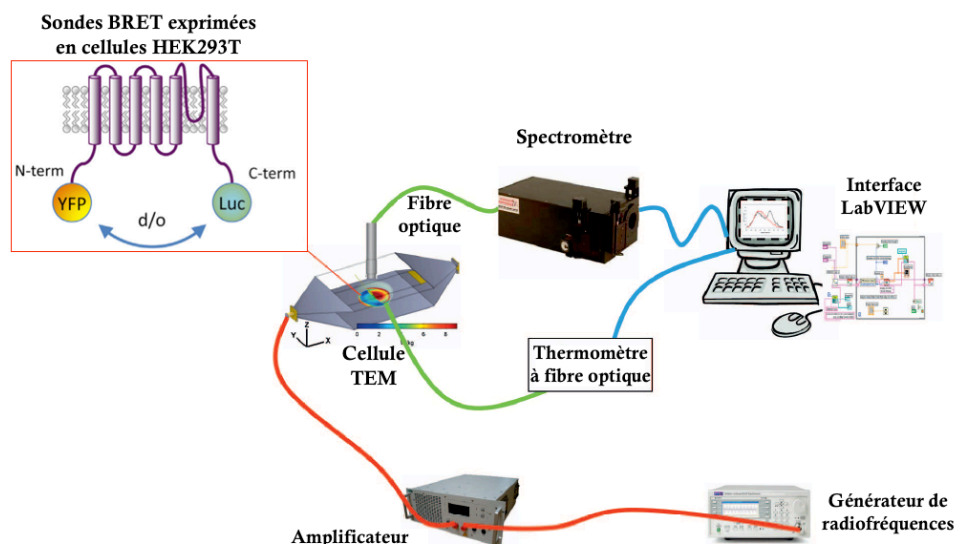
part, s'adapter aux dimensions des boîtes de Pétri, généralement des plaques 96 puits ou des cupules (Ruigrok *et al*, 2018). L'atout principal d'un tel équipement est de fonctionner sur une large bande de fréquences. Ce dispositif a été adapté afin de permettre la lecture du signal de BRET à l'aide d'une fibre optique arrivant par le dessus de la cellule TEM, tout en permettant à un maximum d'énergie d'être absorbée par l'échantillon biologique au centre de la cellule TEM.



**Figure 43** - Figure tirée de (Ruigrok *et al*, 2018) Système d'exposition de cellules TEM et cupule en téflon. A et B : vues de face et de dessus de la cellule TEM avec une fibre optique couplée au spectromètre permettant la mesure déportée de signaux BRET. C : La cupule contenant la sonde de température à l'emplacement numéro no. 1 et la lamelle de verre sur laquelle sont fixées les cellules transfectées avec les sondes BRET placées au fond. D : Vue 3D de la cellule TEM en acier inoxydable avec son septum en cuivre et de la chambre en téflon avec la fibre optique couplée au spectromètre utilisé pour la mesure du BRET. E : Modèle numérique de la chambre en téflon remplie de 1,5 ml de PBS inséré dans la cellule TEM. Deux trous de 10 mm de diamètre ont été percés dans le septum et dans le haut de la cellule TEM pour insérer la fibre optique pour la mesure du signal BRET. (Les dimensions sont en mm.)

Afin de réaliser les mesures de signaux de BRET à partir de cellules exposées aux RF, une chambre en téflon contenant les cellules HEK293T cultivées sur lamelle de verre a été placée dans une cellule TEM qui permet la propagation des RF de manière contrôlée. Les RF ont été délivrés à la cellule TEM en utilisant un générateur de signal vectoriel (SMBV100A, Rohde & Schwarz, Munich, Allemagne) connecté en série avec un amplificateur de 40 W (15100B, RFPA,

Artigues-Près-Bordeaux, France). Le réflecteur supérieur et le septum de la TEM ont été percés de manière à laisser passer la fibre optique, inerte électromagnétiquement, ceci afin de pouvoir récupérer les signaux bioluminescents au sein de la cupule où sont exposées les cellules. La température et l'acquisition se font de la même manière que décrite dans la partie précédente sur la mesure du BRET en fonction de l'échauffement.



**Figure 44** - Dispositif expérimental utilisé pour exposer simultanément les cultures cellulaires aux champs électromagnétiques RF, mesurer la température et acquérir les signaux BRET. (Ruigrok et al, 2018).

## F- Méthodes de thermorégulation expérimentales

### a- Variations de températures en conditions expérimentales

#### *Thermorégulation statique à l'aide d'un appareil Peltier*

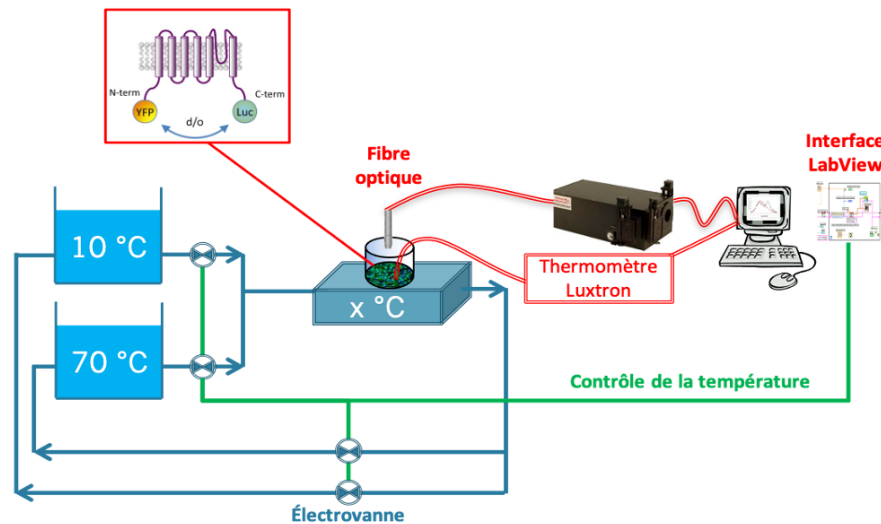
Afin de maintenir les échantillons à une température donnée, un appareil Peltier (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) est placé sous la cupule contenant les cellules. Après ajout de la cœlenterazine, une interface LabView (National Instrument) réalise la décomposition spectrale des signaux de BRET enregistrés chaque seconde et permet la mesure du ratio de BRET sans l'aide de filtres. Ce système a été utilisé pour étudier l'effet des radiofréquences sur les sondes BRET ciblant le canal TRPV1 (Ruigrok *et al*, 2017). La même interface enregistre la température en simultanément afin d'automatiser l'analyse des variations du ratio de BRET en fonction de la température. Ce système rudimentaire a permis de réaliser plusieurs expériences de cyclage de la température présentées dans ce manuscrit, mais ne permet pas de contrôler précisément la vitesse et la constance de la variation de température au cours du

temps, ni de thermoréguler efficacement et précisément la température des échantillons lorsqu'ils sont soumis à une contrainte thermique exogène comme une exposition RF.

### *Thermorégulation dynamique à l'aide d'un système fluïdique*

Afin de pallier ces limitations techniques, nous avons mis au point un nouveau système de thermorégulation fluïdique nous permettant de placer nos cellules dans un milieu dont nous contrôlons la température de manière déportée. Ce dispositif, qui repose sur un échangeur thermique liquide/liquide, et dont j'ai initié la construction, a évolué durant ma thèse. Le cuivre, qui possède la meilleure conductance thermique après l'argent (Pérez & Lagoute, 2001), joue ici le rôle d'interface entre le liquide caloporteur (de l'eau à la température désirée) et le milieu de culture cellulaire. Le liquide caloporteur est porté à la température désirée en effectuant le mélange contrôlé d'eaux chaude (par exemple 70°C) et froide (par exemple 10°C)(Figure 45).

Dans le montage expérimental initial, la température du bac d'eau chaude est maintenue à l'aide d'un thermoplongeur asservi à un thermomètre indépendant, et la température du bac d'eau froide est maintenue à l'aide de pains de glace. Le mélange des liquides caloporteurs froids et chauds se fait à l'aide d'électrovannes proportionnelles dont le pourcentage d'ouverture dépend de la tension envoyée (0 V, vanne fermée et 5 V, vanne ouverte à 100 %). L'ouverture et la fermeture de ces vannes sont contrôlées par ordinateur, via un programme Labview que j'ai commencé à écrire et qui a été perfectionné par un ingénieur en informatique durant ma thèse. La précision attendue pour cette régulation de température étant importante, nous avons eu recours à un correcteur PID (Proportionnel, Intégral, Dérivé). Le PID permet de mesurer la température du milieu en contact avec les cellules, de comparer cette valeur à la température consigne, et d'ouvrir les vannes de manière à ce que la température des échantillons revienne à la température désirée en un temps minimum.



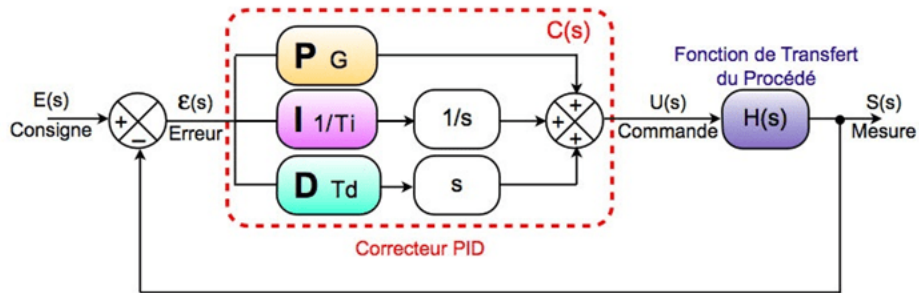
**Figure 45** – Représentation schématique du système de thermorégulation fluide composé de deux bacs de thermorégulation. Le bac d'eau chaude est représenté à  $70^\circ\text{C}$  et celui d'eau froide à  $10^\circ\text{C}$  pour exemple, mais ces températures sont modulables suivants les besoins de l'expérimentation. Ces deux liquides se mélangent dans une boîte fermée sur lequel reposent les cellules (cellules qui sont donc isolées du liquide caloporteur). Le mélange des eaux froides et chaudes en différentes proportions permet d'obtenir la température désirée sous les cellules. Le mélange des liquides caloporteurs froids et chauds est régulé par un logiciel Labview qui contrôle l'ouverture et la fermeture de quatre électrovannes proportionnelles en fonction de la consigne et des variations de température dans le milieu de culture des *cellules* (cf *partie Matériel* développé). Cette variation de température du milieu de culture est enregistrée par une sonde Luxtron qui est introduite dans le milieu cellulaire via un orifice perforé dans le bouchon de la cupule contenant les cellules. L'orifice permettant de faire passer la sonde Luxtron est situé à proximité de l'orifice central permettant le passage de la fibre optique du spectromètre pour la lecture des signaux BRET. Les données acquises à l'aide de la fibre optique du Luxtron et celle du spectromètre sont toutes deux analysées à l'aide d'une interface Labview pour un suivi en temps réel des variations de BRET en fonction de la température.

#### b- Régulateur PID

Un régulateur permet d'effectuer la régulation d'un système automatisé en boucle fermée (Figure 46). Il s'agit de minimiser l'erreur entre le signal de consigne (l'objectif) et le signal réellement mesuré. Son usage est très répandu dans le monde de l'industrie où il permet l'automatisation ainsi que le contrôle d'un grand nombre de tâches. Le modèle classique de régulateur dit PID se compose de 3 opérations :

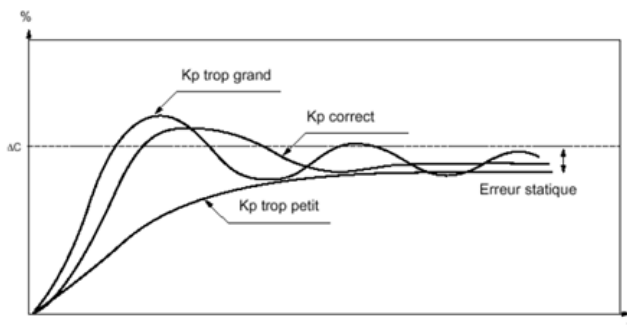
- La proportionnalité, qui multiplie l'erreur par le gain  $G$ .
- L'intégrale, qui est l'intégration de l'erreur sur un intervalle de temps défini (s), le tout multiplié par un gain  $T_i$ .
- La dérivée, qui est la dérivation de l'erreur au cours du temps multiplié par le gain  $T_d$ .

Ces 3 opérations peuvent être implémentées de 3 manières différentes, en série, en parallèle, ou de manière mixte.



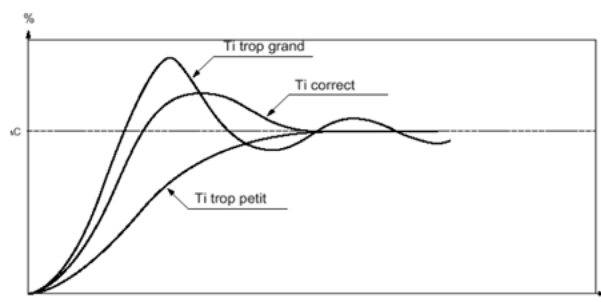
**Figure 46** - représentation schématique d'un PID sous forme de schéma-bloc avec une architecture de type parallèle. Figure issue du site <https://blog.technic-achat.com/quest-ce-que-le-pid/>

Il est important de comprendre le rôle de chacun de ces 3 paramètres pour utiliser au mieux chacun des composants du PID. L'action proportionnelle permet de moduler la vitesse de réponse du système. La réponse sera plus rapide à mesure que le gain  $G$  (appelé  $K_p$  (Figure 47) augmentera. Cependant cette rapidité se fera au prix de la stabilité du système. **Ainsi l'action proportionnelle P joue sur la rapidité du système** (Figure 47).



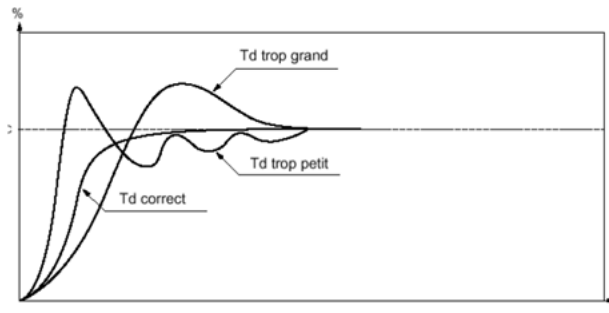
**Figure 47** – Représentation de l'action proportionnelle du PID. Figure issue du site <https://blog.technic-achat.com/quest-ce-que-le-pid/>

Pour pallier réduire l'erreur statique entre consigne et mesure, il convient d'ajouter l'opération d'intégration. Cependant cela ayant pour conséquence directe une augmentation de la vitesse de réponse, le système peut perdre en stabilité. **Ainsi I retire l'erreur statique** (Figure 48).



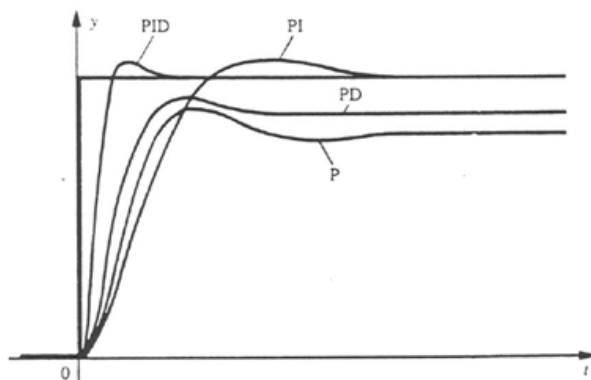
**Figure 48** - Représentation de l'action intégrale du PID. Figure issue du site <https://blog.technic-achat.com/quest-ce-que-le-pid/>

La solution est alors d'anticiper le dépassement de la consigne à l'aide de la dérivée. On augmente l'impact de la dérivation sur le système en augmentant la valeur  $T_d$ . Pour cela, le système va augmenter sa vitesse de réponse à mesure que l'écart grandit et inversement. **Ainsi D augmente la stabilité du système** (Figure 49).



**Figure 49** - Représentation de l'action dérivée du PID. Figure issue du site <https://blog.technicachat.com/quest-ce-que-le-pid/>

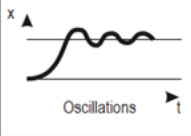
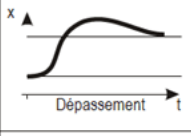
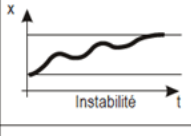
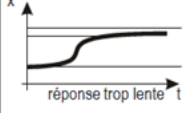
Les différentes variables du PID permettent donc d'obtenir un système rapide (P), précis (I), et stable (D). On peut cependant choisir suivant les capacités du système à contrôler de n'utiliser qu'un ou deux de ces paramètres (Figure 50).



**Figure 50** - Représentation de l'action du PID. Figure issue du site <https://blog.technicachat.com/quest-ce-que-le-pid/>

L'ensemble des variables et leur définition dépendront donc du système. On peut bien-sûr trouver des méthodes pour régler un PID « à la main ». Une méthode consiste à mettre les valeurs I et D à 0 et de faire varier la valeur P jusqu'à avoir une oscillation. Ensuite augmenter la valeur de I jusqu'à ne plus avoir d'oscillation. Des tableaux existent pour aider au réglage manuel de PID (Figure 51).



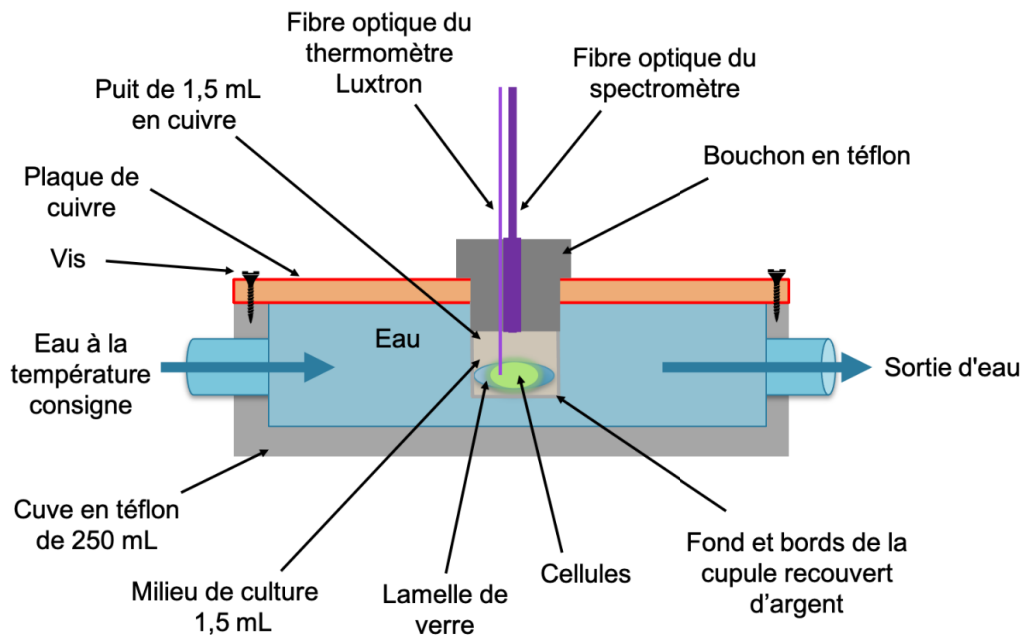
Réponse du système	Réglage à effectuer en fonction du type			
	P	PD	PI	PID
 Oscillations	Pb ↑	Pb ↑ td ↓	Pb ↑	Pb ↑ ti ↑ td ↓
 Dépassement	Pb ↑	Pb ↑ td ↑	Pb ↑ ti ↑	Pb ↑ ti ↑ td ↑
 Instabilité		Pb ↓ td ↓		Pb ↓ td ↓
 réponse trop lente	Pb ↓	Pb ↓	ti ↓	Pb ↓ ti ↓

**Figure 51** - Représentation des méthodes de réglage des paramètres PID. Figure issue du site <https://blog.technic-achat.com/quest-ce-que-le-pid/>

c- Matériel développé

Nous avons créé plusieurs échangeurs liquide/liquide qui ont évolué durant ma thèse en fonction de nos besoins expérimentaux. Le premier modèle a consisté en une cuve de téflon, d'un volume de 250 mL, sur laquelle est vissé de manière hermétique un couvercle de

cuivre possédant en son centre une cupule également en cuivre. Cette cupule, dont les parois ont été argentées pour réfléchir les photons, forme un puits dans lequel sont disposées les cellules transfectées avec les sondes BRET et adsorbées sur lames de verre (Figure 52).

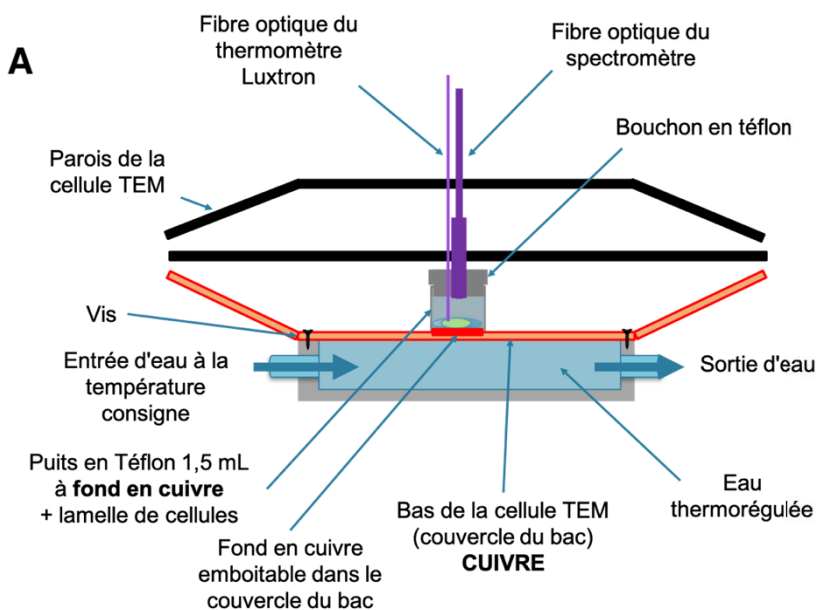


**Figure 52** – Coupe transversale du bassin de thermorégulation et de la cupule contenant une lame sur laquelle repose des cellules dans 1,5 mL de tampon.

Ce système permet la thermorégulation rapide, stable et hautement reproductible d'échantillons biologiques. Les cellules étant isolées du flux d'eau caloporteur, les cellules ne subissent aucun stress physique par cisaillement. De plus le puits est ouvert sur le dessus

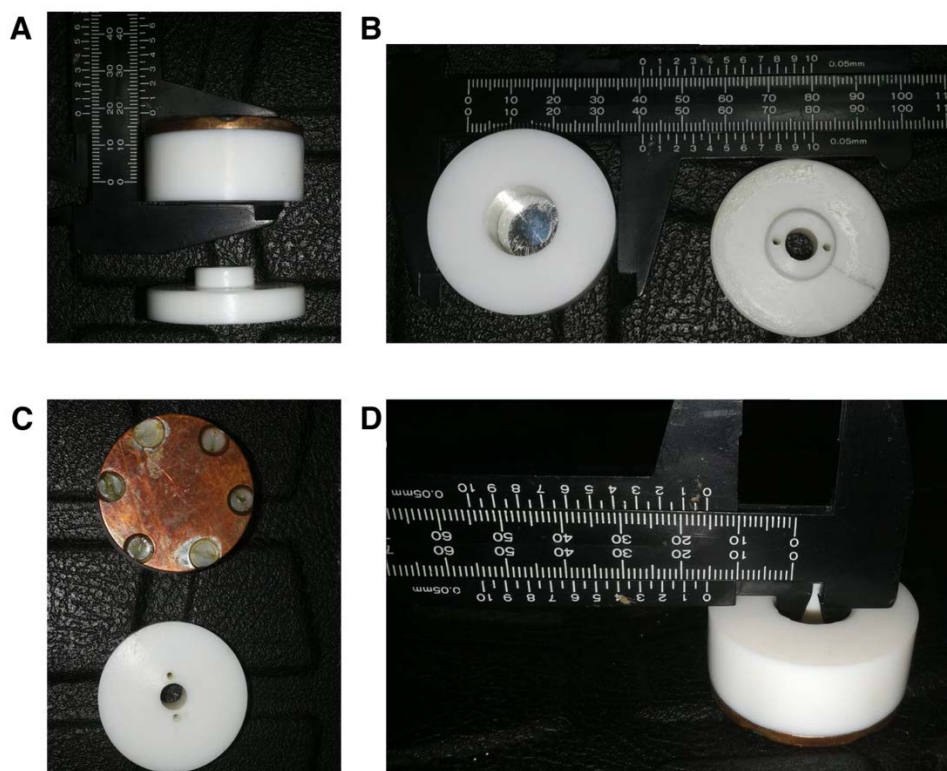
permettant d'y emboîter un couvercle adapté à notre fibre optique, créant une chambre noire pour l'acquisition temps réel du BRET.

Ce premier échangeur thermique était parfaitement adapté à l'étude en BRET de l'impact des variations de température sur les canaux thermo-TRP, mais ne permettait cependant pas d'étudier l'impact des RF sur l'activité de ces canaux. Nous avons donc mis au point un deuxième échangeur thermique sur la base d'une cellule TEM dont le réflecteur inférieur a été remplacé par une plaque en cuivre (Figure 53). Cette plaque est munie d'une invagination dans laquelle s'emboîte parfaitement la plaque d'une cuve de 2 mL, faites à façon en téflon et dont le fond est en cuivre (Figure 54).



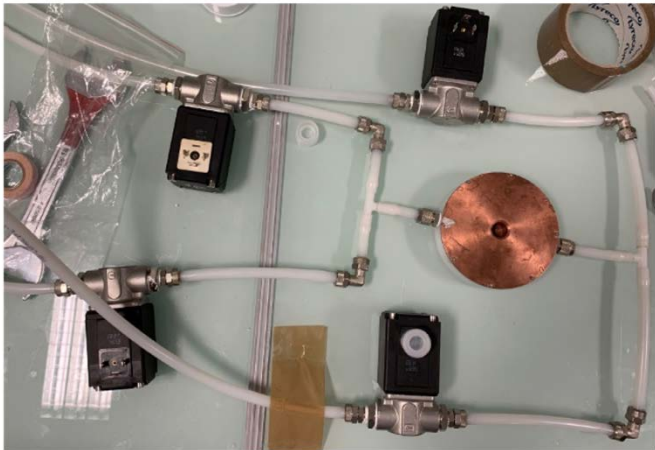
**Figure 53** – Schéma (A) et photo (B) du système de thermorégulation couplé à la cellule TEM. A : Coupe transversale de la cellule TEM, du bassin de thermorégulation et de la cupule contenant une lame sur laquelle repose des cellules dans 1,5 mL de tampon. B : Photo latérale du système avec le bassin de thermorégulation en téflon joint à la cellule TEM par une plaque de cuivre contenant 3 encoches dans lesquelles peuvent s'emboîter les cupules contenant les cellules à thermoréguler.





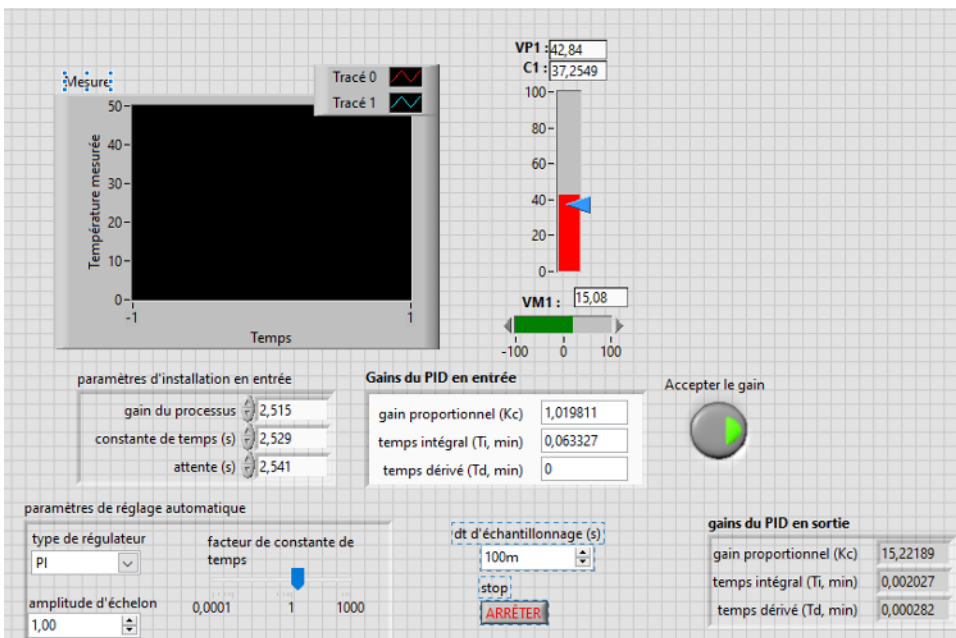
**Figure 54** – Photos de la cupule servant à contenir une lame sur laquelle repose des cellules dans 1,5 mL de tampon. Cette cupule est constituée d’une plaque de cuivre recouverte d’un miroir d’argent en son centre, d’un rebord, de vis et d’un couvercle en téflon. Le couvercle (visible sur les photos A, B et C) est perforé en trois points. Le plus gros orifice permet d’introduire la fibre optique du spectromètre pour recueillir le signal de BRET. Les deux autres orifices permettent le passage de la sonde du thermomètre Luxtron pour accéder en direct à la température au niveau des cellules. Ces orifices permettent également l’introduction d’une seringue pour l’ajout d’un produit chimique au cours d’une expérimentation. A, vue latérale de la cupule en haut et du couvercle en bas. B, vue du dessus de la cupule (gauche) et du dessous du couvercle (droite). C, vue de dessous de la cupule en haut et du couvercle en bas. D, mesure du diamètre du puits qui contient les cellules et le milieu de culture.

L’insertion d’une sonde de température Luxtron à côté de la fibre optique permettant l’acquisition des photons, permet d’enregistrer les fluctuations de la température avec une fréquence de 250 ms. Cette information est transmise au PID qui gère alors l’ouverture des vannes chaudes et froides (ref. burkert 2875) pour thermoréguler les échantillons au plus près de la température de consigne. La photo du système de thermorégulation à 4 électrovannes proportionnelles autour d’un bassin de thermorégulation sans cellule TEM est disponible Figure 55.



**Figure 55** – Photo des électrovannes proportionnelles utilisées dans le système de thermorégulation pour mélanger les eaux chaudes et froides dans le bassin de thermorégulation. 4 électrovannes permettant la thermorégulation du bassin thermostaté à travers les tuyaux en plastique sont reliés par des tés. Les électrovannes sont représentées de part et d'autre d'un bassin de thermorégulation sans cellule TEM. Pilotage des vannes via LabVIEW.

Il s'agit d'un mode de programmation graphique permettant de développer des systèmes automatisés de mesure, de calcul ou de contrôle. Il repose sur un concept de langage graphique appelé « G » et est développé par National Instruments. Le fonctionnement de Labview est assez simple ; le fichier sur lequel nous voulons travailler, nommé « Vi » est composé de deux interfaces. La première, la face-avant, concerne tous les éléments visibles et modifiables par l'utilisateur une fois l'acquisition lancée. Comme on peut le voir avec la Figure 56, elle comporte tous types d'indicateurs (graphiques, jauges, etc...) mais également des commandes. Sur notre exemple, il est ainsi possible de paramétrer en temps réel le gain d'un correcteur PID, mais aussi d'observer la mesure réalisée par un capteur.



**Figure 56** - Exemple de face-avant Labview

La deuxième interface se nomme le diagramme, et concerne l'aspect informatique du fichier. Elle se compose de plusieurs blocs disponibles selon les bibliothèques téléchargées (Figure

57). On remarque alors que l'interface de codage est très visuelle comparée à d'autres logiciels nécessitant plusieurs lignes de code comme Python, Java, C++, ... Le langage G utilisé par Labview permet au code source de fonctionner par schéma graphique. Il est donc plus simple à prendre en main pour un néophyte en programmation.

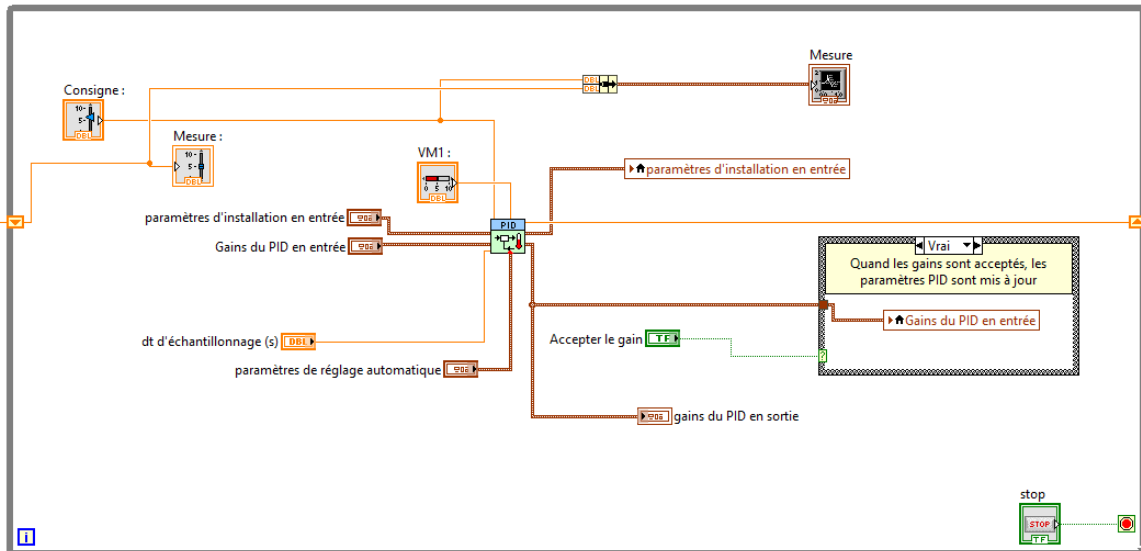


Figure 57 - Exemple de diagramme Labview

Bien que le système évolue au cours des expérimentations pour gagner en efficacité (retrait des coudes dans la tubulure, système de thermorégulation des réservoirs, changement d'électrovannes), le concept et le programme Labview restent les mêmes (Figure 58).

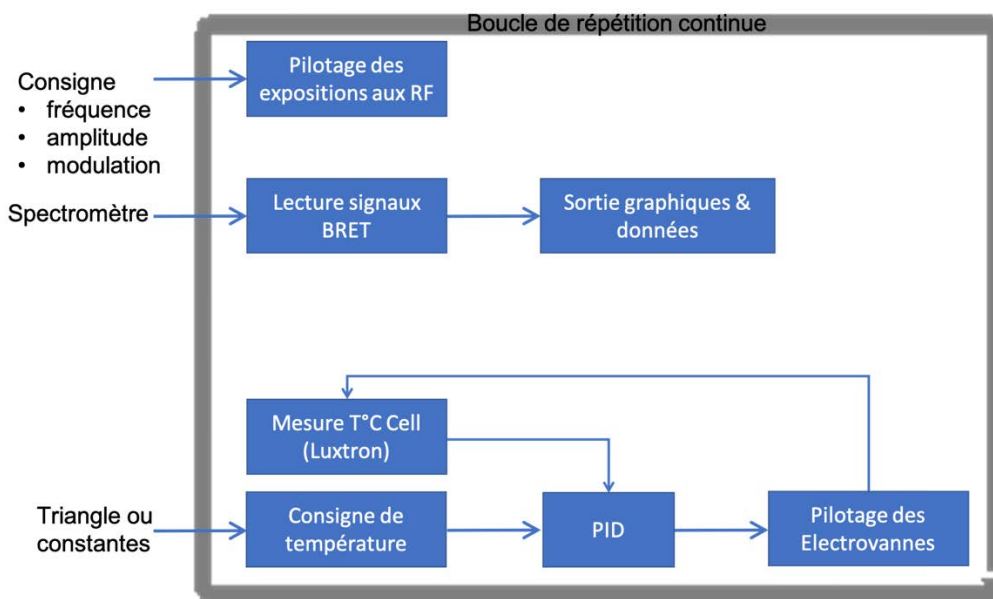


Figure 58 – Schéma représentant le principe du système développé. Trois paramètres sont modulés : La consigne des RF (exposition souhaitée), la consigne de température (température ou variation de température souhaitée), et le temps d'acquisition du spectromètre. La flèche grise signifie que ces 3

paramètres sont contrôlés à chaque itération du programme. Ainsi à chaque instant il est possible de modifier les paramètres de thermorégulation, d'exposition, ou de connaître le signal BRET recueilli par la fibre optique.

### G- Analyses statistiques

Les données pharmacologiques obtenues en dose-réponse sont analysées à l'aide du logiciel Prism 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA), en utilisant l'équation (Équation 10):

Équation 10 :

$$Y = \mathbf{Bottom} + \frac{(\mathbf{Top} - \mathbf{Bottom})}{1 + 10^{\mathbf{LogEC50} - X}}$$

Où X est le logarithme de la concentration d'agoniste et Y la réponse liée (signaux de BRET). *Bottom* est la valeur de Y au plateau inférieur obtenu à faible dose d'agoniste et *Top* est la valeur de Y au plateau supérieur, obtenu à forte dose d'agoniste. LogEC50 est la valeur de X pour laquelle la réponse est égale à 50 % de la différence entre les 2 plateaux.

Toutes les valeurs présentées sont des moyennes. Pour effectuer des comparaisons entre plus de 2 moyennes, le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé. Si ce test est positif, alors un test Mann-Whitney est utilisé pour comparer, deux à deux, chaque moyenne à la moyenne du contrôle. Une probabilité de  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative. Pour chaque point, la SEM (Écart standard à la moyenne) est calculée par le logiciel GraphPad Prism.

### 3- Résultats

Afin d'étudier l'impact des champs RF sur les canaux thermo-TRP à l'aide de sondes BRET, il a fallu dans un premier temps :

- 1) Réaliser et caractériser un système d'exposition aux champs RF qui soit compatible avec un système de thermorégulation efficace, tout en permettant l'acquisition déportée de signaux BRET. En concertation avec l'équipe de Philippe Lévêque, nous avons décidé d'utiliser une cellule TEM. La première étape a donc été d'effectuer la dosimétrie de ce nouveau système d'exposition à 900 MHz dans nos cupules de mesure des signaux BRET. La dosimétrie numérique a été réalisée par l'équipe de Philippe Lévêque de l'XLIM à Limoges. J'ai pour ma part effectué la dosimétrie expérimentale rapportée ici.

- 2) Concevoir un système de thermorégulation adaptable à la TEM, puis caractériser son comportement afin de paramétrer le PID qui le pilote. Cela a été effectué avec l'aide de :
  - Rachid Malti, professeur en automatique
  - Jason Feuillet, stagiaire en IUT
  - Théo Rutil, stagiaire en IUT
  - Sylvain Chabaud, Ingénieur
- 3) Caractériser la réponse des sondes BRET nouvellement créées, ciblant les canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4, dans les modes d'activation thermique et chimique.

Ce n'est qu'une fois ces trois étapes achevées que nous avons pu initier la mesure de la réponse des canaux thermo-TRP sous exposition RF. Enfin les canaux thermo-TRP étudiés étant polymodaux, et une synergie entre différents modes d'activation étant connue, nous avons également cherché à caractériser la réponse de nos sondes BRET à des agonistes et antagonistes à différentes températures.

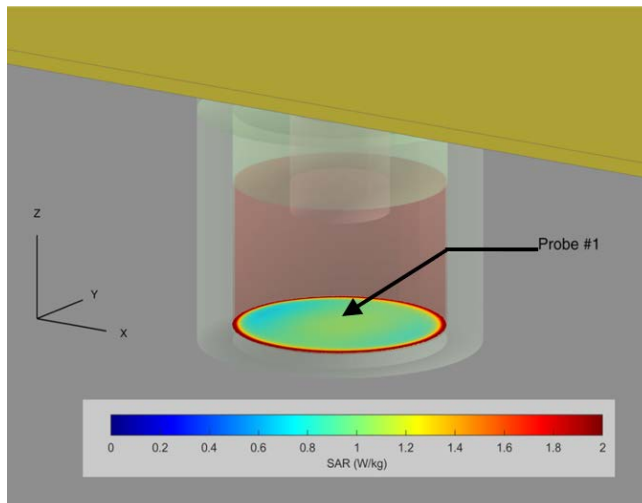
#### A- Dosimétrie radiofréquence

##### a- Dosimétrie numérique

La dosimétrie numérique a été réalisée par l'équipe de Philippe Lévêque (laboratoire XLIM) à l'aide d'un code personnalisé basé sur la résolution des équations différentielles de Maxwell dans le domaine temporel à l'aide de la méthode FDTD (Finite Difference Time Domain ; Leveque *et al*, 1992; Taflove & Hagness, 1995). La simulation a montré que les valeurs de DAS les plus élevées étaient localisées au fond de la chambre, c'est-à-dire au niveau des cellules biologiques exposées. La valeur du DAS théorique au niveau de la sonde thermométrique est de  $0.97 \pm 0.08$  W/kg/W incident et la valeur du DAS théorique moyenne pour l'ensemble du volume d'un puits est de  $1.01 \pm 0.26$  W/kg/W à 900 MHz (signal CW). La valeur de DAS normalisée dans le plan des cellules est de  $0.93 \pm 0.08$  W/kg/W incident (moyenne  $\pm$  SD), et constitue la valeur de référence pour le calcul ultérieur de la puissance à appliquer expérimentalement pour obtenir un DAS de 2 W/kg ou de 20 W/kg. Les trous réalisés dans la plaque supérieure et le septum de la cellule TEM pour laisser passer la fibre optique mesurant les signaux bioluminescents induisent une variation du niveau de DAS



inférieure à 5 % et ils ont été pris en compte lors des simulations numériques (Ruigrok *et al*, 2018).



**Figure 59** - Distribution du DAS fournie par des simulations FDTD dans le plan des cellules pour une exposition à une onde électromagnétique sinusoïdale non modulée (signal continu, CW) de fréquence 900 MHz, et avec une puissance incidente de 30 W. La position de la sonde de température dans la chambre est indiquée par une flèche (Probe #1). Les RF se propagent dans la cellule TEM le long de l'axe x.

#### b- Dosimétrie expérimentale

La dosimétrie expérimentale vient compléter et confirmer la dosimétrie numérique. Préalablement, la mesure de puissance délivrée par l'amplificateur de signal en fonction de la commande affichée sur le générateur de signal a été mesurée à l'aide d'un puissance-mètre par Gilles Ruffié de la cellule de transfert A2M (atelier micro-ondes sur la matière) du laboratoire IMS. La mesure du DAS délivré aux échantillons en fonction du réglage de la puissance du générateur de signal a ensuite été réalisée à l'aide d'une méthode thermométrique sans perturbation. Des acquisitions de température ont été effectuées préalablement aux mesures de BRET à l'aide de la sonde thermométrique Luxtron 812 et dans des conditions expérimentales identiques, i.e. en présence de 1.5 ml de tampon A disposé dans la cupule en Téflon. La mesure de température dans l'échantillon est mesurée pendant 300 s en absence de RF et pendant 300 s après l'installation des RF (30 W incidents, Figure 60, Tableau 5). Pour calculer le DAS, la pente de la variation de température initiale après installation des champs RF a été calculée. Cette pente représente le terme  $\Delta T / \Delta t$  à  $t = t_0$ , comme indiqué dans l'équation (Équation 11) :

Équation 11: 
$$DAS = 4186 c \frac{\Delta T}{\Delta t} \int t_0$$

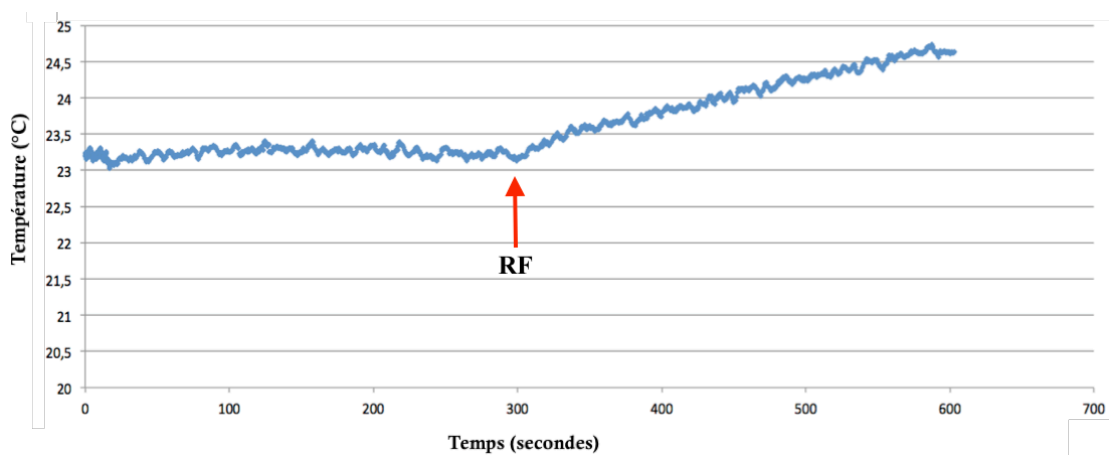


Où le terme  $c$ , égal à 0.95, est le facteur d'échelle de la chaleur spécifique, 4186 est la chaleur spécifique de l'eau exprimée en  $J/(kg.K^{-1})$ ,  $\Delta T$  est le changement de température (en K) en fonction du temps  $\Delta t$  (en s).

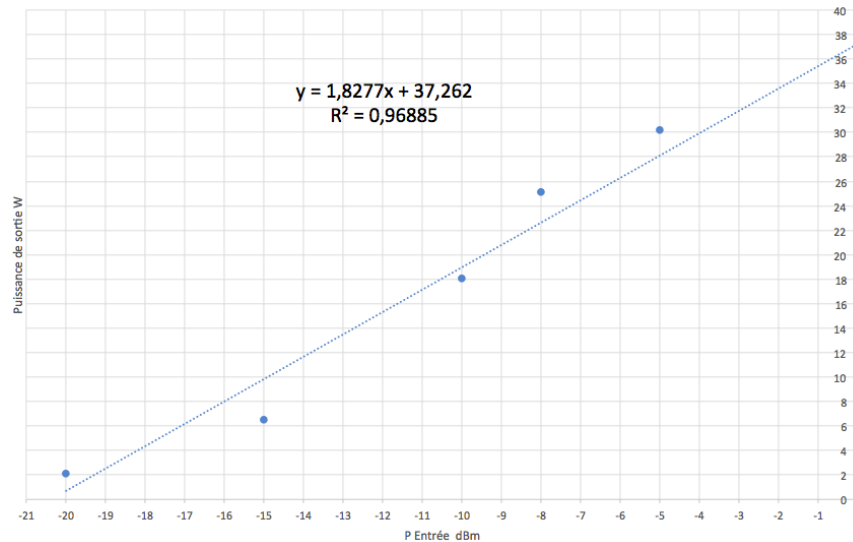
Les mesures réalisées indiquent une valeur expérimentale de DAS de  $0.97 \pm 0.03$  W/kg/W incident ( $n=5$ ), ce qui confirme les valeurs obtenues suite à la simulation numérique. Les réglages de la puissance du générateur de signal pour obtenir une exposition des échantillons biologiques à un DAS de 2 W/kg et de 20 W/kg, en utilisant une onde porteuse 900 MHz non modulée (signal continu, CW), ont alors été dérivés des mesures de puissance fournies à l'entrée de la TEM en fonction de la puissance du signal délivré par le générateur de signal, et en prenant en compte la valeur de 0.93 W/kg/W incident (SAR théorique dans le plan des cellules), selon la formule (Équation 12) :

$$\text{Équation 12 :} \quad P_{\text{entrée}} = \frac{P_{\text{sortie}}}{DAS_{\text{cellule}} * 1.8277} - 37.262$$

Où  $P_{\text{entrée}}$  représente la valeur recherchée de la puissance à régler sur le générateur de signaux pour un signal CW 900 MHz,  $P_{\text{sortie}}$  est la valeur du DAS choisie pour exposer les cellules,  $DAS_{\text{cellule}}$  est égal à 0.93 W/kg/W incident, et 1.8277 est la pente de la courbe mesurant la puissance de sortie de l'amplificateur 900 MHz en fonction de la puissance en entrée imposée par le générateur de signal.



**Figure 60** - Représentation graphique de la mesure de températures dans la cupule de mesure des signaux BRET (contenant 1.5 ml de PBS) placée dans le système d'exposition de la Figure 59, avant et pendant l'exposition aux RF. La température est enregistrée en continu durant 300 secondes en absence de RF, puis pendant 300 secondes en présence de RF (900MHz, signal CW, 30 W incident).



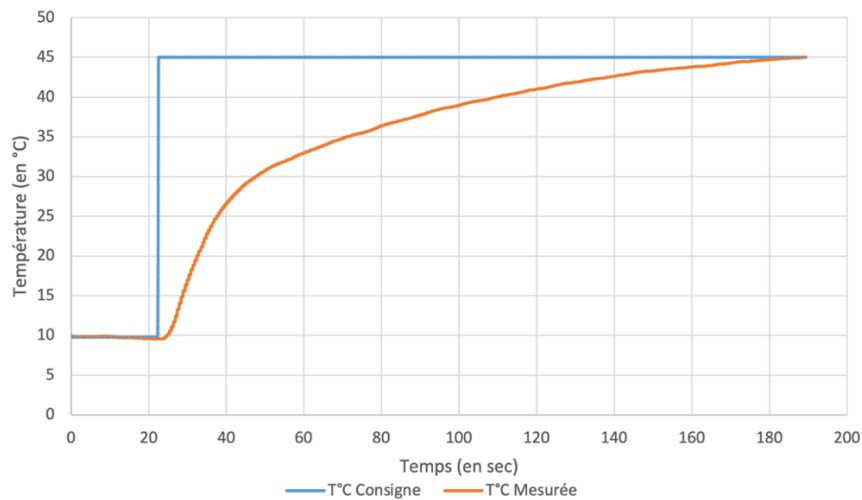
**Figure 61** - Graphique représentant la puissance de sortie de l'amplificateur en Watt en fonction de la puissance d'entrée délivrée par le générateur de CEM RF (en dBm). 1 W = 30 dBm ; PdBm =  $10 \cdot \log_{10}$  (PmW/1mW).

**Tableau 5** - Valeurs de DAS (W/Kg) normalisées pour 1 W incident (signal CW, 900MHz), obtenues à partir des simulations numériques et des mesures expérimentales de variation de température.

		<i>DAS (W/kg) pour une puissance de 1 W incident</i>			
	<i>Volume</i>	<i>Local/Couche</i>	<i>Sonde, simulation</i>	<i>Sonde, mesure</i>	
<i>900 MHz</i>	<i>Cupule</i>	<b><math>1.01 \pm 0.26</math></b>	<b><math>0.93 \pm 0.08</math></b>	<b><math>0.97 \pm 0.02</math></b>	<b><math>0.93 \pm 0.03</math></b>

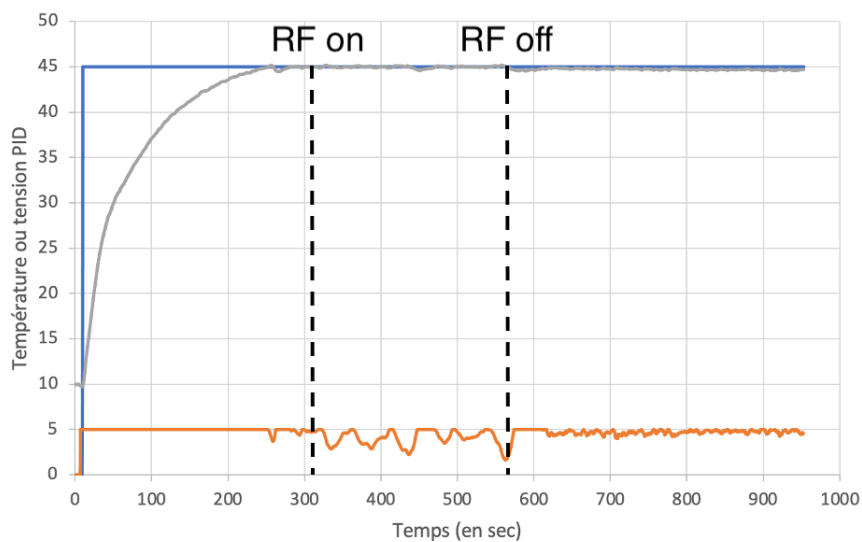
## B- Paramétrage du PID

Afin de recueillir les données expérimentales nécessaires à la programmation du PID, nous avons procédé à la réalisation d'un « échelon » où nous avons basculé la consigne de 10°C à 45°C. Cette expérience a pour but de permettre de calculer la constante de temps de variation de température de notre système, ainsi que le retard de la thermorégulation. L'analyse de la variation de température suite à l'application d'un échelon sur la consigne de température obtenues en Figure 62 a permis à nos collègues automaticiens de calculer les différentes constantes du régulateur PID, à savoir un retard moyen de 2,4 secondes, un gain de Kc moyen de  $7.02 \pm 0.06$  et une constante de temps Tau de  $9.25 \pm 0.61$  secondes (Figure 62).



**Figure 62** - Mesure de la température au cours du temps lors d'un passage de la température consigne de 10°C à 45°C.

Ayant réglé le PID dans notre interface LabView à l'aide de des constantes calculées, nous avons procédé à un essai de thermorégulation en condition réelle qui a consisté, à thermoréguler un tampon salin placé dans la cupule de mesure des signaux BRET, elle-même placée dans la TEM. Le tampon salin a été refroidi à une température de 10°C puis un échelon de température a été appliqué, environ 10 s après le début de l'expérience, avec une consigne à 45°C sans dépassement (Figure 63).



**Figure 63** – Graphique représentant la température (courbes grise et bleue) ou la tension envoyée par le PID (courbe orange). On constate que la consigne en bleu est rapidement atteinte par la température mesurée en gris. La température mesurée ne dépasse pas la consigne en condition normale. Il en va de même entre 310 et 560 secondes sous exposition RF (900 MHz, 30 W/kg) qui entraîne des pertes diélectriques. Le PID commande une baisse de la tension lorsqu'une perturbation thermique est enregistrée dans le tampon salin, ce qui entraîne une baisse de la proportion d'eau chaude dans le circuit, et permet de maintenir l'échantillon à température constante.

Durant l'expérience, On relève la température de consigne, la température mesurée, et la tension de sortie du PID (Figure 63). On remarque alors que, suite à l'application de l'échelon, la température mesurée augmente rapidement jusqu'à atteindre la température demandée. Durant la phase d'échauffement de l'échantillon, la tension du PID est alors de 5 V, ce qui correspond à une ouverture à 100% des vannes régulant l'arrivée d'eau chaude. Une fois la température de consigne atteinte, comme espéré, le PID varie peu. À partir de 260 secondes, on applique une contrainte exogène en exposant le milieu de culture à un signal RF continu à une fréquence de 900 MHz, et avec un DAS de 30 W/kg, qui entraîne mécaniquement des pertes diélectriques. On observe alors un travail important du PID qui module l'ouverture des quatre vannes afin de maintenir la température de consigne dans l'échantillon. Après l'arrêt des RF, les variations du PID sont plus atténuées, comme attendu.

Les résultats ci-dessus sont satisfaisants et suffisants pour les manipulations de courtes durées, inférieures à 15 min. Cependant, avec ce premier dispositif, et par soucis d'économie, l'eau en sortie du système de thermorégulation est réinjectée dans les bacs d'eau chaude et froide (Figure 45). Ceci entraîne une fluctuation de la température dans ces bacs car les systèmes de chauffage et de refroidissement n'étaient pas suffisamment efficaces. Bien que nous ayons pu obtenir plusieurs résultats préliminaires avec ce premier dispositif de thermorégulation (voir ci-dessous), des améliorations du système sont en cours d'implémentation et seront discutées dans la partie « Conclusions et perspectives » de ce chapitre.

#### C- Mesure de la variation de signal de BRET en fonction de la température sans exposition RF avec le système de thermorégulation Peltier

Pour finaliser notre banc expérimental permettant de mesurer l'impact des champs RF sur la thermosensibilité des canaux thermo-TRP, nous avons enfin cherché à déterminer si nous pouvions mesurer la thermosensibilité des canaux thermo-TRP TRPV4, TRPM8 et TRPA1 à l'aide de sondes BRET intra- ou intermoléculaires. En particulier, nous avons cherché à caractériser la réponse de ces différents canaux à un cycle complet d'échauffement/refroidissement (pour TRPV4) ou de refroidissement/réchauffement (pour TRPM8/TRPA1). Ces expériences ayant eu lieu au début de ma thèse, elles ont été réalisées en faisant varier la température des échantillons à l'aide d'un appareil Peltier comme cela avait été réalisé précédemment dans l'étude de Ruigrok et al. (2018)(Ruigrok *et al*, 2018).

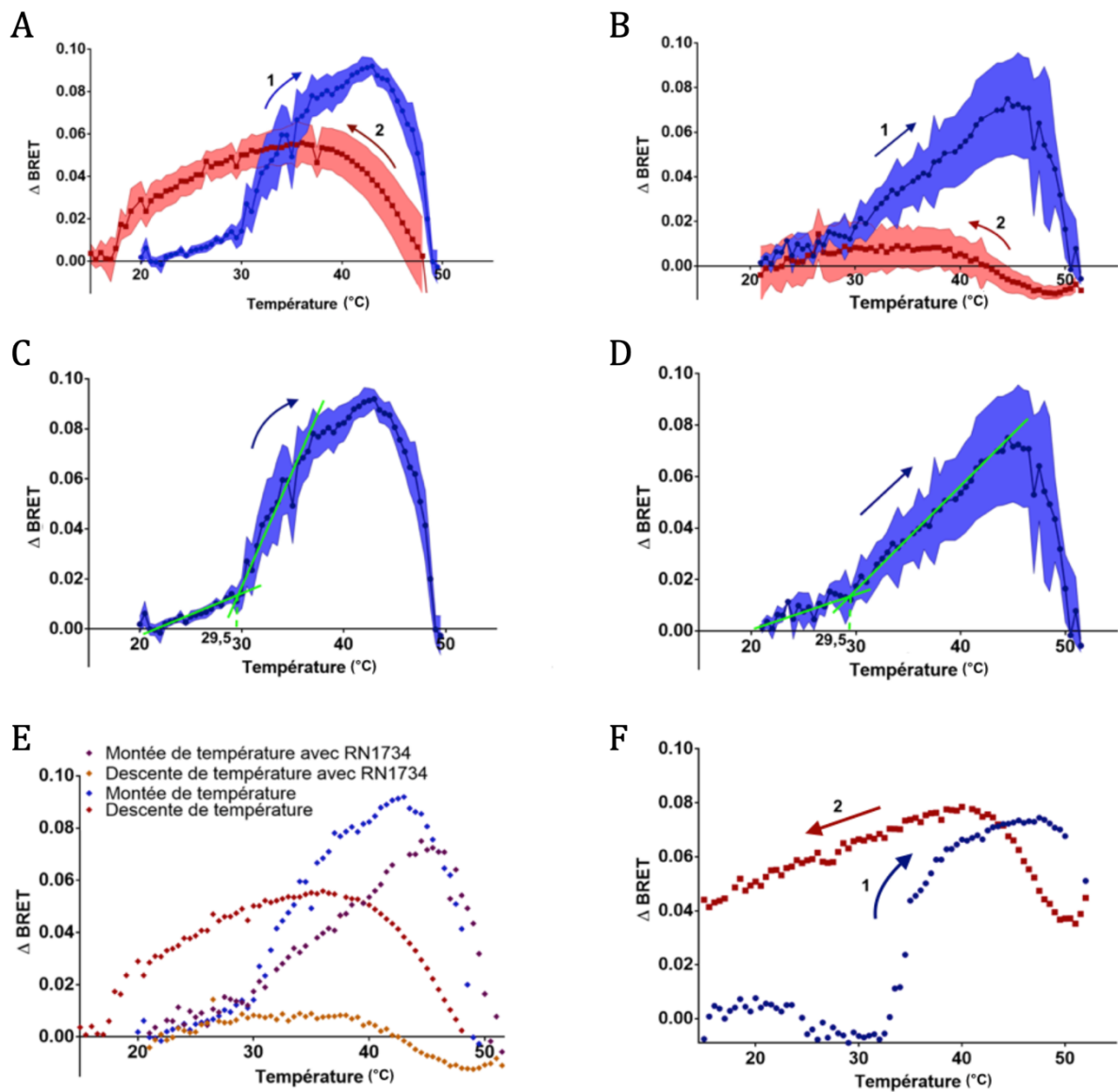
L'expression transitoire des trois sondes BRET intramoléculaires mNeonG-TRPV4-NLuc, mNeonG-TRPM8-NLuc et mNeonG-TRPA1-NLuc dans les HEK293T donnent des ratios de BRET de base cohérents avec ceux mesurés précédemment par l'équipe pour la sonde BRET intramoléculaire ciblant TRPV1 (Ruigrok *et al*, 2017)(respectivement  $0,295 \pm 0,008$  ;  $0,397 \pm 0,009$  ;  $0,556 \pm 0,012$  pour les sondes ciblant TRPV4, TRPM8 et TRPA1). Ceci indique que dans la structure quaternaire des canaux formés par ces protéines de fusion, les groupes donneurs et accepteurs se trouvent dans des conditions de distance et d'orientation favorables pour un transfert d'énergie non-radiatif par résonance.

Nous avons pu mesurer que pour les trois sondes intramoléculaires ciblant les canaux TRPV4, TRPM8 et TRPA1, la variation de température se répercutait de manière différente sur le ratio de BRET lors de la première phase du cycle de variation de la température. En effet, alors que l'échauffement entraîne une augmentation du signal de la sonde ciblant TRV4 (Figure 64), le refroidissement entraîne respectivement une diminution et une augmentation des signaux de BRET issus des sondes TRPA1 (Figure 66) et TRPM8 (Figure 67). Par ailleurs, l'analyse de nos résultats montre qu'il existe un seuil de température à partir duquel la variation de signal est beaucoup plus marquée : 29,5°C lors de l'échauffement des cellules exprimant la sonde BRET ciblant TRPV4 (Figure 64 A et E), 22°C et 30,5°C lors du refroidissement des cellules exprimant les sondes BRET ciblant respectivement TRPA1 et TRPM8 (Figure 66A et C, et Figure 67A et C respectivement). Ces résultats coïncident avec ce qui est attendu d'après la littérature pour TRPV4 (Watanabe *et al*, 2002) et TRPM8 (Bharate & Bharate, 2012). Cependant, ces résultats sont 5°C au-dessus de ce qui est attendu pour le seuil d'activation de TRPA1 (Laursen *et al*, 2015, 2014).

Dans le cas de la sonde BRET ciblant TRPV4, au-delà de 29,5°C, on observe une réponse biphasique à la température ; le signal augmentant significativement avec la température jusqu'à 46°C, avant de chuter entre 46°C et 50°C (Figure 64A). Ce comportement biphasique à partir du seuil de sensibilité thermique rencontré sur TRPV4 n'est pas observé pour les sondes ciblant TRPA1 et TRPM8, dont le signal de BRET évolue de manière linéaire avec le refroidissement à partir de la température de transition, en augmentant pour la sonde mNeonG-TRPM8-NLuc (Figure 67) et en diminuant pour la sonde mNeonG-TRPA1-NLuc (Figure 66). Cette différence dans l'évolution du signal de BRET avec le refroidissement indique qu'une transition de conformation intervient bien dans la structure tertiaire ou quaternaire

des canaux TRPA1 et TRPM8 en fonction de la température, qui aboutit à un rapprochement et/ou une meilleure orientation des dipôles donneurs et accepteurs dans la sonde ciblant TRPM8, et à un éloignement ou une orientation moins favorable des dipôles donneurs et accepteurs dans la sonde ciblant TRPA1.

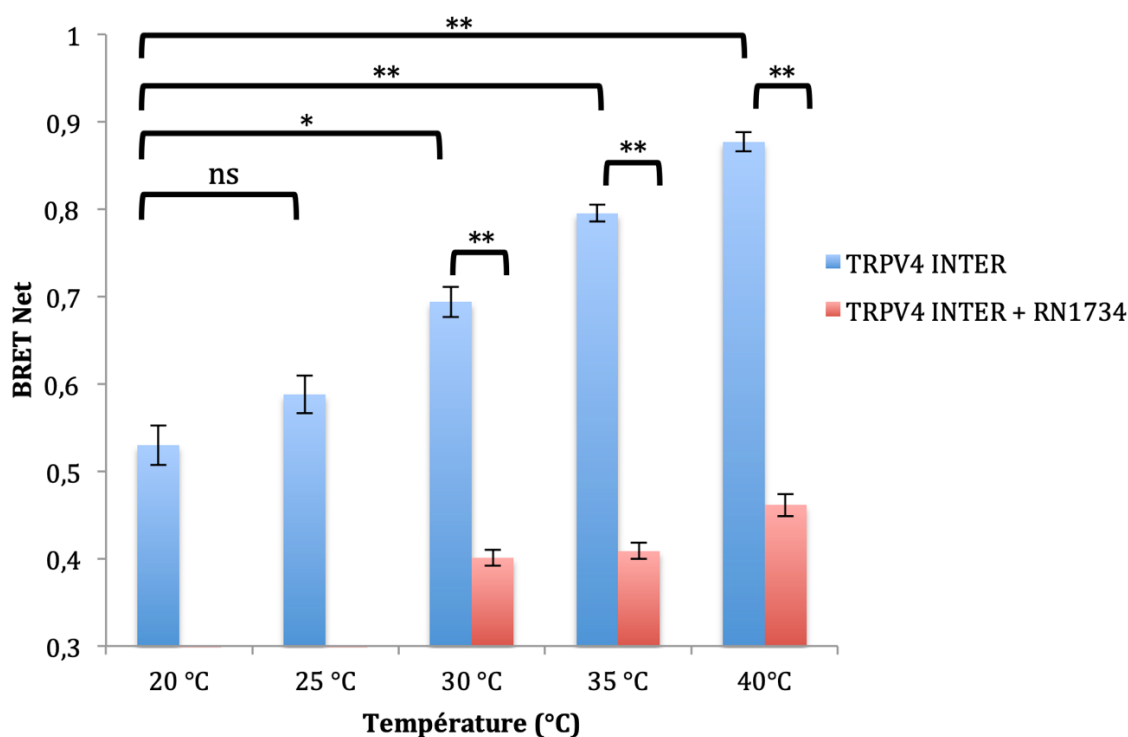
Il est intéressant de remarquer que les sondes BRET intramoléculaires ciblant TRPV4, TRPM8 et TRPA1 présentent une hystérésis de leur réponse à un cycle d'échauffement/refroidissement (TRPV4) ou de refroidissement/échauffement (TRPA1 et TRPM8), la variation du signal de BRET n'étant pas identique lors des deux phases du cycle. Comme attendu, l'incubation des cellules avec les antagonistes RN1734, AM0902 et M8B, inhibant respectivement les canaux TRPV4, TRPA1 et TRPM8, entraîne une modification significative des variations du signal de BRET mesuré avec les sondes mNeonG-TRPV4-NLuc (Figure 64B et E), mNeonG-TRPM8-NLuc (Figure 67B et E) et mNeonG-TRPA1-NLuc (Figure 66B et E) en fonction la température. Ces résultats suggèrent que ces sondes BRET rendent bien compte du caractère thermosensible des canaux ici étudiés.



**Figure 64** - Effet d'un cycle de température sur le signal de BRET mesuré avec les sondes BRET ciblant TRPV4. Les résultats sont exprimés sous forme de variation du BRET Net par rapport au signal mesuré à 20°C ( $0.295 \pm 0.008$  pour la sonde intramoléculaire et  $0.492 \pm 0.095$  pour la sonde intermoléculaire). (A et B) Évolution du signal de BRET mesuré avec la sonde mNeonG-TRPV4-NLuc en absence (n=7)(A) et en présence d'antagoniste RN1734 (20  $\mu$ M)(n=3)(B). Le ratio de BRET des cellules HEK293T exprimant la sonde mNeonG-TRPV4-NLuc est mesuré en temps réel, tandis que le milieu de culture est chauffé de 20°C à 50°C, puis refroidit jusqu'à 15°C à l'aide d'un dispositif Peltier placé sous la culture de cellule. L'erreur standard de la moyenne (SEM) est représentée sous forme d'aire. Le sens de la variation de la température est indiqué par une flèche. Les numéros représentent l'ordre dans lequel se succèdent l'augmentation et la diminution de température. (C et D) L'intersection des régressions linéaires, obtenues avant et après le changement de pente de l'évolution du signal de BRET avec la température, permet de déterminer le seuil de sensibilité thermique de la sonde BRET intramoléculaire ciblant TRPV4 lors de la phase d'échauffement mesuré en A (C) et en B (D). (E) Superposition des points expérimentaux obtenus en (A) et (B). (F) Résultat préliminaire de l'effet de la

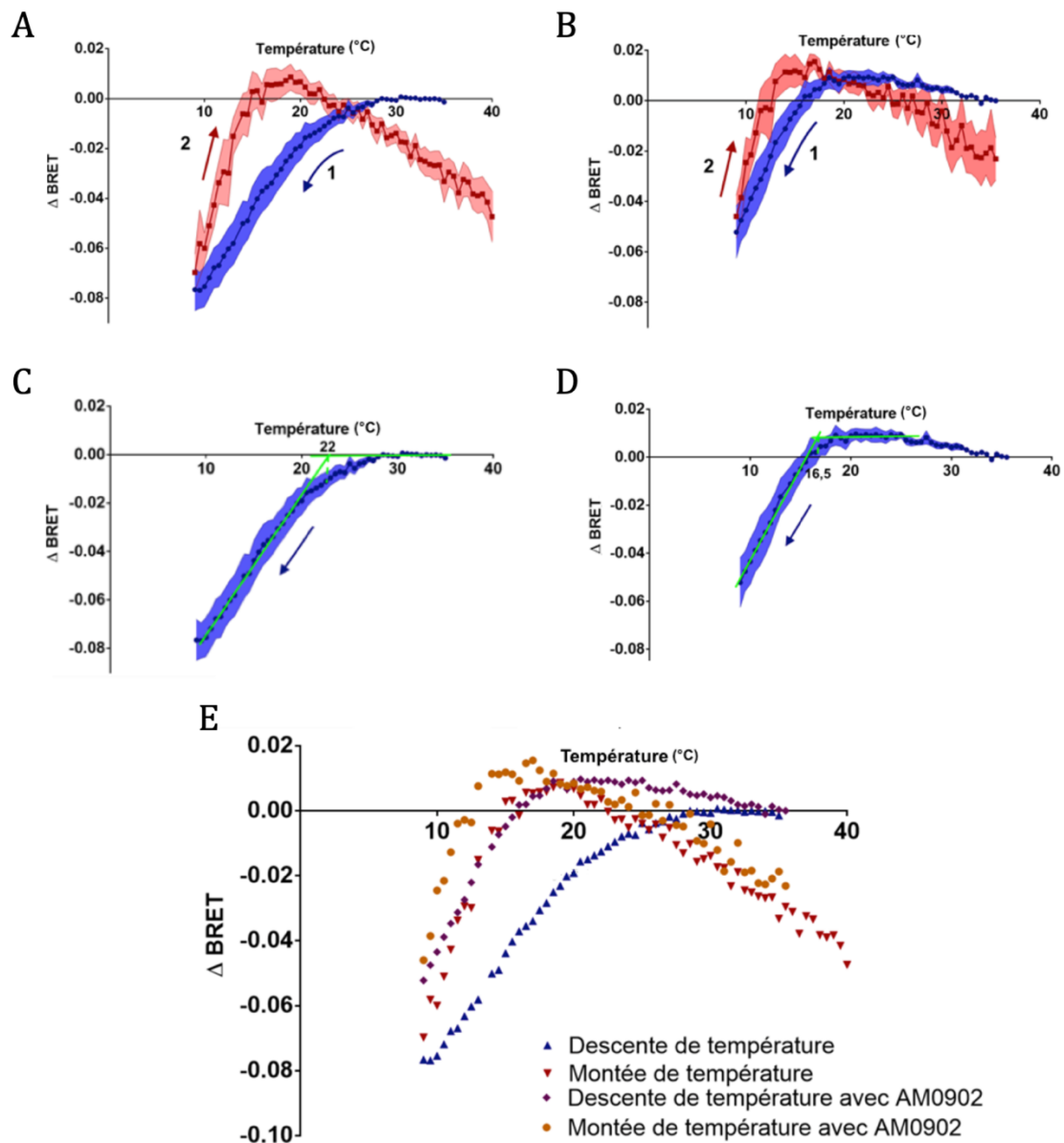
température sur le signal BRET mesuré avec la sonde TRPV4-NLuc mNeonG-CaM sans antagoniste (n=1).

Dans le cas de TRPV4, en plus des expériences réalisées en présence d'inhibiteur RN1734, nous avons également testé l'impact de la variation de température sur l'activité du canal à l'aide d'un second test BRET. Pour cela, nous avons utilisé un test de BRET intermoléculaire pour mesurer l'impact de la température sur le couplage de TRPV4 avec la CaM, lequel dépend de l'ouverture du canal et du passage des ions calcium à travers le pore (Ruigrok *et al*, 2017). À l'aide de ce test, nous avons pu mesurer une réponse à la température qui est comparable à celle obtenue avec la sonde BRET intramoléculaire ciblant TRPV4 (Figure 64F), et qui est également inhibée en présence de l'inhibiteur RN1734 (Figure 64F et Figure 65).

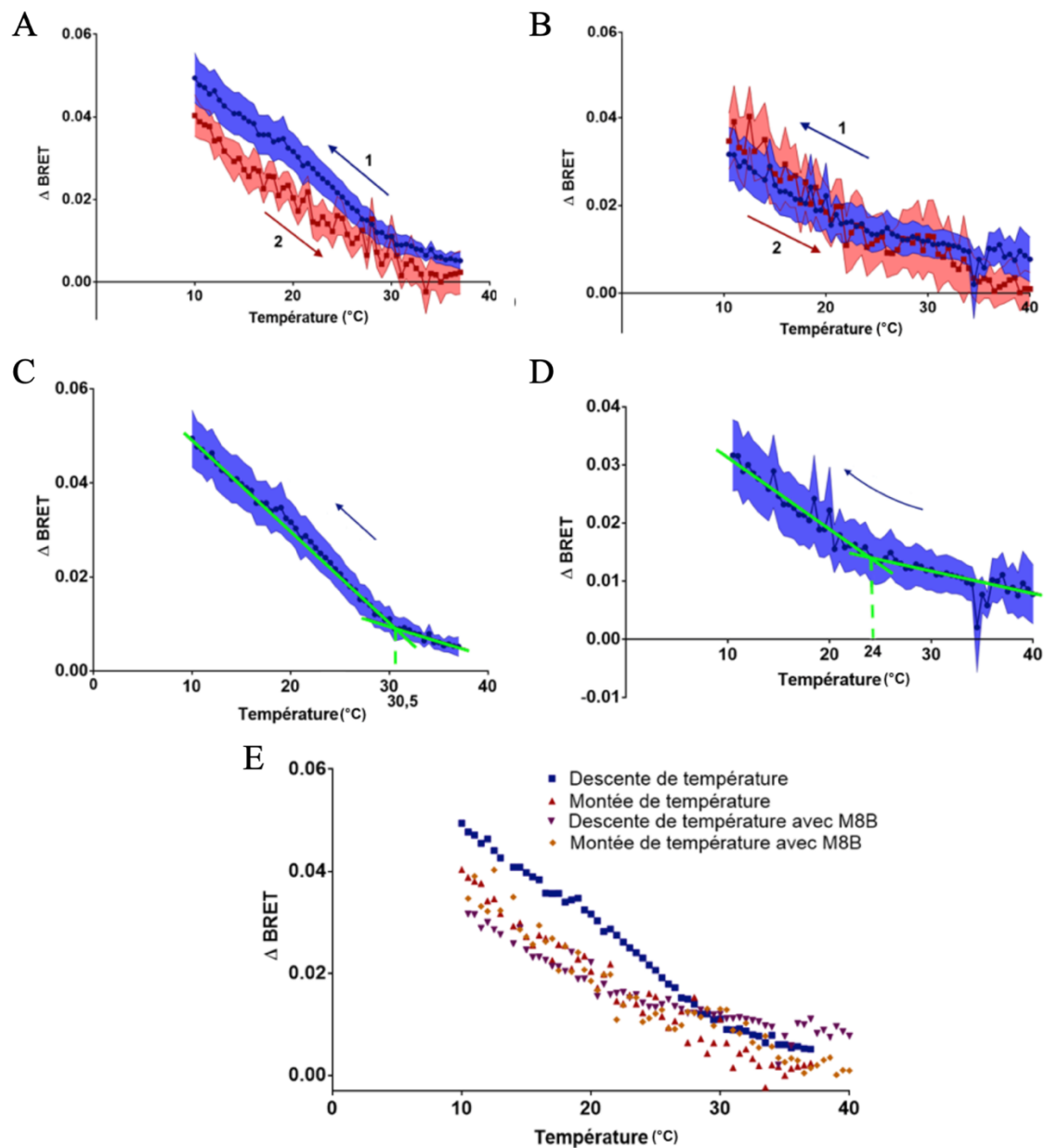


**Figure 65** - Signal de BRET mesuré à différentes températures (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, et 40°C), dans des cellules HEK293T exprimant les constructions TRPV4-NLuc/mNeonG-CaM. Le composé RN1734 a été ajouté 5 minutes avant la mesure à une concentration finale de 20  $\mu$ M. Les données ont été analysées à l'aide d'un test Mann-Whitney pour déterminer la significativité statistique de l'écart mesuré entre deux conditions, avec \*\*,  $p < 0.01$  ; \*,  $p < 0.05$ . "ns" indique qu'il n'y a pas de différence statistique. Les résultats ont été obtenus à partir de 6 expériences indépendantes réalisées en absence de RN1734 et de 4 expériences indépendantes réalisées en présence de RN1734.





**Figure 66** - Effet d'un cycle de température sur le signal de BRET mesuré avec la sonde BRET intramoléculeaire ciblant TRPA1. Les résultats sont exprimés sous forme de variation du BRET Net par rapport au signal mesuré à 15°C égal à  $0.532 \pm 0.002$ . (A et B) Évolution du signal de BRET mesuré avec la sonde mNeonG-TRPA1-NLuc en absence (n=7)(A) et en présence d'antagoniste AM0902 (20  $\mu$ M) (n=7)(B). Le ratio de BRET des cellules HEK293T exprimant la sonde mNeonG-TRPA1-NLuc est mesuré en temps réel, tandis que le milieu de culture est refroidi de 37°C à 10°C, puis réchauffé jusqu'à 40°C à l'aide d'un dispositif Peltier placé sous la culture de cellule. L'erreur standard de la moyenne (SEM) est représentée sous forme d'aire. Le sens de la variation de la température est indiqué par une flèche. Les numéros représentent l'ordre dans lequel se succèdent la diminution et l'augmentation de température. (C et D) L'intersection des régressions linéaires, obtenues avant et après le changement de pente de l'évolution du signal de BRET avec la température, permet de déterminer le seuil de sensibilité thermique de la sonde BRET intramoléculeaire ciblant TRPA1 lors de la phase de refroidissement mesuré en A (C) et en B (D). (E) Superposition des points expérimentaux obtenus en (A) et (B).

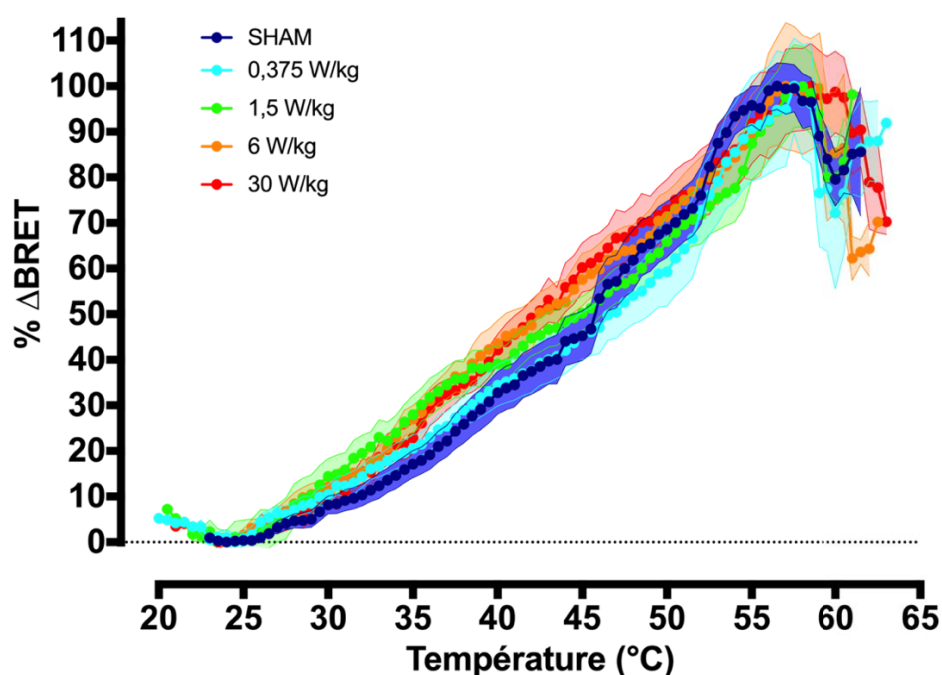


**Figure 67** - Effet d'un cycle de température sur le signal de BRET mesuré avec la sonde BRET intramoléculeire ciblant TRPM8. Les résultats sont exprimés sous forme de variation du BRET Net par rapport au signal mesuré à 15°C égal à  $0.396 \pm 0.002$ . (A et B) Évolution du signal de BRET mesuré avec la sonde mNeonG-TRPM8-NLuc en absence (n=15)(A) et en présence d'antagoniste M8B Hydrochloride (20  $\mu$ M) (n=14) (B). Le ratio de BRET des cellules HEK293T exprimant la sonde mNeonG-TRPM8-NLuc est mesuré en temps réel, tandis que le milieu de culture est refroidi de 37°C à 10°C, puis réchauffé jusqu'à 40°C à l'aide d'un dispositif Peltier placé sous la culture de cellule. L'erreur standard de la moyenne (SEM) est représentée sous forme d'aire. Le sens de la variation de la température est indiqué par une flèche. Les numéros représentent l'ordre dans lequel se succèdent la diminution et l'augmentation de température. (C et D) L'intersection des régressions linéaires, obtenues avant et après le changement de pente de l'évolution du signal de BRET avec la température, permet de déterminer le seuil de sensibilité thermique de la sonde BRET intramoléculeire ciblant TRPM8 lors de la phase de refroidissement mesuré en A (C) et en B (D). (E) Superposition des points expérimentaux obtenus en (A) et (B).

D- Mesure de la variation de signal de BRET en fonction de la température sous exposition RF avec le système de thermorégulation fluïdique

Une fois la variation du signal de BRET en fonction de la température caractérisée, nous avons renouvelé ces expérimentations sous exposition à un signal 900 MHz non modulé (CW, continuous wave) à différents DAS compris entre 0,375 W/kg et 30W/kg. Nous avons réalisé ces expériences à l'aide du système de thermorégulation fluïdique à 4 vannes. Afin de mieux percevoir les variations de seuil d'activation thermique et de  $T_{1/2}$  (température entraînant 50 % de l'activation maximale du canal), les résultats ont été normalisés par rapport à l'amplitude maximale obtenue dans la condition Sham (Figure 68 et Figure 69).

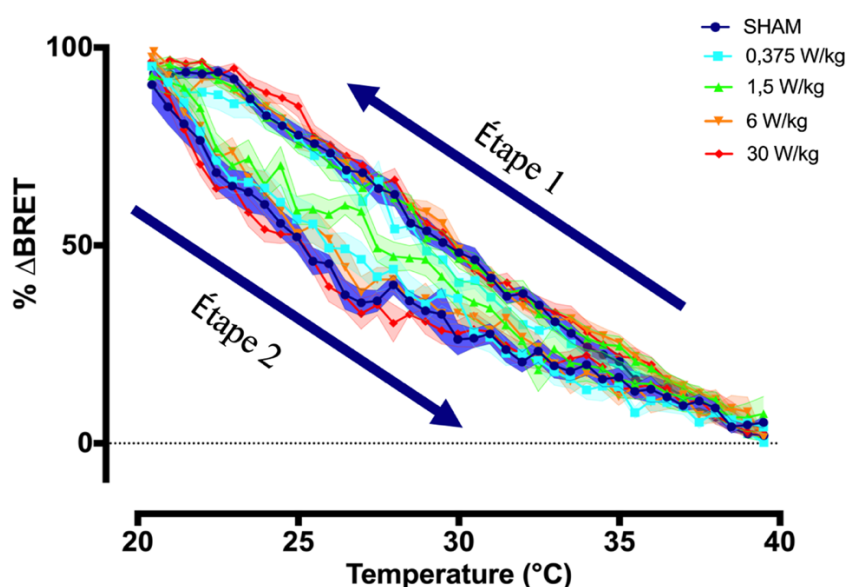
On constate sur la Figure 68 que l'exposition RF, quel que soit le DAS utilisé, ne modifie ni l'amplitude maximale de la variation de BRET avec l'échauffement, ni le  $T_{1/2}$ , ni le seuil d'activation des changements conformationnels de TRPV4 par la température.



**Figure 68** – Caractérisation de la réponse de la sonde BRET mNeonTRPV4-NLuc aux variations de température pendant une exposition RF à différents DAS. Évolution du signal de BRET en fonction de la température enregistrée dans le milieu des cellules HEK 293T exprimant les sondes BRET. Le milieu a été chauffé de 20°C à 65°C par un système de thermorégulation fluïdique. Chaque condition est la moyenne de 6 réplïcas. Pour simplifier la lecture les résultats sont représentés en pourcentage de variation de BRET. La valeur du BRET *net au* début des expositions est de  $0,35 \pm 0,06$ .

De même, la Figure 69 montre que l'exposition à un signal RF 900 MHz non modulé, quel que soit le DAS, n'impacte pas non plus l'hystérèse de la variation du signal de BRET mesuré

lorsque des cellules exprimant la sonde mN-TRPM8-nL sont soumises à un cycle de refroidissement / échauffement du milieu de culture entre 40°C et 20°C. L'étude de l'hystérèse des sondes ciblant le canal TRPV4 n'est malheureusement pas encore réalisée et nécessite davantage d'investigations.



**Figure 69** - Caractérisation de la réponse de la sonde BRET mNeonTRPM8-NLuc aux variations de température pendant une exposition RF à différents DAS. Évolution du signal de BRET en fonction de la température enregistrée dans le milieu des cellules HEK 293T exprimant les sondes BRET. Le milieu a été refroidi de 40°C à 20°C, puis réchauffé de 20°C à 40°C, par un système fluïdique. Chaque condition est la moyenne de 6 réplicas (2 réplicas techniques par réplicas biologiques). Les valeurs basales de BRET NET au début des expositions est de 0,46 ± 0,05 pour TRPM8.

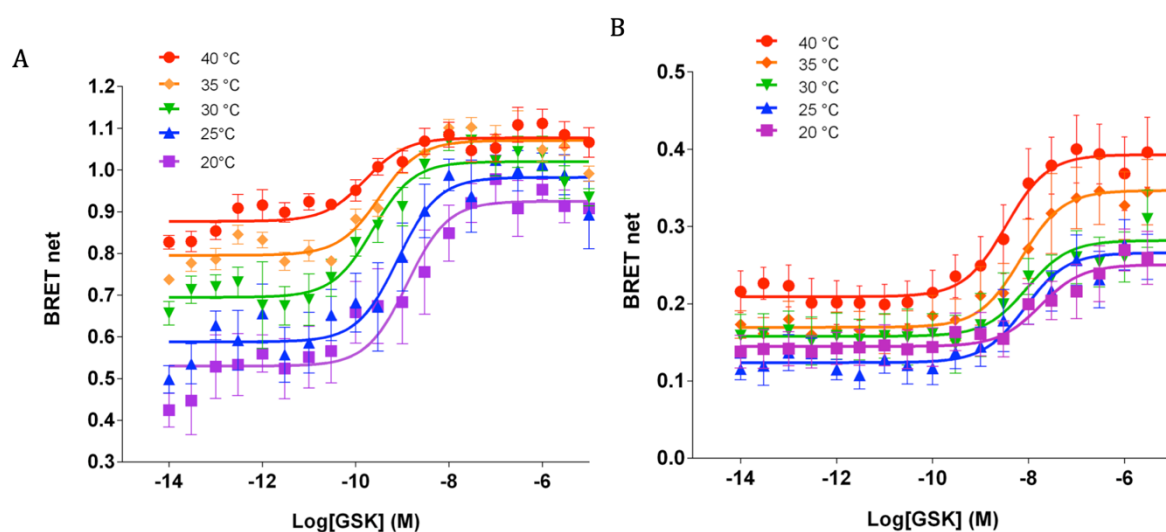
E- Mesure de la variation de signal de BRET en présence de ligands spécifiques des canaux ciblés

Les canaux TRP étant des canaux polymodaux, nous avons ensuite cherché à caractériser l'effet des RF sur leur mode d'activation chimique à différentes températures. Dans ce but nous avons réalisé des expériences de doses-réponses d'agonistes, à température fixe ou variable, à l'aide de nos sondes BRET ciblant les différents canaux TRPV4, TRPA1 et TRPM8.

a- Impact de la température sur la réponse aux ligands des sondes BRET ciblant TRPV4

Ayant montré que les sonde BRET intramoléculaire et intermoléculaire ciblant le canal TRPV4 rendent bien compte de l'activité de ce canal dans le mode d'activation thermique, nous avons ensuite voulu vérifier si les sondes BRET intramoléculaire et intermoléculaires ciblant TRPV4 pouvaient rendre compte de la synergie entre les modes d'activation thermique

et chimique de TRPV4 (Gao *et al*, 2003). Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de dose-réponse d'un puissant agoniste de TRPV4, le GSK101 (Thorneloe *et al*, 2008), à différentes températures allant de 20°C à 40°C par palier de 5°C (Figure 70).



**Figure 70** - Courbes dose-réponse de l'effet de l'agoniste GSK1016790A sur la mesure du BRET dans des cellules HEK293T exprimant la sonde intermoléculaire (A) ou la sonde intramoléculaire (B), et incubées à différentes températures. Les courbes représentent la moyenne de 6 expériences indépendantes et réalisées en duplicatas.

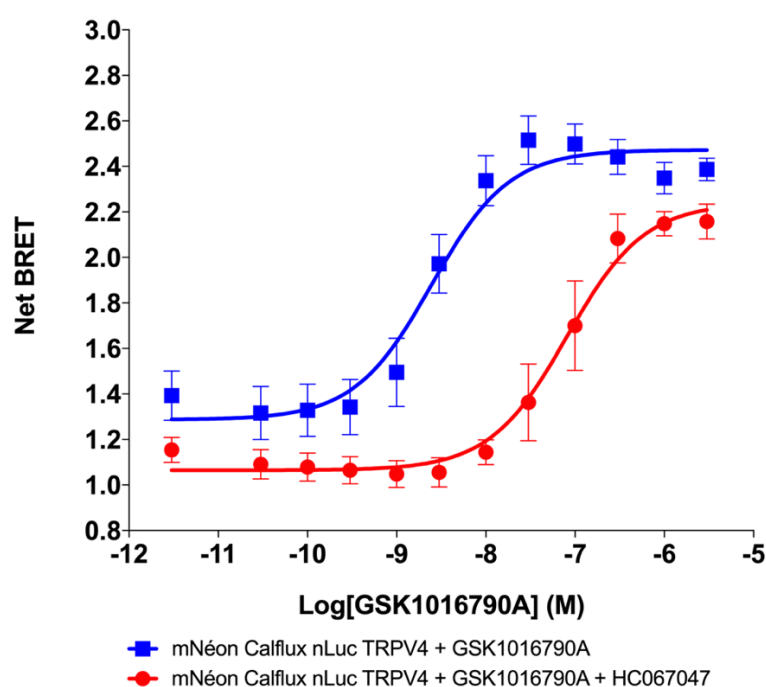
À 20°C, suite à l'ajout de GSK101 dans le milieu de culture, nous observons une augmentation dose-dépendante du signal de BRET à la fois avec la sonde intramoléculaire et avec la sonde intermoléculaire. L'EC50 mesuré avec chaque test est comparable à la valeur reportée dans la littérature avec des méthodes conventionnelles (patch-clamp et mesure de calcium intracellulaire (Thorneloe *et al*, 2008)(Tableau 6)). Toutefois, à cette température le test intermoléculaire permet de mesurer des variations du signal de BRET induites par l'activation de TRPV4 en présence de GSK101 avec de plus fortes amplitudes et un EC50 plus faible que la sonde intramoléculaire (Tableau 6).

**Tableau 6** - Puissance de l'agoniste GSK101, exprimée en Log EC50 (M), et calculée à partir des expériences de dose-réponse réalisées à différentes températures comprises entre 20°C et 40°C sur des cellules HEK293T exprimant transitoirement soit la sonde intramoléculaire, soit la sonde intermoléculaire. Les résultats indiqués représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard des valeurs obtenues à partir de 6 expériences indépendantes et réalisées en duplicata.

Température	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
TRPV4-NLuc/mNeonG-CaM	-8,89 $\pm$ 0,22	-9,1 $\pm$ 0,21	-9,63 $\pm$ 0,18	-9,50 $\pm$ 0,12	-9,79 $\pm$ 0,19
mNeonG-TRPV4-NLuc	-7,75 $\pm$ 0,32	-8,07 $\pm$ 0,23	-8,04 $\pm$ 0,33	-8,16 $\pm$ 0,24	-8,47 $\pm$ 0,24

Il est intéressant de remarquer que les deux tests montrent de manière concordante une amélioration de la puissance du GSK101 entre 20°C et 40°C (Tableau 6). Par contre, alors que l'efficacité maximale du GSK101 augmente avec la température pour le test intramoléculaire, celle-ci diminue pour le test intermoléculaire du fait de l'augmentation du signal de base (Figure 70).

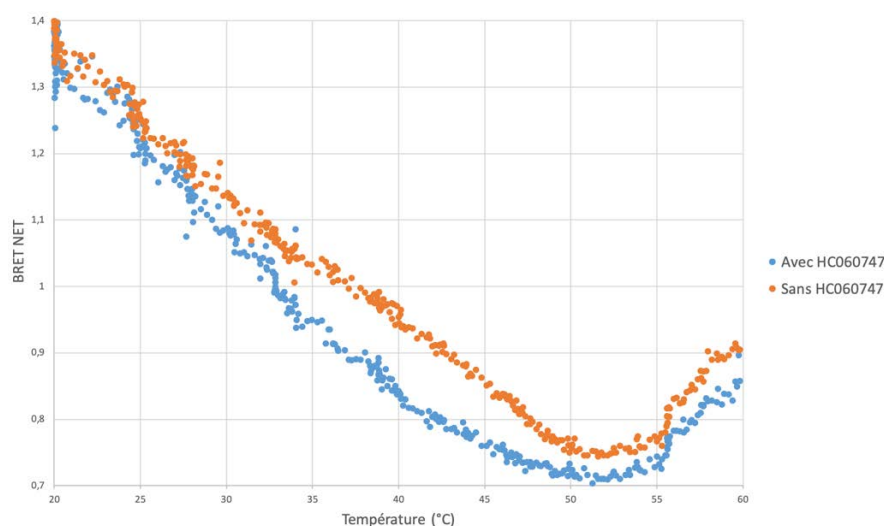
Nous avons, enfin, cherché à caractériser un nouveau type de sonde BRET intramoléculaire ciblant TRPV4, où le canal TRPV4 est fusionné à son extrémité N-terminale à un senseur BRET sensible au calcium (le senseur Calflux (Yang *et al*, 2016)). Cette sonde, dite de « seconde génération », permet de mesurer les variations de concentration cytoplasmique d'un ion spécifique (ici le calcium) dans le nano-environnement du pore du canal ciblé. Comme illustré en Figure 71, l'utilisation de cette sonde dans des expériences de dose-réponse de l'agoniste GSK101, réalisées à 37°C en présence ou en absence d'antagoniste HC067047, montrent que ces sondes permettent d'obtenir des amplitudes de variations maximales bien supérieures (BRET~1.2) à celles obtenues avec les sondes intra- et intermoléculaires de première génération (BRET~0.2).



**Figure 71** - Courbes dose-réponse de l'effet de l'agoniste GSK101 à 37°C sur la mesure du BRET dans des cellules HEK293T exprimant la sonde intramoléculaire mNeonG-Calflux-nLucTRPV4 en absence ou en présence de l'antagoniste HC067047 (20  $\mu$ M). Les courbes représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes toutes réalisées en duplicata.

Comme attendu, le HC067047 qui est un autre antagoniste spécifique du canal TRPV4 parvient à déplacer la puissance du GSK101 vers de plus fortes concentrations, validant la spécificité de l'essai. Il est également intéressant de noter que le BRET basal est diminué en présence de l'antagoniste. L'efficacité, elle, ne varie pas.

Nous avons ensuite cherché à déterminer s'il était possible de mesurer l'activation du canal TRPV4 dans le mode d'activation thermique avec cette sonde BRET de deuxième génération. Nous avons alors pu mesurer que l'augmentation de la température a entraîné de manière répétée une diminution continue du niveau basal de BRET de la sonde mNeonG-Calfux-NLuc-TRPV4 (Figure 72) entre 20 et 50°C, avec une légère augmentation du signal entre 50°C et 52°C. L'ajout de l'antagoniste HC067047 (20 µM) lors de la variation de température entraîne une légère accélération de la diminution du signal entre 30°C et 50°C, indiquant que cette sonde ciblant TRPV4 est effectivement capable de réagir aux modifications de température avec un seuil cohérent avec celui attendu pour TRPV4 (aux alentours de 30°C). Malheureusement, cette variation entre les courbes avec et sans inhibiteur est minime par rapport à la diminution globale du signal de BRET suggérant que le senseur Calflux est impacté par la température. Nous avons conclu que cette sonde BRET de deuxième génération ne permet pas l'étude fiable du canal soumis à des variations de température. Elle est par contre informative à température constante.



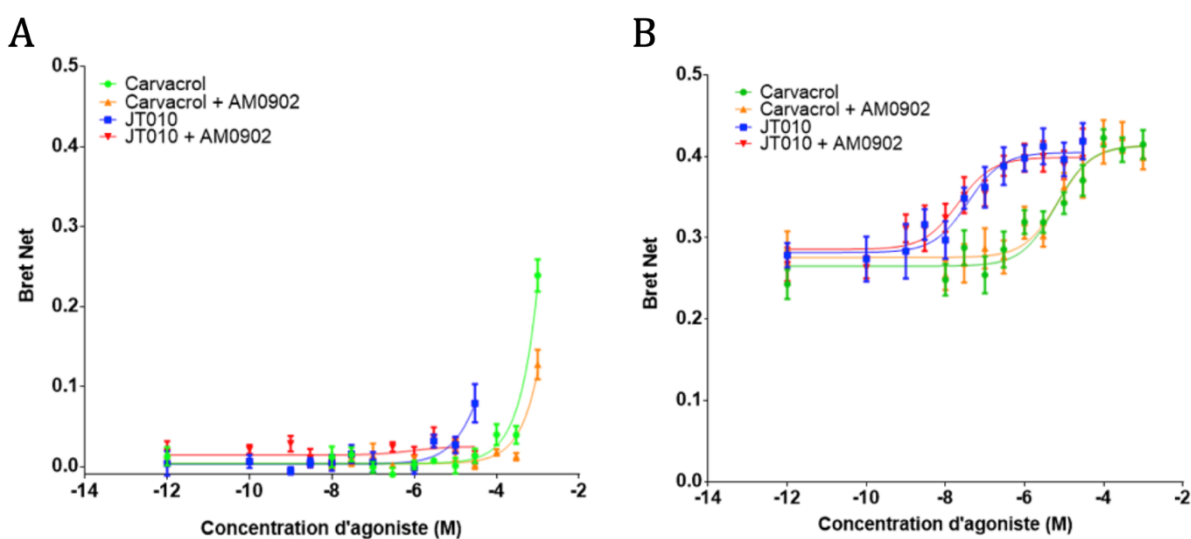
**Figure 72** - Effet d'une élévation de température (abscisse) sur le ratio de BRET (ordonnée) mesuré avec les sondes BRET mNeon-Calfux-NLuc-TRPV4. Les résultats sont exprimés sous forme de variation du BRET Brut. L'évolution du signal de BRET mesuré avec la sonde mNeonG-Calfux-NLuc-TRPV4 en absence d'antagoniste est représentée en orange et en présence d'antagoniste HC060747 (20 µM) en



bleu. Le ratio de BRET des cellules HEK293T exprimant la sonde mNeonG-Calflux-nLuTRPV4 est mesuré en temps réel, tandis que le milieu de culture est chauffé de 20°C à 60°C à l'aide d'un dispositif de thermorégulation fluide.

#### b- Caractérisation de la sonde ciblant TRPA1 dans le mode d'activation chimique

L'analyse des signaux BRET obtenus avec les sondes mNeonG-TRPA1-NLuc montre, conformément aux résultats obtenus en faisant varier la température (Figure 66), que le BRET de base de cette sonde est moins élevé à 20°C qu'à 37°C (Figure 73).



**Figure 73** - Courbes dose-réponse de l'effet des agonistes carvacrol et JT010 sur la mesure du BRET dans des cellules HEK293T exprimant la sonde intermoléculaire mNeonG-TRPA1- NLuc, en présence ou en absence d'antagoniste AM0902 (20 μM). Les expériences ont été réalisées à 20°C (A) ou à 37°C (B). Les courbes représentent la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata.

L'analyse des courbes doses-réponses réalisées à 20°C à l'aide de la sonde mNeonG-TRPA1-NLuc en fonction de la concentration de 2 agonistes, le JT010 (un activateur électrophile) et le carvacrol, montre qu'à cette température, ces deux composés n'entraînent une augmentation du signal de BRET qu'à des concentrations largement supérieures à leurs EC50 théoriques (65 nM et 150 μM respectivement pour le JT010 et le carvacrol). La faible puissance de ces agonistes à 20°C empêche toute conclusion quant à l'effet antagoniste du composé AM0902 (Figure 73A). Les mêmes expériences réalisées à 37°C (Figure 73B) montrent au contraire une augmentation dose-dépendante du signal de BRET en fonction de la concentration de JT010 ou de carvacrol, avec des EC50 respectifs de 37 nM et de 6 μM (Tableau 7), suggérant que la liaison de ces agonistes sur TRPA1 dépend de la température de



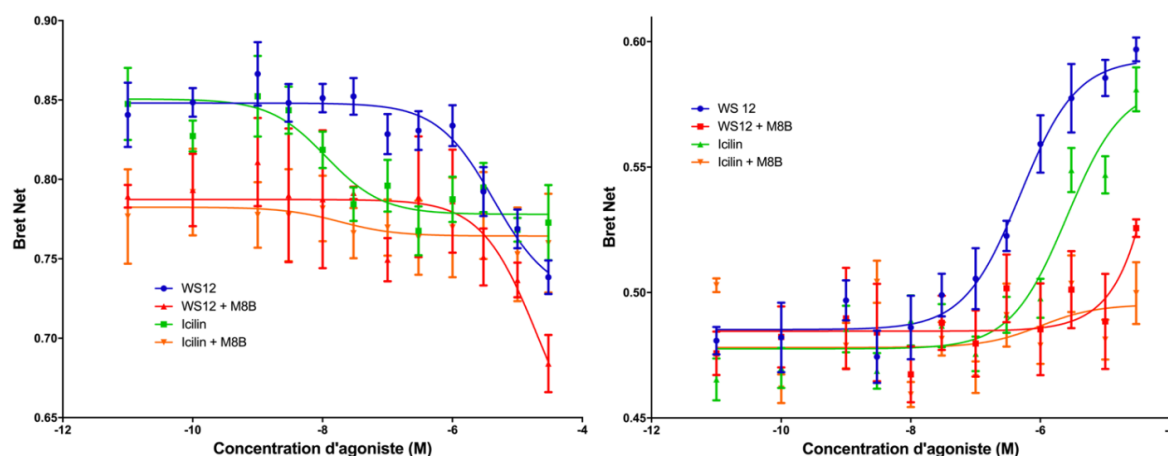
l'essai. L'antagoniste AM0902 n'est cependant pas capable, à 37°C, de déplacer la puissance des composés agonistes testés, ni d'affecter leur efficacité.

**Tableau 7** - Puissances des agonistes testés (Carvacrol ou JT010), exprimées en Log EC50 (M), et calculées à partir des expériences de dose-réponse réalisées à 37°C sur des cellules HEK293T exprimant transitoirement la sonde intramoléculaire mNeonG-TRPA1-NLuc, avec et sans antagoniste AM0902. Les résultats indiqués représentent la moyenne  $\pm$  SEM obtenues à partir de 3 expériences indépendantes et réalisées en duplicata.

Agoniste $\pm$ Antagoniste	Température 37°C			
	Sans AM0902		Avec AM0902	
	Carvacrol	JT010	Carvacrol	JT010
mNeonG-TRA1-NLuc	-5.20 $\pm$ 0.18	-7.43 $\pm$ 0.26	-5.14 $\pm$ 0.23	-7.68 $\pm$ 0.25

### *c- Caractérisation de la sonde ciblant TRPM8 dans le mode d'activation chimique*

De même que pour les canaux précédents, l'analyse des signaux BRET obtenus avec les sondes mNeonG-TRPM8-NLuc montre, conformément aux résultats obtenus en faisant varier la température (Figure 67), que le BRET de base de cette sonde est plus élevé à 20°C qu'à 37°C (Figure 74).



**Figure 74** - Courbes dose-réponse de l'effet des agonistes WS12 et Icilin sur la mesure du BRET dans des cellules HEK293T exprimant la sonde intermoléculaire mNeonG-TRPM8-NLuc, en présence ou en absence d'antagoniste M8B hydrichoride (20  $\mu$ M). Les expériences ont été réalisées à 20°C (A) ou à 37°C (B). Les courbes représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata.

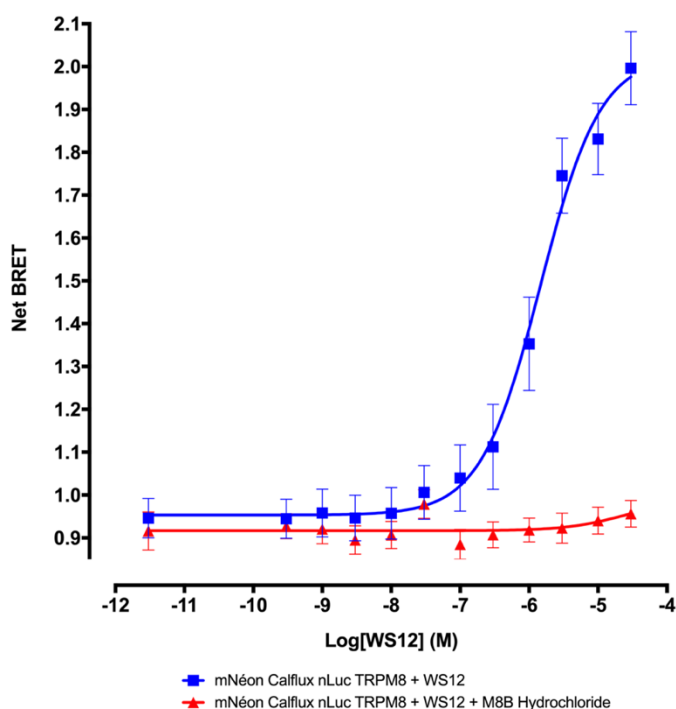
**Tableau 8** - Puissance des agonistes testés (WS12 ou Icilin), exprimées en Log EC50 (M), et calculées à partir des expériences de dose-réponse réalisées à 20°C et à 37°C sur des cellules HEK293T exprimant transitoirement la sonde intramoléculaire mNeonG-TRPM8-NLuc, avec et sans antagoniste M8B hydrochloride (M8B). Les résultats indiqués représentent la moyenne  $\pm$  SEM obtenues à partir de 3 expériences indépendantes et réalisées en duplicata. NA signifie non applicable.

Température	20°C				37°C			
	Sans M8B		Avec M8B		Sans M8B		Avec M8B	
Agoniste $\pm$ Antagoniste	WS12	Icilin	WS12	Icilin	WS12	Icilin	WS12	Icilin
mNeonG-TRPM8-NLuc	-5,364 $\pm$ 0.24	-7,95 $\pm$ 0.35	-4,68 $\pm$ 0.77	-7,74 $\pm$ 2.02	-6,309 $\pm$ 0.158	-5,59 $\pm$ 0.15	NA	-6,01 $\pm$ 0.99

L'analyse des courbes doses-réponses réalisées à 20°C à l'aide de la sonde mNeonG-TRPM8-NLuc en fonction de la concentration de deux agonistes, le WS12 et l'Icilin, montre qu'à cette température, le WS12 n'entraînent une augmentation du signal de BRET qu'à des concentrations largement supérieures à l'EC50 théorique (193 nM). La faible puissance de ces agonistes à 20°C empêche toute conclusion quant à l'effet antagoniste du composé M8B hydrochloride sur le potentiel de la dose réponse (Figure 74A). En revanche, l'icilin affiche un EC50 a 10  $\mu$ M. Bien qu'il soit éloigné de l'EC50 théorique de 0,3  $\mu$ M il convient de rappeler que nous observons là des changements de conformation du canal à 20°C. De plus, l'incubation avec l'antagoniste M8B supprime la réponse sigmoïdale de la sonde. Les mêmes expériences réalisées à 37°C (Figure 74B) montrent au contraire une augmentation dose-dépendante du signal de BRET en fonction de la concentration de WS12 ou d'icilin, avec des EC50 respectifs de 490 nM et de 2  $\mu$ M (Tableau 8). A cette température, l'antagoniste M8B hydrochloride est capable de déplacer la puissance des composés agonistes testés. Ces résultats pourraient par exemple suggérer que la liaison des ligands sur TRPM8 dépend de la température de l'essai. Cela pourrait également suggérer que les agonistes n'entraînent pas d'activation du canal TRPM8 à basse température même s'ils se sont fixés sur le canal. Ces résultats interpellent sur la relation entre les modes d'activation thermique et chimique de TRPM8 et appellent à de plus amples investigations.

Comme pour TRPV4, une sonde de seconde génération a également été caractérisée pour TRPM8 en fusionnant le senseur BRET Calflux à l'extrémité N-terminale de TRPM8. Là encore, on note que les variations maximales de BRET mesurées avec cette sonde ciblant

TRPM8 sont bien supérieures à celles mesurées avec les sondes de première génération (Figure 75).



**Figure 75** - Courbes dose-réponse de l'effet de l'agoniste WS12 sur la mesure du BRET dans des cellules HEK293T exprimant la sonde intermoléculaire mNeonG-TRPM8-NLuc, en présence ou en absence d'antagoniste M8B hydrochloride (20 µM). Les expériences ont été réalisées à 37°C. Les courbes représentent la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata.

L'EC50 du WS12 est d'environ 1,45 µM ce qui est supérieur à l'EC50 classiquement retrouvé dans la littérature (193 nM ; Bödding *et al*, 2007), toutefois le M8B hydrochloride empêche totalement la variation de la concentration calcique sous le canal en présence de WS12. Tous ces éléments tendent à montrer que cette sonde BRET rend bien compte de l'activité du canal TRPM8.

#### 4- Discussion

Ce travail a permis de commencer à caractériser la réponse de canaux ioniques thermosensibles de notre organisme lors d'une exposition à des champs radiofréquences au cours d'un processus de variation de la température. Mon équipe avait préalablement mis au point des sondes BRET intramoléculaire et intermoléculaire ciblant TRPV1. Elles permettaient la mesure en temps réel de l'activité du canal TRPV1, notamment sous exposition CEM RF (Ruigrok *et al*, 2017, 2018) mais avec un système de contrôle de la température qui restait rudimentaire. La mesure des effets des RF sur d'autres canaux thermo-TRP (TRPA1, TRPM8, TRPV4) demandait cependant aussi un travail préalable de conception et de caractérisation de nouvelles sondes BRET ciblant ces canaux lors d'une activation dans les modes thermique

et chimique. Sur le plan de la biologie, mon travail s'est donc déroulé en 2 étapes : (i) une première étape de biologie moléculaire où j'ai réalisé la construction des sondes BRET intramoléculaires ciblant les canaux TRPV4, TRPM8 et TRPA1 ; (ii) une deuxième étape où j'ai caractérisé la réponse aux variations de température (mode d'activation thermique) des sondes BRET ciblant les canaux TRPV4, TRPM8 et TRPA1, puis dans le mode d'activation chimique. Grâce aux sondes BRET intramoléculaires ciblant TRPV4 et TRPM8, j'ai enfin pu commencer à caractériser le comportement thermique des canaux susmentionnés sous exposition RF CW à 900 MHz.

Au cours de ce travail, j'ai utilisé 2 systèmes de thermorégulation distincts. Le premier fut un appareil Peltier déjà utilisé par mon équipe pour ces manipulations sur TRPV1 (Ruigrok *et al*, 2017, 2018). Ce système étant lent et difficile à régler avec précision, j'ai donc initié le développement d'un système de thermorégulation fluide automatisé, qui a évolué au cours de ma thèse. C'est avec ce système fluide que nous avons exposé les cellules exprimant les sondes BRET aux RF.

#### A- Caractérisation de la réponse des sondes BRET intramoléculaires ciblant les canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4 lors de variations de température avec un système de thermorégulation Peltier

L'analyse de la variation du signal de BRET en fonction de la température indique que les différentes sondes intramoléculaires et intermoléculaires testées subissent des changements de conformation importants à partir d'un seuil de température conforme à ceux décrits dans la littérature pour les canaux TRPV4 et TRPM8 lorsqu'ils sont exprimés de manière transitoire dans un système d'expression hétérologue, i.e. 30°C pour les sondes mNeonG-TRPV4-NLuc et TRPV4-NLuc/mNeon-CaM (lors d'un échauffement ; Watanabe *et al*, 2002) et mNeonGreen-TRPM8-NLuc (lors d'un refroidissement; Bharate & Bharate, 2012). Le seuil d'activation la sonde mNeonGreen-TRPA1-NLuc (également lors d'un refroidissement) est de 22°C, ce qui est 5°C au-dessus du seuil d'activation connu de ce canal (Laursen *et al*, 2015). Cela étant, comme décrit dans la littérature, le mode d'activation thermique de TRPA1 est sujet à débat du fait des multiples conditions pouvant impacter ces études (comme par exemple le niveau d'expression, les cellules choisies, ou encore la composition du milieu) (Laursen *et al*, 2014).

Il est intéressant de remarquer qu'à partir de 30°C, l'élévation de la température entraîne une courbe en cloche de la réponse de la sonde mNeonG-TRPV4-NLuc avec une augmentation importante du signal de BRET entre 30°C et 46°C, suivie d'une diminution entre 46°C et 50°C. À 50°C, le signal est revenu à son niveau de base mesuré initialement à 20°C (Figure 66A). Le comportement biphasique que nous observons pour TRPV4, avec une montée importante à partir du seuil d'activation suivi d'une baisse du BRET au-delà de 45°C (Figure 64), n'est pas retrouvé pour les canaux TRPA1 et TRPM8. Ces deux canaux sensibles au froid que sont TRPA1 (Figure 66) et TRPM8 (Figure 67) répondent de manière accrue mais linéaire à partir d'une température de transition correspondant à leur seuil de sensibilité thermique. Remarquons enfin que des antagonistes spécifiques des canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4 modifient la réponse à la température des sondes BRET intramoléculaires ciblant ces canaux en entraînant un décalage du seuil de sensibilité à la température (concernant les sondes ciblant TRPA1 et TRPM8) et/ou en diminuant la réponse de la sonde à la température (pour les sondes de TRPV4). Ceci est particulièrement visible pour la sonde mNeonG-TRPV4-NLuc dont le signal de BRET, en présence de l'antagoniste RN1734, ne varie presque plus lors de la phase de refroidissement.

De manière globale, ces résultats suggèrent que les sondes ciblant TRPA1, TRPM8 et TRPV4 rendent effectivement compte de la réponse de ces canaux à la température. Cette conclusion demande à être étayés par de plus amples expérimentations et soulèvent des questions fondamentales concernant la désensibilisation des canaux ici étudiés lors de cycles répétés de variation de la température.

#### B- Caractérisation de la réponse des sondes BRET intermoléculaires ciblant les canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4 lors de variations de température effectuées avec un système de thermorégulation Peltier

L'étude de l'effet de la température sur le couplage de TRPV4 avec la CaM montre que l'élévation de la température au-delà de 30°C entraîne une réponse similaire à celle obtenue avec la sonde intramoléculaire mNeonG-TRPV4-NLuc. L'augmentation du signal de BRET entre TRPV4 et la CaM peut ici traduire une augmentation du nombre de complexe TRPV4/CaM formé et/ou un changement conformationnel au sein de complexes préformés (les deux hypothèses n'étant pas mutuellement exclusives). Ne pouvant trancher ce débat au regard de nos résultats, nous parlerons d'une augmentation du couplage de TRPV4 avec la CaM par des

températures supérieures à 30°C (Figure 66F). Concernant ces sondes intermoléculaires, le fait que l'antagoniste RN1734, un inhibiteur du mode thermique d'activation de TRPV4 (Vincent *et al*, 2009), entraîne une diminution des signaux de BRET mesurés à 30°C, 35°C et 40°C à un niveau inférieur au BRET mesuré à 20°C semble confirmer qu'un couplage existe entre TRPV4 et la CaM même à 20°C (Figure 65). Puisque à 20°C et en présence de fortes concentrations de RN1734, TRPV4 est connue pour ne pas être actif, un précouplage de la CaM sur TRPV4 à l'état de repos des cellules est une hypothèse très probable. Ceci est en accord avec ce que l'équipe a démontré sur le canal TRPV1 (Ruigrok *et al*, 2017). Remarquons également que le RN1734 inhibe l'augmentation du signal de BRET de la sonde intermoléculaire entre 30°C et 40°C (Figure 65), ce qui peut suggérer que ce composé entraîne un décalage du seuil d'activation de TRPV4.

La CaM est également impliquée dans la désensibilisation par le froid de TRPA1 (Hasan *et al*, 2017) et de TRPM8 (Sarria *et al*, 2011), mais il n'a pas été décrit si ceci est le fait d'un couplage direct de ces canaux avec la CaM comme cela est le cas pour TRPV4 au regard de nos résultats. Il sera intéressant d'étudier cette possibilité à l'aide de sondes BRET intermoléculaires entre TRPA1 ou TRPM8 et la CaM, tout en continuant les investigations sur TRPV4.

La réalisation d'un cycle d'échauffement / refroidissement (pour les sondes ciblant l'activité de TRPV4) ou de refroidissement / échauffement (pour les sondes ciblant l'activité de TRPM8 et TRPA1) met en évidence une hystérésis de la réponse à la température des sondes testées ; le comportement des sondes étant différent entre les phases d'échauffement et de refroidissement. Une hystérésis de la réponse de TRPM8 et TRPV4 à des cycles de variation de température, mais également d'autres thermo-TRP comme TRPV1 ou TRPV3, a déjà été observée (Liu *et al*, 2011; Watanabe *et al*, 2002; Reid, 2005; Sánchez-Moreno *et al*, 2018). Selon ces études, ces hystérésis indiqueraient une désensibilisation (TRPV1, TRPV4, TRPM8) ou au contraire une sensibilisation (TRPV3) du canal étudié lorsqu'ils sont soumis à des cycles de température répétés (Liu *et al*, 2011).

Concernant TRPV4, il apparaît clairement que le signal de BRET maximal mesuré lors de la phase de refroidissement est moins élevé que lors de la phase d'échauffement qui lui précède, ce qui est en accord avec une désensibilisation du canal (Figure 64). Il est cependant

possible que cette apparente désensibilisation soit la conséquence de la fermeture du canal entre 46°C et 50°C. Il est possible que des cycles de variation de la température dans une plage de températures n'induisant pas la fermeture du canal (i.e. avec une température maximale inférieure à 46°C) puisse sensibiliser TRPV4 dans le mode d'activation thermique au lieu de le désensibiliser si la température maximale du cycle est supérieure à 46°C. Un tel comportement de sensibilisation par des variations répétées de la température a déjà été observé pour TRPV3 (Liu *et al*, 2011) et mérite plus d'attention concernant TRPV4.

Le fait que le signal de BRET de la sonde mNeonG-TRPA1-NLuc varie très fortement entre 7°C et 22°C lors de la phase de réchauffement subséquente à la phase de refroidissement initiale (en rouge sur la Figure 66A) suggère que cette première phase de refroidissement entraîne un décalage du seuil de sensibilité de TRPA1 vers des températures plus froides. La diminution progressive du signal de BRET qui suit entre 18°C et 40°C (en rouge sur Figure 66A) suggère une réouverture du canal, ce qui est à rapprocher de certains travaux qui indiquent que TRPA1 contribueraient à détecter la chaleur en plus du froid (Moparthi *et al*, 2016).

L'hystérésis du signal de TRPM8 en fonction du cycle de la température est moins prononcée que pour TRPA1 et TRPV4. Il en est de même pour la valeur maximale de la variation totale du BRET de cette sonde aux températures les plus basses testées. Il est possible que cette sonde soit moins réactive aux variations de température que celles réalisées pour TRPA1 et TRPV4.

Il est très certainement nécessaire de tester la sensibilité de cette sonde sur une plus grande plage de températures que celle utilisée dans le présent travail de doctorat. La vitesse à laquelle les variations de température sont réalisées pourrait également avoir un impact sur la réponse du canal. Une caractérisation plus profonde de ces sondes face aux variations thermiques semble indispensable.

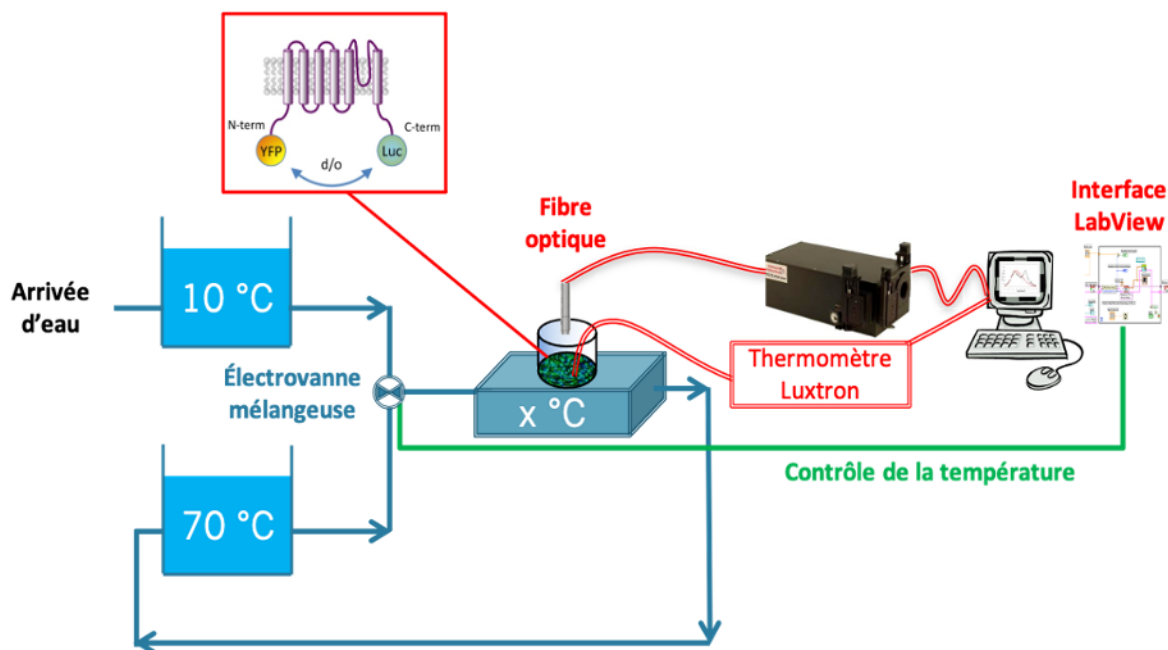
Pour mener ce projet plus loin, une fois ma thèse achevée, il serait en effet intéressant d'étudier l'impact des RF sur les hystérèses. Or, nous n'avons pas encore pleinement caractérisé ces réponses hystérétiques. Par exemple, nous ne savons pas encore si la forme de l'hystérèse va être impactée en fonction des extrema de températures choisis. De même pour la vitesse de montée/descente de la température.

### C- Développement d'un système de thermorégulation fluïdique finalisé pour mieux caractériser le comportement thermique des canaux thermo-TRP sur exposition RF

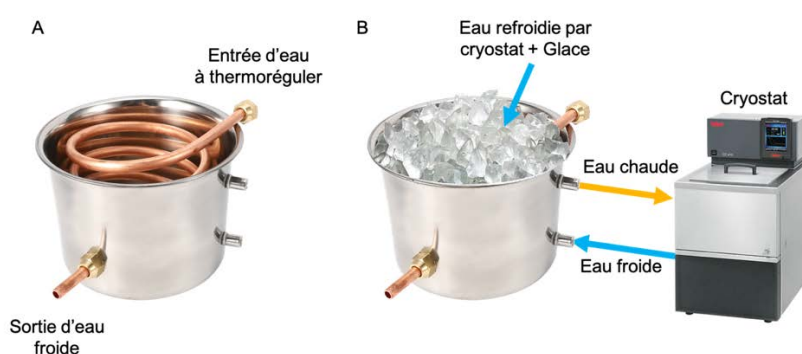
Le système utilisé dans les parties A et B de cette discussion est un système Peltier, c'est-à-dire un système de thermorégulation lent. Cette lenteur de réponse engendre des imprécisions dans le réglage de la température, notamment dans le cas d'un échauffement par les RF. Afin de pallier ce problème, nous avons mis au point un système de thermorégulation fluïdique beaucoup plus précis et rapide mais qui reste encore perfectible au moment de l'écriture de ce manuscrit. En effet, dans son état actuel, il est difficile de réaliser des expériences sur plusieurs minutes avec des températures inférieures à 20°C. Grâce à ce système, j'ai pu malgré tout initier la caractérisation de l'impact sur le comportement thermique de TRPV4 et TRPM8 de l'exposition RF à un signal 900 MHz non modulé à des DAS compris entre 0,37 W/kg et 30 W/kg dans des gammes de températures comprises entre 20 et 45°C. Nos résultats préliminaires semblent indiquer que le comportement thermique des canaux TRPV4 et TRPM8 n'est pas impacté par l'exposition RF quel que soit le DAS testé (Figure 69). Il conviendra toutefois de refaire ces expériences avec un système de thermorégulation fluïdique amélioré, et qui permettra de descendre en dessous de 20°C tout en maintenant une température stable aussi longtemps que nécessaire. Pour ce faire, nous allons :

- i) Échanger les 4 électrovannes régulant les flux d'eaux chaude et froide par une seule électrovanne mélangeuse à 3 voies, plus facile à piloter, en entrée de la cuve thermostatée placée sous la TEM (Figure 76),
- ii) Installer un chauffe-eau instantané (12 kW/h crête), en appui des thermoplongeurs, pour avoir un approvisionnement continu en eau chaude,
- iii) Installer un échangeur liquide/liquide permettant de refroidir l'eau de ville à environ 5°C en la faisant passer dans un tube de cuivre de 15m, enroulé sur lui-même, et qui est plongé dans un bac d'eau glacé dont la température est maintenue à l'aide d'un cryostat (Figure 77).





**Figure 76** – Représentation schématique du système de thermorégulation fluide composé de deux bacs de thermorégulation. Le bac d’eau chaude est représenté à 70°C et celui d’eau froide à 10°C pour exemple, mais ces températures sont modulables suivants les besoins de l’expérimentation. Ces deux liquides se mélangent dans une boîte fermée sur lequel reposent les cellules (cellules qui sont donc isolées du liquide caloporteur). Le mélange des eaux froide et chaude en différentes proportions permet d’obtenir la température désirée sous les cellules. Le mélange des liquides caloporteurs froid et chaud est régulé par un logiciel Labview qui contrôle l’ouverture d’une électrovanne mélangeuse en fonction de la consigne et des variations de température dans le milieu de culture des *cellules* (cf partie *Matériel* développé). Cette variation de température du milieu de culture est enregistrée par une sonde luxtron. La température du milieu et les signaux BRET sont analysés en temps réel à l’aide d’une interface labview, qui gère en retour l’ouverture de la vanne mélangeuse à l’aide d’un PID numérique.



**Figure 77** – Photos illustrant la version finale permettant d’obtenir de l’eau froide pour le système de thermorégulation. En A, on observe le serpentin de cuivre plongé dans une cuve. Ce serpentin fera transiter de l’eau refroidie jusqu’à la cuve de thermorégulation située sous les cellules. Il s’agit de l’eau froide qui sera mélangée à de l’eau chaude afin d’obtenir la température demandée par l’expérimentateur. En B, le serpentin de cuivre est plongé dans un bain glacé dont la température basse est maintenue par un cryostat.

Ce dispositif permettra notamment d'effectuer des expérimentations en cinétique à différentes températures d'intérêt maintenues fixes. Ces températures seront identifiées sur la base du comportement thermique des différents canaux lors des expériences de cyclage de la température du milieu de culture. Il conviendra de se placer à la température correspondant au seuil d'activation du canal, à sa  $T_{1/2}$ , et à la température d'activation maximale du canal étudié. Après l'obtention d'une ligne de base, la comparaison de l'impact des RF à température constante et à température non fixée sera étudiée tel que réalisé précédemment pour TRPV1 (Ruigrok *et al*, 2018), soit en laissant évoluer librement la température des échantillons. De cette manière, il sera possible de révéler un éventuel effet non thermique des RF sur l'activité des canaux TRP.

Enfin, nous avons constaté, à l'aide du système de thermorégulation fluide, qu'en augmentant la température plus rapidement que nous ne le faisons avec l'appareil Peltier, le plateau d'activation de TRPV4 n'était pas atteint à 47°C mais à 57°C (comparer Figure 64A et Figure 68). Cette observation reste à confirmer par de plus amples investigations et laisse entrevoir que la vitesse de changement de température pourrait impacter la signature du comportement thermique de nos sondes BRET ciblant les canaux thermo-TRP.

#### D- Caractérisation de la réponse des sondes BRET ciblant les canaux TRPA1, TRPM8 et TRPV4 en présence de ligands spécifiques des canaux étudiés à différentes températures

Les canaux thermo-TRP sont des canaux polymodaux, il est donc important de déterminer si les sondes intramoléculaires et intermoléculaires ciblant ces canaux rendent compte de l'activation de ce canal par d'autres modes d'activation comme des ligands. En utilisant un puissant agoniste de TRPV4, le GSK1016790A, nous avons pu montrer que les deux sondes répondent de manière dose-dépendante à cet agoniste avec des EC50 comparables, voir inférieurs à ceux retrouvés dans la littérature (Figure 70, Tableau 6, Thorneloe *et al*, 2008). Les antagonistes RN1734 et HC060747 permettent bien de diminuer la puissance de l'agoniste GSK101. Ces données suggèrent que les deux sondes peuvent effectivement rendre compte du mode chimique d'activation de TRPV4.

Il est intéressant de constater que l'augmentation de la température de 20°C à 40°C entraîne une amélioration de la puissance du GSK101 quelle que soit la sonde utilisée (Figure 70), suggérant effectivement l'existence d'un couplage synergique entre les modes

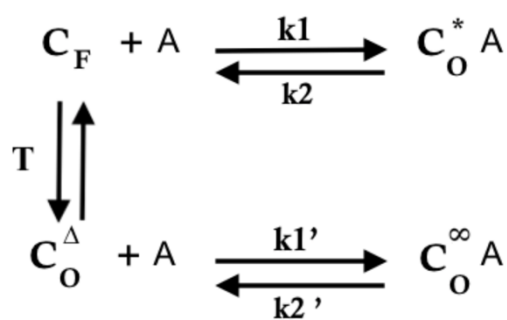
d'activation thermique et chimique de TRPV4 comme cela a été décrit pour TRPV1 et TRPM8 (Diaz-Franulic *et al*, 2016). Toutefois, il convient de distinguer l'effet de la température sur l'efficacité maximale du GSK101 avec chacune des deux sondes. Dans le cas de la sonde intermoléculaire, l'efficacité maximale du GSK101 diminue avec l'échauffement alors que le signal de base augmente fortement. C'est le contraire pour la sonde intramoléculaire pour laquelle l'efficacité maximale du GSK101 est exacerbée par la température malgré l'augmentation du BRET de base (Figure 70). Ces deux sondes étant censées mesurer des événements moléculaires distincts lors de l'activation de TRPV4, il serait spéculatif de se lancer dans l'analyse de cette apparente dichotomie. Toutefois, il apparaît clairement que pour chaque sonde le niveau de BRET maximum obtenu à 40°C en présence d'une quantité saturante d'agoniste excède celui obtenu avec chaque stimulus séparément. Ce résultat est également en accord avec l'existence d'une interaction synergique des modes thermique et chimique d'activation de TRPV4 tel que décrit dans pour TRPV1 et TRPM8 dans Matta & Ahern, 2007.

Nous avons donc pu montrer que l'agoniste GSK101 entraînait une augmentation dose-dépendante du signal de BRET mesuré avec ces sondes et que l'augmentation de la température a une action synergique sur la puissance et l'efficacité du GSK101. Dans le cas du canal sensible au froid TRPA1, nous retrouvons une synergie inverse cette fois. Les agonistes sont en effet inefficaces à entraîner une réponse de la sonde BRET ciblant TRPA1 à 15°C (Figure 73A), une température à laquelle le canal TRPA1 est normalement ouvert. Toutefois, les agonistes de TRPA1 entraînent une variation du signal de BRET de la sonde mNeonG-TRPA1-NLuc lorsque les cellules sont incubées à 37°C (Figure 73B). Cet effet est d'autant plus intéressant que les agonistes de TRPA1 entraînent une augmentation du signal de BRET alors que le refroidissement entraîne une diminution du signal de BRET.

Remarquons également sur la Figure 74, que les ligands agonistes spécifiques de TRPM8 font évoluer le BRET positivement à 37°C et négativement à 20°C. On constate également que l'EC50 de l'icilin est plus bas à 4°C qu'à 37°C tandis que l'EC50 du WS12 est plus élevé à 37°C. L'antagoniste spécifique semble également moins efficace à 20°C qu'à 37°C. Ces résultats suggèrent que les ligands agonistes stabilisent des états conformationnels différents à 20°C et à 37°C.

E- Proposition d'un modèle expliquant les réponses synergiques des canaux thermo-TRP en fonction des différentes stimulations

Les observations faites dans la partie précédente suggèrent (i) que différents modes d'activations (thermique ou chimique) stabilisent des états ouverts du canal qui sont conformationnellement distincts et (ii), que les agonistes utilisés pour activer TRPA1 ne peuvent agir que sur certains états conformationnels du canal stabilisé par la température. Ceci mène au modèle de la Figure 78 qui demande à être étayé et vérifié à l'aide de tests classiques de l'analyse des canaux TRP, tel que le patch-clamp ou en utilisant des sondes fluorescentes sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 78** – Hypothèse de modèle de liaison de ligand agoniste (A) avec les formes ouvertes (O) ou fermées (F) d'un canal TRP (C). La température (T) ou la liaison avec l'agoniste peuvent stabiliser des états conformationnels différents du canal ouvert. Les symboles \*, Δ et ∞ représentent les différentes conformations du canal ouvert.

Ce modèle appliqué à TRPA1, suggère notamment que les constantes d'équilibre de la réaction menant à l'ouverture du canal TRPA1, suite à la liaison des agonistes JT010 et Carvacrol, soient intimement liées à la température de l'essai (avec  $k_1 \gg k_1'$  pour TRPA1, en considérant que  $k_1$  est mesuré à 37°C et que  $k_1'$  est mesuré à 15°C).

Si ce modèle s'avère juste, des composés thérapeutiques pourraient avoir un impact physiologique différent suivant la température. L'importance de cette conclusion pourrait alors être crucial puisqu'on observe, par exemple, que le WS12 à son EC50 ne serait actif qu'à 37°C. Si des tests physiologiques venaient à confirmer cette expérimentation in-vitro, nous pourrions alors imaginer des thérapies dépendantes de la température. Cependant il est important de noter qu'aujourd'hui la majeure partie des tests pharmacologiques réalisés lors des campagnes de criblage de drogues ne sont effectués qu'à 25°C, ce qui peut largement biaiser ces campagnes de recherche de médicament car les composés ainsi identifiés à grands frais ne passeront pas ensuite la barrière des essais in-vivo.

## 5- Conclusions et perspectives

Cette thèse s'est déroulée durant la pandémie de COVID19. Cela implique plusieurs confinements de plusieurs mois, des interdictions d'accès au laboratoire, mais également des retards importants dans les livraisons de matériel. Pour ces raisons ce projet sur les canaux thermo-TRP, pourtant central dans ma thèse, a pris près d'un an de retard.

Durant ma thèse, j'ai pu montrer que les sondes BRET ciblant les canaux polymodaux TRPM8, TRPV4 et TRPA1 montrent une réponse thermique similaire à celle recensée dans la littérature avec d'autres techniques. Nous avons ensuite obtenu des résultats préliminaires qui semblent indiquer que les RF à 0,375, 1,5, 6 et 30 W/kg en CW à 900 MHz n'engendrent pas de décalage du seuil de sensibilité thermique des canaux, de leur  $T_{1/2}$ , ou de l'amplitude des changements de conformation avec la température. En ce qui concerne TRPM8 nous démontrons également qu'il n'y a pas d'impact des RF sur l'hystérèse, travaux qui demandent à être effectués sur TRPV4 également. Nous avons aussi montré une synergie entre la capacité de réponse des canaux TRPV4, TRPM8 et TRPA1 à un ligand spécifique et la réponse thermique. Ainsi la réponse du canal dépendant de l'activation préalable par un autre paramètre, il sera intéressant dans de prochaines études de voir si cette relation est modifiée en présence des RF.

De plus amples investigations sur les mécanismes d'activations thermiques restent cependant nécessaires pour pouvoir aller plus loin dans la recherche d'effets des RF sur les canaux TRP. Une fois le système de thermorégulation finalisé, il conviendra de reprendre la caractérisation du comportement thermique des sondes BRET intra- et/ou intermoléculaire en faisant varier différents paramètres expérimentaux qui peuvent impacter les résultats mesurés, comme notamment :

- i. Les variations de température subies par les échantillons avant d'effectuer les essais BRET,
- ii. La vitesse de modulation de la température,
- iii. Les températures minimales et maximales utilisées durant les cycles de variation de la température.

En effet, réaliser une courbe de cyclage de la température entre 20°C et 50°C sur une sonde BRET ciblant TRPV4 implique concrètement de déplacer des cellules incubées à 37°C et

de les placer dans notre dispositif de thermorégulation qui a été préréglé à 20°C. Ceci implique une première chute de température (de 37°C à 20°C), et le temps durant lequel les cellules restent à 20°C avant de subir un cyclage de la température peut varier sur plusieurs minutes d'une expérience à l'autre en fonction des aléas techniques inhérents au lancement de l'expérimentation elle-même.

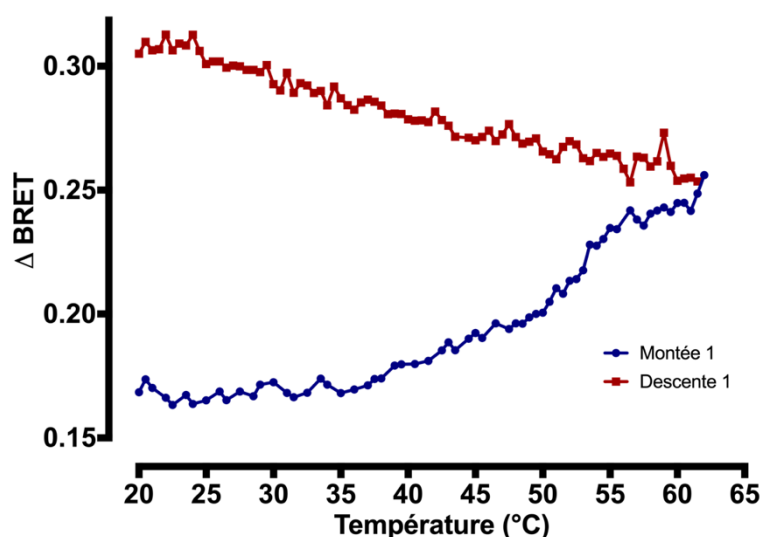
De même, lors de mes tests, suite à des erreurs de paramétrage du dispositif de thermorégulation, j'ai eu l'occasion de laisser mes cellules durant différents temps (jusqu'à 10 min) à différentes températures allant de 4°C à 50°C. Des cellules qui ne sont exposées que transitoirement (quelques secondes), même à des températures extrêmes (4°C ou 50°C par exemple), donneront les courbes classiques de variation des signaux BRET en fonction de la température. Ces courbes sont indiquées dans la partie résultat de ce manuscrit pour les sondes intramoléculaires ciblant TRPV4 et TRPM8. Si, en revanche, nous laissons les cellules transfectées avec mNeonG-TRPV4-NLuc à 4°C durant une dizaine de minutes, le seuil d'activation est alors décalé vers les plus hautes températures comme on peut le voir avec les résultats préliminaires Figure 80. Durant ces expériences, j'ai pu constater que l'hystérèse de la variation de BRET en fonction de la température est également différente pour la sonde intramoléculaire ciblant TRPV4. Dans le cas d'une incubation préliminaire à basse température pendant plusieurs minutes, le signal de BRET de la sonde intramoléculaire ciblant TRPV4 augmente de manière linéaire lors de la phase de refroidissement au lieu de revenir au niveau basal de BRET. Dans ces conditions expérimentales, il y a donc disparition de l'hystérèse, tout du moins sur la gamme de températures étudiée. Bien que ces résultats demandent à être reproduits avec rigueur, ils ouvrent potentiellement de nouvelles voies de recherches qui pourraient apporter un éclairage nouveau sur des phénomènes comme la variation de la sensibilité des canaux thermo-TRP suite à une exposition répétée à des variations de température (e.g. ,le phénomène de tachyphylaxie suite à une exposition répétée à des variations de températures (Rosenberger *et al*, 2020)).

Enfin, il est probable que, dans mes expériences, la forme des hystérèses mesurées soit également dépendante de la plage de températures balayées. Dans la courbe de la Figure 64 montrant l'évolution du signal de BRET de la sonde mNeonG-TRPV4-NLuc en fonction de la température, la phase de refroidissement intervient après que l'échantillon cellulaire ait atteint une température de 50°C. Or, dans cette expérience, nous avons observé une

diminution du signal de BRET à partir de 45°C. On peut alors s'interroger sur la forme qu'aurait pris l'hystérèse si la phase de refroidissement avait été déclenchée à 45°C ou même à une température inférieure. Enfin, pour le moment, nous n'avons testé qu'un seul cycle de variation de la température et il serait bien évidemment intéressant de caractériser le comportement de nos canaux durant plusieurs cycles.

Le dernier point concerne la vitesse de régulation de la température dont je conjecture qu'elle est d'importance pour la réponse des canaux thermo-TRP aux variations de température.

La pleine caractérisation de l'impact de ces différentes variables (temps d'incubation à une température donnée avant le cyclage de la température, plage de températures balayée, vitesse de la variation de la température durant le cyclage, et nombre de cycles étudiés) sur le comportement thermique des sondes ciblant les canaux thermo-TRP est à mon sens une étape qu'il est nécessaire de finaliser avant d'entamer plus avant l'exploration des effets potentiels de l'exposition radiofréquence sur le comportement thermique de ces canaux. Le cas échéant, l'exploration des mécanismes sous-jacents pourrait mener à mieux comprendre comment les canaux thermo-TRP ressentent la température.



**Figure 79** – Évolution du signal de BRET de la sonde intramoléculaire mNeon-TRPV4-NLuc lors de la variation de température après une incubation de 10 minutes à 4°C. On note une première élévation de température (Bleu), puis une première baisse de température (Rouge).

## VIII- Conclusions et perspectives

### 1- Conclusions des trois études

J'ai effectué, dans cette thèse, des études à différents niveaux du vivant. Pour être au plus proche de la physiologie cellulaire, ces études ont été réalisées sur cellules vivantes, en culture et à confluence. Pour n'écarter aucune piste de recherche, différents effets ont été recherchés que ce soit une altération de la survie, de la mortalité, de la différenciation, ou du stress ressenti. Nous n'avons trouvé aucun effet non thermique significatif des RF qui suivrait un effet-dose dépendant. Nous avons seulement trouvé une diminution significative du niveau basal de HSF sous exposition à 1 W/kg, mais cet effet disparaissant à 4 W/kg, il reste difficile à expliquer.

Nous avons également initié une étude portant sur des protéines activées de manière polymodale : les canaux thermo-TRP. Cette étude, bien que ne montrant pas d'effet des RF lors des tests préliminaires présentés, reste à compléter.

### 2- Impacts des RF sur l'eau liée aux macromolécules biologiques

Si l'on peut trouver dans la littérature des observations nous poussant à tester l'effet des RF sur certaines réponses cellulaires ou certains mécanismes biochimiques, comme cela a été le cas dans cette thèse, il n'en reste pas moins que la physique des champs électromagnétiques n'explique pas comment des champs radiofréquences émis à des niveaux inférieurs aux normes environnementales pourraient impacter le vivant. Toutes les hypothèses mécanistiques auxquelles les scientifiques ont pu penser induisent des effets trop faibles, noyés dans le bruit thermique (Sheppard et al, 2008a). Concrètement le seul mécanisme d'interaction des champs RF avec la matière vivante qui soit caractérisé par la physique est l'échauffement diélectrique, les champs électriques RF entraînant l'oscillation des dipôles électriques dans nos cellules et des pertes diélectriques sous forme de chaleur. Comme vu en introduction de ce manuscrit, le dipôle électrique ultra-majoritaire dans nos cellules est celui de la molécule d'eau. La mise en oscillation des molécules d'eau sous l'effet d'un champ électrique va dépendre de la permittivité diélectrique des molécules d'eau, laquelle diminue au-delà de 1 GHz pour les molécules d'eau dites libres. Par ailleurs, 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 (relaxation diélectrique) et une augmentation concomitante de la température du fait de pertes diélectriques. **Autrement dit, l'effet thermique induit par l'exposition aux fréquences RF environnementales dans les tissus n'est qu'une conséquence indirecte d'un mécanisme d'interaction non thermique lié à l'interaction du champ électrique RF avec les molécules d'eau libres de nos cellules (Figure 5).**

Il est particulièrement intéressant de remarquer que les spectres de permittivité diélectrique et des pertes diélectriques dépendent intimement de l'état physicochimique des molécules d'eau (Artemov, 2019; Artemov & Ouerdane, 2019; Colosi et al, 2013). Ces spectres sont, en effet, déplacés de 7 ordres de grandeur vers des fréquences plus basses lorsque l'eau est sous forme de glace, donc de cristal.

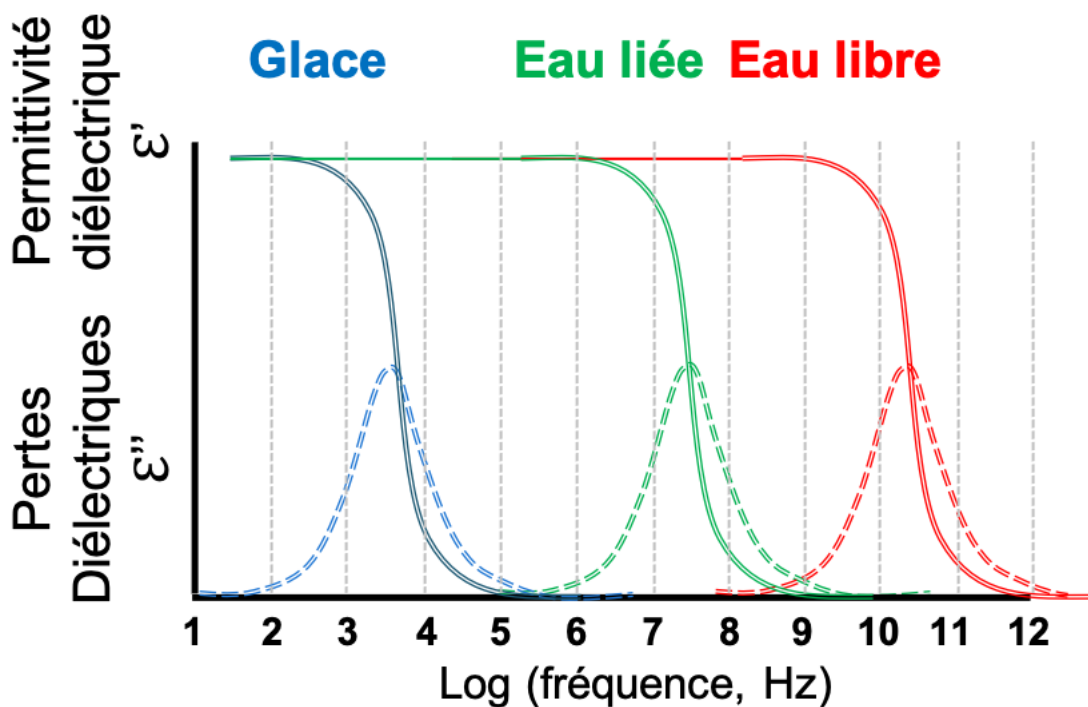
Depuis quelques années, l'importance de l'eau liée pour l'activité des protéines et la structuration des édifices biologiques est de plus en plus étudiée (Ball, 2008). Il a ainsi déjà été montré que les molécules d'eau liées à l'ADN possédaient une permittivité différente de celles des molécules d'eau dans d'autres états (Jones et al, 2022). De fait, on peut supposer que les spectres théoriques de permittivité diélectriques et de pertes diélectriques sont intermédiaires entre ceux de l'eau libre et de l'eau sous forme de glace. De rares études indiquent effectivement une diminution de la permittivité diélectrique de l'eau liée aux protéines aux alentours de 1 MHz et un pic de relaxation diélectrique aux alentours de 1-100 MHz (Miura et al, 1994)(Figure 80). Sachant que les molécules d'eau liées sont d'une importance critique pour la fonctionnalité des protéines (Privalov & Crane-Robinson, 2017), nous faisons l'hypothèse que les champs électriques oscillants pourraient avoir une action sur l'activité des protéines mais uniquement dans la partie basse des radiofréquences (soit entre 1 et 100 MHz) et uniquement en présence de champ électrique élevé. Ces champs électriques pourraient impacter l'activité des protéines de deux manières :

- En entraînant l'oscillation des molécules d'eau d'interface, ce qui se répercutera sur l'entropie du système protéine- eau liée considérée, des champs radiofréquences 1-100 MHz pourraient stabiliser des états conformationnels particuliers des protéines. Théoriquement, cela devrait tout particulièrement être vérifié dans le cas de protéines sensibles aux variations

de l'entropie de leur système, comme c'est justement le cas pour les canaux thermo-TRP (Jara-Oseguera & Islas, 2013).

- En provoquant des pertes diélectriques ciblées des molécules d'eau à l'interface avec un thermosenseur biologique, donc sensible aux variations de température dans son environnement immédiat. Là encore, les canaux thermo-TRP pourraient être impactés.

Du fait de la diminution théorique à la fois de la permittivité diélectrique et des pertes diélectriques des molécules d'eaux liées à des fréquences supérieures au GHz, quelle que soit l'hypothèse considérée, l'eau liée ne devrait pas être impactée lorsque les cellules vivantes sont soumises à des fréquences environnementales, à plus forte raison, à des DAS en dessous des normes en vigueur. Il apparaît ainsi intéressant de réaliser une spectroscopie de l'activité de protéines, comme les canaux thermo-TRP, dans la gamme 1-100 MHz avec des champs électriques de forte intensité.



**Figure 80** – Représentation de la permittivité et des pertes diélectriques de l'eau sous forme de glace (bleu), liée (vert, courbe théorique) ou liquide (rouge) en fonction de la fréquence du champ électromagnétique.

Trouver un effet non connu et non thermique des CEM sur les systèmes biologiques constituerait une avancée sanitaire majeure sur deux plans. Compte tenu de la rapidité d'évolution et de propagation des moyens de télécommunication cela permettrait bien sûr d'adapter les normes en vigueur. De plus parvenir à caractériser biologiquement puis physiquement un effet non-thermique des RF permettrait de l'utiliser dans des domaines tels que la médecine. L'identification d'un effet non-thermique des RF sur des mécanismes d'importance pour la cellule comme la prolifération cellulaire, le stress oxydatif, sur les voies métaboliques, ou sur certaines protéines comme les canaux TRP ouvrirait à n'en pas douter une nouvelle avenue de recherche à l'interface physique / biologie où l'on pourrait imaginer intervenir à distance sur la matière vivante. Cela pourrait permettre d'endiguer certains cancers sans interventions chirurgicales. Nous pourrions potentiellement traiter des dysfonctionnements métaboliques sans composés chimiques. Caractériser ce type d'effets biologiques des CEM permettrait d'ouvrir un nouveau chapitre de la radiothérapie n'ayant pas recours à des rayonnements ionisants.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## Bibliographie

### A

Abane R & Mezger V (2010) Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J* 277: 4150–4172

Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE & Rosner MR (2001) ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* 276: 21272–21279

Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB & Rosner MR (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* 19: 1301–1312

Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM & Rosner MR (2002) ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 277: 16733–16743

ACGIH Worldwide (1996) TLVs and BEIs : threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices ACGIH Worldwide, Cincinnati, OH et ©1996. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

Adair ER & Adams BW (1980) Microwaves modify thermoregulatory behavior in squirrel monkey. *Bioelectromagnetics* 1: 1–20

Adair ER, Adams BW & Akel GM (1984) Minimal changes in hypothalamic temperature accompany microwave-induced alteration of thermoregulatory behavior. *Bioelectromagnetics* 5: 13–30

Adapala RK, Thoppil RJ, Luther DJ, Paruchuri S, Meszaros JG, Chilian WM & Thodeti CK (2013) TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *J Mol Cell Cardiol* 54: 45–52

Agathokleous E & Calabrese EJ (2022) Hormesis: A General Biological Principle. *Chem Res Toxicol* 35: 547–549

Aird EJ, Tompkins KJ & Gordon WR (2019) An enhanced molecular tension sensor based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET) Cell Biology

Aït-Aïssa S, de Gannes FP, Taxile M, Billaudel B, Hurtier A, Haro E, Ruffié G, Athané A, Veyret B & Lagroye I (2013) In situ expression of heat-shock proteins and 3-nitrotyrosine in brains of young rats exposed to a WiFi signal in utero and in early life. *Radiat Res* 179: 707–16

Akerfelt M, Morimoto RI & Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 545–55

Åkerfelt M, Morimoto RI & Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 545–555

Akerfelt M, Trouillet D, Mezger V & Sistonen L (2007) Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann N Y Acad Sci* 1113: 15–27

Alastalo T-P, Hellesuo M, Sandqvist A, Hietakangas V, Kallio M & Sistonen L (2003) Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J Cell Sci* 116: 3557–3570

Albert EN, Slaby F, Roche J & Loftus J (1987) Effect of amplitude-modulated 147 MHz radiofrequency radiation on calcium ion efflux from avian brain tissue. *Radiat Res* 109: 19–27

Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling D & Levine JD (2006) A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26: 3864–3874

Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, Reichling DB & Levine JD (2003) Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 39: 497–511

Alm K, El-Schich Z, Falck M, Gjrloff Wingren A, Janicke B & Oredsson S (2013) Cells and Holograms – Holograms and Digital Holographic Microscopy as a Tool to Study the Morphology of Living Cells. In *Holography - Basic Principles and Contemporary Applications*, Mihaylova E (ed) InTech

Aly A & Picket-May M (2014) FDTD Computation for Sar Induced in Human Head Due to Exposure to EMF from Mobile Phone. *Adv Comput Int J* 5: 01–12

Amaddii M, Meister M, Banning A, Tomasovic A, Mooz J, Rajalingam K & Tikkanen R (2012) Flotillin-1/Reggie-2 Protein Plays Dual Role in Activation of Receptor-tyrosine Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. *J Biol Chem* 287: 7265–7278

Amici C, Sistonen L, Santoro MG & Morimoto RI (1992) Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6227–6231

Amin J, Ananthan J & Voellmy R (1988) Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* 8: 3761–3769

Amirkavei M, Plastino F, Kvantta A, Kaarniranta K, André H & Koskelainen A (2022) Hormetic Heat Shock Enhances Autophagy through HSF1 in Retinal Pigment Epithelium Cells. *Cells* 11: 1778

Anckar J & Sistonen L (2011) Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. *Annu Rev Biochem* 80: 1089–1115

Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, Bucher B, Galzi J-L, Sterner O, Bevan S, *et al* (2011) TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid  $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Nat Commun* 2: 551

Andersson DA, Gentry C, Light E, Vastani N, Vallortigara J, Bierhaus A, Fleming T & Bevan S (2013) Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1. *PLoS One* 8: e77986

Andryieuski A, Kuznetsova S, Zhukovsky S, Kivshar Y & Lavrinenko A (2015) Water: Promising Opportunities For Tunable All-dielectric Electromagnetic Metamaterials. *Sci Rep* 5: 13535

ANSES (2018) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une analyse des rapports provisoires de l'étude du National Toxicology Program américain sur l'exposition animale à des radiofréquences.

Arendash GW, Mori T, Dorsey M, Gonzalez R, Tajiri N & Borlongan C (2012) Electromagnetic Treatment to Old Alzheimer's Mice Reverses  $\beta$ -Amyloid Deposition, Modifies Cerebral Blood Flow, and Provides Selected Cognitive Benefit. *PLOS ONE* 7: e35751

Arendash GW, Sanchez-Ramos J, Mori T, Mamcarz M, Lin X, Runfeldt M, Wang L, Zhang G, Sava V, Tan J, *et al* (2010) Electromagnetic Field Treatment Protects Against and Reverses Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease Mice. *J Alzheimers Dis* 19: 191–210

ARPANSA (2019) ARPANSA reviews animal study on radiofrequency exposure and health | ARPANSA.

ARPEGE (2016) Système label-free xCELLigence.

Artemov V & Ouerdane H (2019) Dynamical Properties of Ice and Water: A Broadband Dielectric Spectroscopy Study. *Proceedings* 26: 8

Artemov VG (2019) A unified mechanism for ice and water electrical conductivity from direct current to terahertz. *Phys Chem Chem Phys* 21: 8067–8072

- Arts R, Aper SJA & Merckx M (2017) Engineering BRET-Sensor Proteins. In *Methods in Enzymology* pp 87–114. Elsevier
- Ascoli CA & Maul GG (1991) Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 112: 785–795
- Ashkenazi A & Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305–1308
- Australia C (2014) Abnormal cell proliferation.

## B

- Baillie G, MacKenzie SJ & Houslay MD (2001) Phorbol 12-myristate 13-acetate triggers the protein kinase A-mediated phosphorylation and activation of the PDE4D5 cAMP phosphodiesterase in human aortic smooth muscle cells through a route involving extracellular signal regulated kinase (ERK). *Mol Pharmacol* 60: 1100–1111
- Baird NA, Turnbull DW & Johnson EA (2006) Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 281: 38675–38681
- Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, *et al* (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280: 26729–26734
- Ball P (2008) Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chem Rev* 108: 74–108
- Balvan J, Krizova A, Gumulec J, Raudenska M, Sladek Z, Sedlackova M, Babula P, Sztalmachova M, Kizek R, Chmelik R, *et al* (2015) Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis. *PLOS ONE* 10: e0121674
- Bandyopadhyay U & Cuervo AM (2008) Entering the lysosome through a transient gate by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 4: 1101–1103
- Banning A, Ockenga W, Finger F, Siebrasse P & Tikkanen R (2012) Transcriptional Regulation of Flotillins by the Extracellularly Regulated Kinases and Retinoid X Receptor Complexes. *PLoS ONE* 7: e45514
- Barbeau S, Joushomme A, Chappe Y, Cardouat G, Baudrimont I, Freund-Michel V, Guibert C, Marthan R, Berger P, Vacher P, *et al* (2022) Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia. *Biomolecules* 12: 954
- Barkla DH & Gibson PR (1999) The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology (Phila)* 31: 230–238
- Barna J, Csermely P & Vellai T (2018) Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell Mol Life Sci* 75: 2897–2916
- Barnes FS & Greenebaum B eds. (2007) Handbook of biological effects of electromagnetic fields. Biological and medical aspects of electromagnetic fields 3rd ed. Boca Raton: CRC Press
- Barroso MM (2011) Quantum Dots in Cell Biology. *J Histochem Cytochem* 59: 237–251
- Bautista DM, Pellegrino M & Tsunozaki M (2013) TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. *Annu Rev Physiol* 75: 181–200
- Bawin SM & Adey WR (1976) Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency. *Proc Natl Acad Sci* 73: 1999–2003



- Bawin SM, Adey WR & Sabbot IM (1978) Ionic factors in release of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  from chicken cerebral tissue by electromagnetic fields. *Proc Natl Acad Sci* 75: 6314–6318
- Bawin SM, Kaczmarek LK & Adey WR (1975) Effects of Modulated Vhf Fields on the Central Nervous System\*. *Ann N Y Acad Sci* 247: 74–81
- Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R & Becker J (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280: 275–286
- Beech SJ, Lethbridge KJ, Killick N, McGlincy N & Leppard KN (2005) Isoforms of the promyelocytic leukemia protein differ in their effects on ND10 organization. *Exp Cell Res* 307: 109–117
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysségur J & Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29: 2570–2581
- Belvisi MG, Dubuis E & Birrell MA (2011) Transient Receptor Potential A1 Channels. *Chest* 140: 1040–1047
- Bennett V & Stenbuck PJ (1979) Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J Biol Chem* 254: 2533–2541
- Bernardi R & Pandolfi PP (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 1006–1016
- Bernardi R, Papa A & Pandolfi PP (2008) Regulation of apoptosis by PML and the PML-NBs. *Oncogene* 27: 6299–6312
- Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH & Pandolfi PP (2004) PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 6: 665–672
- BFS (2019) Fachliche Stellungnahme des BfS zu den Ergebnissen der NTP-Studie. *Bundesamt Für Strahlenschutz*
- Bharate SS & Bharate SB (2012) Modulation of Thermoreceptor TRPM8 by Cooling Compounds. *ACS Chem Neurosci* 3: 248–267
- Birder L, Kullmann FA, Lee H, Barrick S, de Groat W, Kanai A & Caterina M (2007) Activation of urothelial transient receptor potential vanilloid 4 by 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate contributes to altered bladder reflexes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 227–235
- Bischof O, Kim S-H, Irving J, Beresten S, Ellis NA & Campisi J (2001) Regulation and Localization of the Bloom Syndrome Protein in Response to DNA Damage. *J Cell Biol* 153: 367–380
- Bischof O, Kirsh O, Pearson M, Itahana K, Pelicci PG & Dejean A (2002) Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J* 21: 3358–3369
- Björk JK & Sistonen L (2010) Regulation of the members of the mammalian heat shock factor family. *FEBS J* 277: 4126–4139
- Blackman CF, Elder JA, Weil CM, Benane SG, Eichinger DC & House DE (1979) Induction of calcium-ion efflux from brain tissue by radio-frequency radiation: Effects of modulation frequency and field strength. *Radio Sci* 14: 93–98
- Blondel D, Regad T, Poisson N, Pavie B, Harper F, Pandolfi PP, de Thé H & Chelbi-Alix MK (2002) Rabies virus P and small P products interact directly with PML and reorganize PML nuclear bodies. *Oncogene*
- Bödding M, Wissenbach U & Flockerzi V (2007) Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell Calcium* 42: 618–28

Boellmann F, Guettouche T, Guo Y, Fenna M, Mnayer L & Voellmy R (2004) DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4100–4105

Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH & Owerbach D (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279: 27233–27238

Bonilla WV, Pinschewer DD, Klenerman P, Rousson V, Gaboli M, Pandolfi PP, Zinkernagel RM, Salvato MS & Hengartner H (2002) Effects of promyelocytic leukemia protein on virus-host balance. *J Virol* 76: 3810–3818

Bonner JJ, Ballou C & Fackenthal DL (1994) Interactions between DNA-bound trimers of the yeast heat shock factor. *Mol Cell Biol* 14: 501–508

Borden KL, Campbelldwyer EJ, Carlile GW, Djavani M & Salvato MS (1998) Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* 72: 3819–3826

Borroto-Escuela DO, Flajolet M, Agnati LF, Greengard P & Fuxe K (2013) BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (BRET) METHODS TO STUDY G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR - RECEPTOR TYROSINE KINASE HETERORECEPTOR COMPLEXES. *Methods Cell Biol* 117: 141–164

Boucherat O, Nadeau V, Bérubé-Simard F-A, Charron J & Jeannotte L (2014) Crucial requirement of ERK/MAPK signaling in respiratory tract development. *Dev Camb Engl* 141: 3197–3211

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH & Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65: 663–675

Bourthoumieu S, Magnaudeix A, Terro F, Leveque P, Collin A & Yardin C (2013) Study of p53 expression and post-transcriptional modifications after GSM-900 radiofrequency exposure of human amniotic cells. *Bioelectromagnetics* 34: 52–60

Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, *et al* (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 25: 1025–1040

Brauchi S, Orio P & 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

Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, Rosenmann E, Gonzalez-Nilo F & Latorre R (2007) Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci* 104: 10246–10251

Brose N & Rosenmund C (2002) Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* 115: 4399–4411

Brott BK, Pinsky BA & Erikson RL (1998) Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 963–968

Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A, Joly AL, Bossis G, Fourmaux E, Bouchot A, Landry J, Piechaczyk M & Garrido C (2009) Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* 28: 3332–3344

Buday L & Downward J (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611–620

Buscà R, Pouysségur J & Lenormand P (2016) ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol* 4

Buschbeck M, Uribealago I, Ledl A, Gutierrez A, Minucci S, Muller S & Di Croce L (2007) PML4 induces differentiation by Myc destabilization. *Oncogene* 26: 3415–3422

Buttiglione M, Roca L, Montemurno E, Vitiello F, Capozzi V & Cibelli G (2007a) Radiofrequency radiation (900 MHz) induces Egr-1 gene expression and affects cell-cycle control in human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 213: 759–67

Buttiglione M, Roca L, Montemurno E, Vitiello F, Capozzi V & Cibelli G (2007b) Radiofrequency radiation (900 MHz) induces Egr-1 gene expression and affects cell-cycle control in human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 213: 759–767

Byus CV, Lundak RL, Fletcher RM & Adey WR (1984) Alterations in protein kinase activity following exposure of cultured human lymphocytes to modulated microwave fields. *Bioelectromagnetics* 5: 341–351

## C

Cagnol S & Chambard J-C (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277: 2–21

Cain K (2003) Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev* 35: 337–363

Calabrese EJ (2008) HORMESIS: WHY IT IS IMPORTANT TO TOXICOLOGY AND TOXICOLOGISTS. *Environ Toxicol Chem* 27: 1451

Calabrese EJ (2013) Hormetic mechanisms. *Crit Rev Toxicol* 43: 580–606

Calderwood SK, Xie Y, Wang X, Khaleque MA, Chou SD, Murshid A, Prince T & Zhang Y (2010) Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. *Signal Transduct Insights* 2: 13–24

Campagna M, Herranz D, Garcia MA, Marcos-Villar L, González-Santamaría J, Gallego P, Gutierrez S, Collado M, Serrano M, Esteban M, *et al* (2011) SIRT1 stabilizes PML promoting its sumoylation. *Cell Death Differ* 18: 72–79

Campisi A, Gulino M, Acquaviva R, Bellia P, Raciti G, Grasso R, Musumeci F, Vanella A & Triglia A (2010) Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field. *Neurosci Lett* 473: 52–55

Capolongo G, Suzumoto Y, D’Acierno M, Simeoni M, Capasso G & Zacchia M (2019) ERK1,2 Signalling Pathway along the Nephron and Its Role in Acid-base and Electrolytes Balance. *Int J Mol Sci* 20: 4153

Caraglia M, Marra M, Mancinelli F, D’Ambrosio G, Massa R, Giordano A, Budillon A, Abbruzzese A & Bismuto E (2005) Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. *J Cell Physiol* 204: 539–48

Cardullo RA (2013) Theoretical principles and practical considerations for fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods Cell Biol* 114: 441–456

Carracedo A, Rousseau D, Douris N, Fernández-Ruiz S, Martín-Martín N, Weiss D, Webster K, Adams AC, Vazquez-Chantada M, Martínez-Chantar ML, *et al* (2015) The promyelocytic leukemia protein is upregulated in conditions of obesity and liver steatosis. *Int J Biol Sci* 11: 629–632

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U & Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847–7851

Castillo K, Diaz-Franulic I, Canan J, Gonzalez-Nilo F & Latorre R (2018) Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection. *Phys Biol* 15: 021001

Cellular Impedance | Agilent

Cenac N, Altier C, Motta J-P, d'Aldebert E, Galeano S, Zamponi GW & Vergnolle N (2010) Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut* 59: 481–488

Challis LJ (2005) Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissue. *Bioelectromagnetics* 26: S98–S106

Chandrasekaran S, Ramanathan S & Basak T (2013) Microwave food processing—A review. *Food Res Int* 52: 243–261

Chang FTM, McGhie JD, Chan FL, Tang MC, Anderson MA, Mann JR, Andy Choo KH & Wong LH (2013) PML bodies provide an important platform for the maintenance of telomeric chromatin integrity in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 41: 4447–4458

Chappe Y, Michel P, Joushomme A, Barbeau S, Pierredon S, Baron L, Garenne A, Poullietier De Gannes F, Hurtier A, Mayer S, *et al* (2021) High-Throughput Screening of TRPV1 Ligands in the Light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer Technique. *Mol Pharmacol* 100: 237–257

Chappe YL (2022) Genetically-encoded BRET probes enlight ligand bias-induced variable ion selectivity in TRPV1 and P2X5/7. *PNAS Sous Presse*

Chatterjee I, Wu D & Gandhi OP (1986) Human Body Impedance and Threshold Currents for Perception and Pain for Contact Hazard Analysis in the VLF-MF Band. *IEEE Trans Biomed Eng* BME-33: 486–494

Chaudhury S, Bal M, Belugin S, Shapiro MS & Jeske NA (2011) AKAP150-Mediated TRPV1 Sensitization is Disrupted by Calcium/Calmodulin. *Mol Pain* 7: 1744-8069-7–34

Chávez-Santiago R, Szydeko M, Kliks A, Foukalas F, Haddad Y, Nolan KE, Kelly MY, Masonta MT & Balasingham I (2015) 5G: The Convergence of Wireless Communications. *Wirel Commun* 83: 1617–1642

Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, Koken MH, Venturini L, Stadler M, Pavlovic J, Degos L & de Thé H (1995) Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9: 2027–2033

Chen C, Ma Q, Liu C, Deng P, Zhu G, Zhang L, He M, Lu Y, Duan W, Pei L, *et al* (2014a) Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells. *Sci Rep* 4: 5103

Chen C, Ma Q, Liu C, Deng P, Zhu G, Zhang L, He M, Lu Y, Duan W, Pei L, *et al* (2015a) Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells. *Sci Rep* 4: 5103

Chen J & Kym PR (2009) TRPA1: the species difference. *J Gen Physiol* 133: 623–625

Chen L, Kaßmann M, Sendeski M, Tsvetkov D, Marko L, Michalick L, Riehle M, Liedtke WB, Kuebler WM, Harteneck C, *et al* (2015b) Functional transient receptor potential vanilloid

1 and transient receptor potential vanilloid 4 channels along different segments of the renal vasculature. *Acta Physiol Oxf Engl* 213: 481–491

Chen Y, Kanju P, Fang Q, Lee SH, Parekh PK, Lee W, Moore C, Brenner D, Gereau RW, Wang F, *et al* (2014b) TRPV4 is necessary for trigeminal irritant pain and functions as a cellular formalin receptor. *Pain* 155: 2662–2672

Chen Y, Williams SH, McNulty AL, Hong JH, Lee SH, Rothfusz NE, Parekh PK, Moore C, Gereau RW, Taylor AB, *et al* (2013) Temporomandibular joint pain: a critical role for Trpv4 in the trigeminal ganglion. *Pain* 154: 1295–1304

Cheng X & Kao H-Y (2012) Post-translational modifications of PML: consequences and implications. *Front Oncol* 2: 210

Cheng X, Liu Y, Chu H & Kao H-Y (2012) Promyelocytic leukemia protein (PML) regulates endothelial cell network formation and migration in response to tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ). *J Biol Chem* 287: 23356–23367

Cheshire WP (2016) Thermoregulatory disorders and illness related to heat and cold stress. *Auton Neurosci* 196: 91–104

Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP & Dice JF (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246: 382–385

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M & Chan FK-M (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137: 1112–1123

Choi J, Min K, Jeon S, Kim N, Pack J-K & Song K (2020) Continuous Exposure to 1.7 GHz LTE Electromagnetic Fields Increases Intracellular Reactive Oxygen Species to Decrease Human Cell Proliferation and Induce Senescence. *Sci Rep* 10: 9238

Choi KW & Benzer S (1994) Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell* 78: 125–136

Chou S-D, Prince T, Gong J & Calderwood SK (2012) mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. *PLoS One* 7: e39679

Christensen AP, Akyuz N & Corey DP (2016) The Outer Pore and Selectivity Filter of TRPA1. *PLoS One* 11: e0166167

Christofferson DE, Li Y & Yuan J (2014) Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annu Rev Physiol* 76: 129–150

Chu B, Zhong R, Soncin F, Stevenson MA & Calderwood SK (1998) Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J Biol Chem* 273: 18640–18646

Chuang Y-S, Huang W-H, Park SW, Persaud SD, Hung C-H, Ho P-C & Wei L-N (2011) Promyelocytic leukemia protein in retinoic acid-induced chromatin remodeling of Oct4 gene promoter. *Stem Cells Dayt Ohio* 29: 660–669

Cimpan MR, Mordal T, Schölermann J, Allouni ZE, Pliquett U & Cimpan E (2013) An impedance-based high-throughput method for evaluating the cytotoxicity of nanoparticles. *J Phys Conf Ser* 429: 012026

Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517–524

Clark-Lewis I, Sanghera JS & Pelech SL (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* 266: 15180–15184

- Clavel D, Gotthard G, von Stetten D, De Sanctis D, Pasquier H, Lambert GG, Shaner NC & Royant A (2016) Structural analysis of the bright monomeric yellow-green fluorescent protein mNeonGreen obtained by directed evolution. *Acta Crystallogr Sect Struct Biol* 72: 1298–1307
- Colicelli J (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2004: RE13
- Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, Fumagalli M, Carlino C, Corsetto PA, Scaccabarozzi D, *et al* (2017) HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017: 1–12
- Colosi C, Costantini M, Barbetta A, Cametti C & Dentini M (2013) Anomalous Debye-like dielectric relaxation of water in micro-sized confined polymeric systems. *Phys Chem Chem Phys* 15: 20153–20160
- Commissioner O of the (2020) Statement from Jeffrey Shuren, M.D., J.D., Director of the FDA's Center for Devices and Radiological Health on the National Toxicology Program's report on radiofrequency energy exposure. *FDA*
- Conde R, Belak ZR, Nair M, O'Carroll RF & Ovsenek N (2009) Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 87: 845–851
- Condemine W, Takahashi Y, Le Bras M & de Thé H (2007) A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *J Cell Sci* 120: 3219–3227
- Condemine W, Takahashi Y, Zhu J, Puvion-Dutilleul F, Guegan S, Janin A & de Thé H (2006) Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* 66: 6192–6198
- Coquoz O, Depeursinge C, Conde R & Taleblou F (1992) Numerical reconstruction of images from endoscopic holograms. In *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* pp 338–339. Paris, France: IEEE
- Coulombe P & Meloche S (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1773: 1376–1387
- Cridland NA (1993) Electromagnetic fields and cancer: a review of relevant cellular studies United Kingdom
- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z & Nardai G (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79: 129–168
- Cuche E, Bevilacqua F & Depeursinge C (1999a) Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Opt Lett* 24: 291–293
- Cuche E, Marquet P & Depeursinge C (1999b) Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl Opt* 38: 6994–7001
- Cuenda A & Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358–1375
- Curet S (2019) Procédés de chauffage par micro-ondes : approches expérimentales et numériques des interactions avec les produits alimentaires
- Czar MJ, Welsh MJ & Pratt WB (1996) Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 70: 322–330

## D

Daams R & Massoumi R (2020) Nemo-Like Kinase in Development and Diseases: Insights from Mouse Studies. *Int J Mol Sci* 21: 9203

Dai J, Kim O-H, Cho T-J, Schmidt-Rimpler M, Tonoki H, Takikawa K, Haga N, Miyoshi K, Kitoh H, Yoo W-J, *et al* (2010) Novel and recurrent TRPV4 mutations and their association with distinct phenotypes within the TRPV4 dysplasia family. *J Med Genet* 47: 704–709

Dale NC, Johnstone EKM, White CW & Pflieger KDG (2019) NanoBRET: The Bright Future of Proximity-Based Assays. *Front Bioeng Biotechnol* 7

Dale RE, Eisinger J & Blumberg WE (1979) The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* 26: 161–193

D'Andrea JA, DeWitt JR, Gandhi OP, Stensaas S, Lords JL & Nielson HC (1986) Behavioral and physiological effects of chronic 2,450-MHz microwave irradiation of the rat at 0.5 mW/cm<sup>2</sup>. *Bioelectromagnetics* 7: 45–56

Dasgupta S, Leong C, Simonich MT, Truong L, Liu H & Tanguay RL (2022) Transcriptomic and Long-Term Behavioral Deficits Associated with Developmental 3.5 GHz Radiofrequency Radiation Exposures in Zebrafish. *Environ Sci Technol Lett* 9: 327–332

Dasgupta S, Wang G, Simonich MT, Zhang T, Truong L, Liu H & Tanguay RL (2020) Impacts of high dose 3.5 GHz cellphone radiofrequency on zebrafish embryonic development. *PLOS ONE* 15: e0235869

Daverkausen-Fischer L & Pröls F (2022) Regulation of calcium homeostasis and flux between the endoplasmic reticulum and the cytosol. *J Biol Chem* 298

Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268: 14553–14556

De, A., Arora, R., Jasani, A. (2014). Engineering Aspects of Bioluminescence Resonance Energy Transfer Systems. In: Cai, W. (eds) Engineering in Translational Medicine. Springer, London. [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4372-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4372-7_10)

De A, Ray P, Loening AM & Gambhir SS (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

De Hert S (2012) Physiology of hemodynamic homeostasis. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 26: 409–419

De Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS, Aviello G, Stott C, Izzo AA & Di Marzo V (2012) Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol Oxf Engl* 204: 255–266

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA & Yuan J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1: 112–119

Dehnavi S, Sadeghi M, Penson PE, Banach M, Jamialahmadi T & Sahebkar A (2019) The Role of Protein SUMOylation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Clin Med* 8: 1856

Delbarre E, Ivanauskiene K, Spirkoski J, Shah A, Vekterud K, Moskaug JØ, Bøe SO, Wong LH, Küntziger T & Collas P (2017) PML protein organizes heterochromatin domains where it regulates histone H3.3 deposition by ATRX/DAXX. *Genome Res* 27: 913–921

Dellaire G & Bazett-Jones DP (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 26: 963–977

Dellaire G, Eskiw CH, Dehghani H, Ching RW & Bazett-Jones DP (2006) Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *J Cell Sci* 119: 1034–1042

Denadai-Souza A, Martin L, de Paula MAV, de Avellar MCW, Muscará MN, Vergnolle N & Cenac N (2012) Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. *Arthritis Rheum* 64: 1848–1858

Denouel-Galy A, Douville EM, Warne PH, Papin C, Laugier D, Calothy G, Downward J & Eychène A (1998) Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol CB* 8: 46–55

Dhaka A, Viswanath V & Patapoutian A (2006) Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29: 135–61

Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H & Reddy EP (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 26: 3185–3202

Diaz-Franulic I, Poblete H, Miño-Galaz G, González C & Latorre R (2016) Allosterism and Structure in Thermally Activated Transient Receptor Potential Channels. *Annu Rev Biophys* 45: 371–398

Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 11–22

Ducret T, Guibert C, Marthan R & Savineau J-PP (2008) Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* 43: 315–23

Dunn A & Richards-Kortum R (1996) Three-dimensional computation of light scattering from cells. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2: 898–905

Duprez E, Saurin AJ, Desterro JM, Lallemand-Breitenbach V, Howe K, Boddy MN, Solomon E, de Thé H, Hay RT & Freemont PS (1999) SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 3): 381–393

## E

Eberhardt M, Dux M, Namer B, Miljkovic J, Cordasic N, Will C, Kichko TI, de la Roche J, Fischer M, Suárez SA, *et al* (2014) H2S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun* 5: 4381

Eberhardt MJ, Filipovic MR, Leffler A, de la Roche J, Kistner K, Fischer MJ, Fleming T, Zimmermann K, Ivanovic-Burmazovic I, Nawroth PP, *et al* (2012) Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies. *J Biol Chem* 287: 28291–28306

Editors BD (2017) Apoptosis: Definition, Pathway, Examples and Quiz. *Biol Dict*

Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516

EMF-Portal | Radio frequency (10 MHz–300 GHz)

England CG, Ehlerding EB & Cai W (2016) NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem* 27: 1175–1187

Engler C, Kandzia R & Marillonnet S (2008) A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE* 3: e3647

English L, Chemali M & Desjardins M (2009) Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. *Autophagy* 5: 1026–1029



Ennamany R, Fitoussi R, Vie K, Rambert J, De Benetti L & Djavad Mossalayi M (2008) Exposure to Electromagnetic Radiation Induces Characteristic Stress Response in Human Epidermis. *J Invest Dermatol* 128: 743–746

Eskelinen E-L (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 1: 1–10

Esmekaya MA, Seyhan N, Kayhan H, Tuysuz MZ, Kurşun AC & Yağcı M (2013) Investigation of the Effects of 2.1 GHz Microwave Radiation on Mitochondrial Membrane Potential ( $\Delta\Psi_m$ ), Apoptotic Activity and Cell Viability in Human Breast Fibroblast Cells. *Cell Biochem Biophys* 67: 1371–1378

Everett RD & Chelbi-Alix MK (2007) PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89: 819–830

Evidence TRPV4 contributes to mechanosensitive ion channels in mouse skeletal muscle fibers - PubMed

## F

Fang JY & Richardson BC (2005) The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6: 322–327

Faouzi M & Penner R (2014) TRPM2. In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I*, Nilius B & Flockerzi V (eds) pp 403–426. Berlin, Heidelberg: Springer

Farinas J & Verkman AS (1996) Cell volume and plasma membrane osmotic water permeability in epithelial cell layers measured by interferometry. *Biophys J* 71: 3511–3522

Fernandes M, Xiao H & Lis JT (1994) Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor - heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* 22: 167–173

Fiorenza MT, Farkas T, Dissing M, Kolding D & Zimarino V (1995) Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res* 23: 467–474

Fischer AM, Katayama CD, Pagès G, Pouysségur J & Hedrick SM (2005) The Role of Erk1 and Erk2 in Multiple Stages of T Cell Development. *Immunity* 23: 431–443

Flora SJS (2011) Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 51: 257–281

Fogal V, Gostissa M, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi PP, Will H, Schneider C & Del Sal G (2000) Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* 19: 6185–6195

Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz (Intermolecular energy migration and fluorescence). *Ann Phys* 2: 55–75

Foster KR & Glaser R (2007) Thermal mechanisms of interaction of radiofrequency energy with biological systems with relevance to exposure guidelines. *Health Phys* 92: 609–20

Frémin C, Saba-El-Leil MK, Lévesque K, Ang S-L & Meloche S (2015) Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell Rep* 12: 913–921

French PW, Donnellan M & McKenzie DR (1997) Electromagnetic radiation at 835 MHz changes the morphology and inhibits proliferation of a human astrocytoma cell line. *Bioelectrochem Bioenerg* 43: 13–18

Frey AH (1961) Auditory system response to radio frequency energy. Technical note. *Aerosp Med* 32: 1140–1142

Frey AH & Messenger R (1973) Human perception of illumination with pulsed ultrahigh-frequency electromagnetic energy. *Science* 181: 356–358

Fridlyanskaya I, Alekseenko L & Nikolsky N (2015) Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. *Exp Gerontol* 72

Friedman J, Kraus S, Hauptman Y, Schiff Y & Seger R (2007) Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. *Biochem J* 405: 559–68

Fritah S, Col E, Boyault C, Govin J, Sadoul K, Chiocca S, Christians E, Khochbin S, Jolly C & Vourc'h C (2009) Heat-shock factor 1 controls genome-wide acetylation in heat-shocked cells. *Mol Biol Cell* 20: 4976–4984

Fujimoto M, Hayashida N, Katoh T, Oshima K, Shinkawa T, Prakasam R, Tan K, Inouye S, Takii R & Nakai A (2010) A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock. *Mol Biol Cell* 21: 106–116

Fujimoto M & Nakai A (2010) The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J* 277: 4112–4125

Fujimoto M, Oshima K, Shinkawa T, Wang BB, Inouye S, Hayashida N, Takii R & Nakai A (2008) Analysis of HSF4 Binding Regions Reveals Its Necessity for Gene Regulation during Development and Heat Shock Response in Mouse Lenses. *J Biol Chem* 283: 29961–29970

Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K, *et al* (2013a) Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9: 403–409

Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K & Kabuta T (2013b) Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy* 9: 1167–1171

Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells | American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology

## G

Gabor D (1948) A new microscopic principle. *Nature* 161: 777

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, *et al* (2009a) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16: 1093–1107

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, *et al* (2015) Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 22: 58–73

Galluzzi L, Kepp O & Kroemer G (2009b) RIP Kinases Initiate Programmed Necrosis. *J Mol Cell Biol* 1: 8–10

Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, *et al* (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25: 486–541

Gao X, Wu L & O'Neil RG (2003) Temperature-modulated Diversity of TRPV4 Channel Gating: ACTIVATION BY PHYSICAL STRESSES AND PHORBOL ESTER DERIVATIVES THROUGH PROTEIN KINASE C-DEPENDENT AND -INDEPENDENT PATHWAYS \*. *J Biol Chem* 278: 27129–27137

García JI, Zalba G, Detera-Wadleigh SD & de Miguel C (1996) Isolation of a cDNA encoding the rat MAP-kinase homolog of human p63mapk. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 7: 810–814

Garcia-Elias A, Berna-Erro A, Rubio-Moscardo F, Pardo-Pastor C, Mrkonjić S, Sepúlveda RV, Vicente R, González-Nilo F & Valverde MA (2015) Interaction between the Linker, Pre-S1, and TRP Domains Determines Folding, Assembly, and Trafficking of TRPV Channels. *Struct Lond Engl* 1993 23: 1404–1413

Garcia-Sucerquia J, Xu W, Jericho SK, Klages P, Jericho MH & Kreuzer HJ (2006) Digital in-line holographic microscopy. *Appl Opt* 45: 836–850

Gareau JR & Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861–871

Gaudet R (2008) A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst* 4: 372–379

Goldberg M Morphologic and Biochemical Criteria of Cell Death: Apoptosis and Necrosis. 8

Golstein P & Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37–43

Gomez-Pastor R, Burchfiel ET & Thiele DJ (2018a) Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 4–19

Gomez-Pastor R, Burchfiel ET & Thiele DJ (2018b) Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 4–19

Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR & Davis RJ (1992) Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* 304: 170–178

Goodson ML, Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Park-Sarge O-K & Sarge KD (2001) SUMO-1 Modification Regulates the DNA Binding Activity of Heat Shock Transcription Factor 2, a Promyelocytic Leukemia Nuclear Body Associated Transcription Factor\*. *J Biol Chem* 276: 18513–18518

Gopal BG (2015) A Comparative Study on 4G and 5G Technology for Wireless Applications. *IOSR J Electron Commun Eng IOSR-JECE* 10

Gözükara EM, Parris CN, Weber CA, Salazar EP, Seidman MM, Watkins JF, Prakash L & Kraemer KH (1994) The human DNA repair gene, ERCC2 (XPD), corrects ultraviolet hypersensitivity and ultraviolet hypermutability of a shuttle vector replicated in xeroderma pigmentosum group D cells. *Cancer Res* 54: 3837–3844

Grandolfo M, Michaelson SM & Rindi A (1983) Biological effects and dosimetry of nonionizing radiation: radiofrequency and microwave energies New York: Published in cooperation with NATO Scientific Affairs Division [by] Plenum Press

Green DR & Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626–629

Green M, Schuetz TJ, Sullivan EK & Kingston RE (1995) A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol Cell Biol* 15: 3354–3362

Gresko E, Ritterhoff S, Sevilla-Perez J, Roscic A, Fröbius K, Kotevic I, Vichalkovski A, Hess D, Hemmings BA & Schmitz ML (2009) PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene* 28: 698–708

Grimnes S & Martinsen ØG (2015) Bioimpedance and bioelectricity basics Third edition. Amsterdam Boston Heidelberg London: Elsevier/Academic Press

Grobelny JV, Godwin AK & Broccoli D (2000) ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J Cell Sci* 113 Pt 24: 4577–4585

Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S & Spiegel S (2008) Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. *FASEB J* 22: 2629–2638

Guertin MJ & Lis JT (2010) Chromatin Landscape Dictates HSF Binding to Target DNA Elements. *PLoS Genet* 6: e1001114

Guettouche T, Boellmann F, Lane WS & Voellmy R (2005) Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* 6: 4

Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M & Caterina M (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22: 6408–6414

Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, Zheng W, Purohit S, Podolsky RH, Muir A, *et al* (2004) A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 36: 837–841

Guo L, Giasson BI, Glavis-Bloom A, Brewer MD, Shorter J, Gitler AD & Yang X (2014) A cellular system that degrades misfolded proteins and protects against neurodegeneration. *Mol Cell* 55: 15–30

Guo Y, Dolinko AV, Chinyenetere F, Stanton B, Bomberger JM, Demidenko E, Zhou D-C, Gallagher R, Ma T, Galimberti F, *et al* (2010) Blockade of the Ubiquitin Protease UBP43 Destabilizes the Transcription Factor PML/RAR $\alpha$  and Inhibits Growth of Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Res* 70: 9875–9885

Gupta P (2013) EVOLVEMENT OF MOBILE GENERATIONS : 1G To 5G. 1: 6

Gupta RS (1995) Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* 12: 1063–1073

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B & Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15: 2760–2770

Guy AW, Lin JC, Kramar PO & Emery AF (1975) Effect of 2450-Mhz Radiation on the Rabbit Eye. *IEEE Trans Microw Theory Tech* 23: 492–498

## H

Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK & Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141: 656–667

Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, Otto P, Zimmerman K, Vidugiris G, Machleidt T, *et al* (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol* 7: 1848–1857

Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B & Bouvier M (2006a) Monitoring Protein-Protein Interactions in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* 34: 5.23.1-5.23.20

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

den Hamer A, Dierickx P, Arts R, de Vries JSPM, Brunsveld L & Merckx M (2017) Bright Bioluminescent BRET Sensor Proteins for Measuring Intracellular Caspase Activity. *ACS Sens* 2: 729–734

- Hampshire DP (2018) A derivation of Maxwell's equations using the Heaviside notation. *Philos Trans R Soc Math Phys Eng Sci* 376: 20170447
- Hao Y, Li W, Wang H, Zhang J, Wang H, Dong J, Yao B, Xu X, Zhao L & Peng R (2022) Microwave radiation induces neuronal autophagy through miR-30a-5p/AMPK $\alpha$ 2 signal pathway. *Biosci Rep* 42: BSR20212584
- Hao YH, Zhao L & Peng RY (2018) Effects of Electromagnetic Radiation on Autophagy and its Regulation. *Biomed Env Sci* 31: 57–65
- Harrison CJ, Bohm AA & Nelson HC (1994) Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 263: 224–227
- Harvey C & French PW (1999) Effects on Protein Kinase C and Gene Expression in a Human Mast Cell Line, Hmc-1, Following Microwave Exposure. *Cell Biol Int* 23: 739–748
- Hasan R, Leeson-Payne ATS, Jaggar JH & Zhang X (2017) Calmodulin is responsible for Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Sci Rep* 7: 45098
- Hatzis P, Kyrmizi I & Talianidis I (2006) Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Disruption of Enhancer-Promoter Communication Inhibits Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  Expression. *Mol Cell Biol* 26: 7017–7029
- Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP & Naoe T (2008) Acetylation of PML Is Involved in Histone Deacetylase Inhibitor-mediated Apoptosis. *J Biol Chem* 283: 24420–24425
- Hayakawa F & Privalsky ML (2004) Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 5: 389–401
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L & Wang X (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . *Cell* 137: 1100–1111
- Hendriks IA & Vertegaal ACO (2016) A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 581–595
- Hengartner M (2000) Hengartner MO The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776. *Nature* 407: 770–6
- Hernández-Martínez R & Covarrubias L (2011) Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Dev Growth Differ* 53: 245–258
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A & Sistonen L (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 45–50
- Hill D (1998) Electromagnetic Theory of Reverberation Chambers.
- Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinauer
- Hill-Eubanks DC, Gonzales AL, Sonkusare SK & Nelson MT (2014) Vascular TRP Channels: Performing Under Pressure and Going with the Flow. *Physiology* 29: 343–360
- Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degtarev A, Xavier RJ & Yuan J (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135: 1311–1323
- Hobbs GA, Der CJ & Rossman KL (2016) RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* 129: 1287–1292
- Hoffmann T, Kistner K, Miermeister F, Winkelmann R, Wittmann J, Fischer MJM, Weidner C & Reeh PW (2013) TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur J Pain Lond Engl* 17: 1472–1482
- Hofmann TG, Möller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Dröge W, Will H & Schmitz ML (2002) Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4: 1–10

Høj A & Jakobsen BK (1994) A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J* 13: 2617–2624

Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, Hellman J, Morrice N, MacKintosh C, Morimoto RI, *et al* (2001) Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J* 20: 3800–3810

Hong Y, Rogers R, Matunis M, Mayhew C, Goodson M, Park-Sarge O-K & Sarge K (2001) Regulation of HSF1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276: 40263–7

Hsu K-S, Guan B-J, Cheng X, Guan D, Lam M, Hatzoglou M & Kao H-Y (2016) Translational control of PML contributes to TNF $\alpha$ -induced apoptosis of MCF7 breast cancer cells and decreased angiogenesis in HUVECs. *Cell Death Differ* 23: 469–483

Hsu K-S & Kao H-Y (2018) PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci* 8: 5

Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX & Patapoutian A (2009) Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol* 5: 183–190

Huang S-Y, Naik MT, Chang C-F, Fang P-J, Wang Y-H, Shih H-M & Huang T-H (2014) The B-box 1 dimer of human promyelocytic leukemia protein. *J Biomol NMR* 60: 275–281

## I

IARC (2013) Non-ionizing radiation, Part 2: Radiofrequency electromagnetic fields. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 102: 1–460

Içier F & Baysal T (2004) Dielectrical properties of food materials--1: factors affecting and industrial uses. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 465–471

ICNIRP (1998) Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Phys* 74: 494–522

ICNIRP (2003) Exposure to Static and Low Frequency Electromagnetic Fields, Biological Effects and Health Consequences (0-100 kHz) International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection

ICNIRP (2020a) Guidelines for Limiting Exposure to Electromagnetic Fields (100 kHz to 300 GHz). *Health Phys* 118: 483–524

ICNIRP IC on N-IR (2020b) ICNIRP Note: Critical Evaluation of Two Radiofrequency Electromagnetic Field Animal Carcinogenicity Studies Published in 2018. *Health Phys* 118: 525–532

Iki S, Yokota S, Okabayashi T, Yokosawa N, Nagata K & Fujii N (2005) Serum-dependent expression of promyelocytic leukemia protein suppresses propagation of influenza virus. *Virology* 343: 106–115

Inouye S, Watanabe K, Nakamura H & Shimomura O (2000) Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase. *FEBS Lett* 481: 19–25

Ishibe S, Joly D, Liu Z-X & Cantley LG (2004) Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 16: 257–267

Ito K, Bernardi R, Morotti A, Matsuoka S, Saglio G, Ikeda Y, Rosenblatt J, Avigan DE, Teruya-Feldstein J & Pandolfi PP (2008) PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* 453: 1072–1078

Itoh T, Fujita N, Kanno E, Yamamoto A, Yoshimori T & Fukuda M (2008) Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19: 2916–2925

Ivanschitz L, Takahashi Y, Jollivet F, Ayrault O, Le Bras M & de Thé H (2015) PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 14278–14283

## J

Jacobs SF (1981) Safety with Lasers and Other Optical Sources, by D. Sliney and M. Wolbarsht. *Med Phys* 8: 725–726

Jacobson MD, Weil M & Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347–354

Jakobsen BK & Pelham HR (1988) Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol Cell Biol* 8: 5040–5042

Janssen DAW, Hoenderop JG, Jansen KCFJ, Kemp AW, Heesakkers JPFA & Schalken JA (2011) The mechanoreceptor TRPV4 is localized in adherence junctions of the human bladder urothelium: a morphological study. *J Urol* 186: 1121–1127

Jara-Oseguera A & Islas LD (2013) The role of allosteric coupling on thermal activation of thermo-TRP channels. *Biophys J* 104: 2160–9

Jeanne M, Lallemand-Breitenbach V, Ferhi O, Koken M, Le Bras M, Duffort S, Peres L, Berthier C, Soilihi H, Raught B, *et al* (2010) PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Cancer Cell* 18: 88–98

Jensen K, Shiels C & Freemont PS (2001) PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20: 7223–33

Jeong EJ, Bang S, Lee TH, Park YI, Sim WS & Kim KS (1999) The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. *J Biol Chem* 274: 16337–16342

Jiang L-H (2007) Subunit interaction in channel assembly and functional regulation of transient receptor potential melastatin (TRPM) channels. *Biochem Soc Trans* 35: 86–88

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S & Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271: 17920–17926

Jiang Y & Fleet JC (2012) Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate activated signaling pathways on  $1\alpha$ , 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulated human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase gene expression in differentiated Caco-2 cells. *J Cell Biochem* 113: 1599–1607

Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ & Han J (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272: 30122–30128

Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73: 355–382

Jones S, Sheng W & Or D (2022) Dielectric Measurement of Agricultural Grain Moisture—Theory and Applications. *Sensors* 22: 2083

Joseph B, George J & Jeevitha M (2012) Impact of heavy metals and Hsp Response International Journal of Biosciences (IJB). *Int J Biosci*

Joushomme A, Garenne A, Dufossée M, Renom R, Ruigrok HJ, Chappe YL, Canovi A, Patrignoni L, Hurtier A, Poullétier de Gannes F, *et al* (2022) Label-Free Study of the Global Cell Behavior during Exposure to Environmental Radiofrequency Fields in the Presence or Absence of Pro-Apoptotic or Pro-Autophagic Treatments. *Int J Mol Sci* 23

Jurivich D, Sistonen L, Kroes R & Morimoto R (1992) Effect of Sodium Salicylate on the Human Heat Shock Response. *Science* 255: 1243–5

## K

Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T & Yeh ET (1998) Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273: 26675–26682

Kang Y-M, Han M-R, Han K & Kim J-B (2015) A Study on the Internet of Things (IoT) Applications. *Int J Softw Eng Its Appl* 9: 117–126

Kania E, Pająk B, Orzechowski A. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:352794. doi: 10.1155/2015/352794. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25821797; PMCID: PMC4363509.

Kastner P, Perez A, Lutz Y, Rochette-Egly C, Gaub MP, Durand B, Lanotte M, Berger R & Chambon P (1992) Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J* 11: 629–642

Kaur J & Khan SA (2019) Electric field and specific absorption rate (SAR) analysis in multilayered skin tissue exposed to 5G mobile communication frequencies. *AIP Conf Proc* 2142: 110028

Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–257

Kesari KK, Agarwal A & Henkel R (2018) Radiations and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 16: 118

Keshari RS, Verma A, Barthwal MK & Dikshit M (2013) Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem* 114: 532–540

Khan MM, Nomura T, Kim H, Kaul SC, Wadhwa R, Shinagawa T, Ichikawa-Iwata E, Zhong S, Pandolfi PP & Ishii S (2001) Role of PML and PML-RAR $\alpha$  in Mad-Mediated Transcriptional Repression. *Mol Cell* 7: 1233–1243

Kim EK & Choi E-J (2015a) Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol* 89: 867–882

Kim EK & Choi E-JJ (2015b) Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol* 89: 867–82

Kim H-J, Joo HJ, Kim YH, Ahn S, Chang J, Hwang K-B, Lee D-H & Lee K-J (2011) Systemic Analysis of Heat Shock Response Induced by Heat Shock and a Proteasome Inhibitor MG132. *PLoS ONE* 6: e20252

Kim H-NN, Han N-KK, Hong M-NN, Chi S-GG, Lee Y-SS, Kim T, Pack J-KK, Choi H-DD, Kim N & Lee J-SS (2012) Analysis of the cellular stress response in MCF10A cells exposed to combined radio frequency radiation. *J Radiat Res* 53: 176–83



Kim JH, Huh YH & Kim HR (2016) Induction of Autophagy in the Striatum and Hypothalamus of Mice after 835 MHz Radiofrequency Exposure. *PLOS ONE* 11: e0153308

Kim JH, Yu D-H, Huh YH, Lee EH, Kim H-G & Kim HR (2017) Long-term exposure to 835 MHz RF-EMF induces hyperactivity, autophagy and demyelination in the cortical neurons of mice. *Sci Rep* 7: 41129

Kim JH, Yu D-H, Kim H-J, Huh YH, Cho S-W, Lee J-K, Kim H-G & Kim HR (2018) Exposure to 835 MHz radiofrequency electromagnetic field induces autophagy in hippocampus but not in brain stem of mice. *Toxicol Ind Health* 34: 23–35

Kim M (2009) Principles and techniques of digital holographic microscopy. *SPIE Rev Vol 1 Id 018005 2010* 1: 8005

Kimura S, Noda T & Yoshimori T (2008) Dynein-dependent Movement of Autophagosomes Mediates Efficient Encounters with Lysosomes. *Cell Struct Funct* 33: 109–122

Kimura WD (2020) What are electromagnetic waves? *Electromagn Waves Lasers Second Ed*

Kinsler P (2020) Faraday's Law and Magnetic Induction: Cause and Effect, Experiment and Theory. *Physics 2*: 148–161

Kirchmaier S, Lust K & Wittbrodt J (2013) Golden GATEway Cloning – A Combinatorial Approach to Generate Fusion and Recombination Constructs. *PLoS ONE* 8: e76117

Kitatani K, Sheldon K, Anelli V, Jenkins R, Sun Y, Grabowski G, Obeid L & Hannun Y (2009) Acid  $\beta$ -glucosidase 1 counteracts p38 $\delta$ -dependent induction of interleukin-6: Possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid. *J Biol Chem* 284: 12979–88

Kline MP & Morimoto RI (1997) Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17: 2107–2115

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, *et al* (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445–544

Klionsky DJ & Codogno P (2013) The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun* 5: 427–433

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, *et al* (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5: 539–545

Klionsky L, Tamir R, Gao B, Wang W, Immke DC, Nishimura N & Gavva NR (2007) Species-specific pharmacology of Trichloro(sulfanyl)ethyl benzamides as transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists. *Mol Pain* 3: 39

Knowlton A (2006) NF $\kappa$ B, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc Res* 69: 7–8

Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y & Westlund KN (2006) Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C424-432

Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y & Matsuda M (2011) Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell* 22: 4647–56

Kono H & Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8: 279–289

Kovacs JJ, Murphy PJM, Gaillard S, Zhao X, Wu J-T, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB & Yao T-P (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18: 601–607

Kraemer KH, Coon HG, Petinga RA, Barrett SF, Rahe AE & Robbins JH (1975) National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20014, USA. *Proc Natl Acad Sci* 72: 59–63

Kraft R & Harteneck C (2005) The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 451: 204–211

Krebs J, Agellon LB & Michalak M (2015) Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 114–121

Krieghoff-Henning E & Hofmann TG (2008) Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1783: 2185–2194

Krishan R (2019) Wi-Fi 6 Technology-A Review. 7: 11–13

Krishnamurthy K, Kanagasabai R, Druhan LJ & Ilangovan G (2011) Small Heat Shock Proteins and Doxorubicin-Induced Oxidative Stress in the Heart. In *Studies on Experimental Models*, Basu S & Wiklund L (eds) pp 105–130. Totowa, NJ: Humana Press

Krivoruchko A & Storey KB (2010) Forever Young: Mechanisms of Natural Anoxia Tolerance and Potential Links to Longevity. *Oxid Med Cell Longev* 3: 186–198

Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99–163

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, *et al* (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3–11

Kryjevskaja M, Stetzer MR & Heron PRL (2012) Student understanding of wave behavior at a boundary: The relationships among wavelength, propagation speed, and frequency. *Am J Phys* 80: 339–347

Kwee S & Raskmark P (1998) Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation: 2. Microwave radiation. *Bioelectrochem Bioenerg* 44: 251–255

Kwee S, Raskmark P & Velizarov S (2001) Changes in Cellular Proteins Due to Environmental Non-Ionizing Radiation. I. Heat-Shock Proteins. *Electro- Magnetobiology* 20: 141–152

Ky L, Bc K, Nk H, Ys L, T K, Jh Y, N K, Jk P & Js L (2011) Effects of combined radiofrequency radiation exposure on the cell cycle and its regulatory proteins. *Bioelectromagnetics* 32

Kyriakis JM & Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807–869

## L

Lai H (2011) Cell Phone Radiofrequency Radiation Exposure and Brain Glucose Metabolism. *JAMA* 305: 828

Lallemant-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B & de Thé H (2008) Arsenic degrades PML or PML-RAR $\alpha$  through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10: 547–555

Lallemand-Breitenbach V & de Thé H (2010) PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000661

Lanneau D (2010) Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. 192

Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, *et al* (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113: 717–730

Laurson WJ, Anderson EO, Hoffstaetter LJ, Bagriantsev SN & Gracheva EO (2015) Species-specific temperature sensitivity of TRPA1. *Temperature* 2: 214–226

Laurson WJ, Bagriantsev SN & Gracheva EO (2014) Chapter Four - TRPA1 Channels: Chemical and Temperature Sensitivity. In *Current Topics in Membranes*, Islas LD & Qin F (eds) pp 89–112. Academic Press

Lavau C, Marchio A, Fagioli M, Jansen J, Falini B, Lebon P, Grosveld F, Pandolfi PP, Pelicci PG & Dejean A (1995) The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* 11: 871–876

Lee DH & Goldberg AL (1998) Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18: 30–38

Lee H-W, Ahn D-H, Crawley SC, Li J-D, Gum JR, Basbaum CB, Fan NQ, Szymkowski DE, Han S-Y, Lee BH, *et al* (2002) Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Up-regulates the Transcription of MUC2 Intestinal Mucin via Ras, ERK, and NF- $\kappa$ B \*. *J Biol Chem* 277: 32624–32631

Lee JH, Hübel A & Schöffl F (1995) Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J Cell Mol Biol* 8: 603–612

Lee Y-J, Kim E-H, Lee JS, Jeoung D, Bae S, Kwon SH & Lee Y-S (2008) HSF1 as a mitotic regulator: phosphorylation of HSF1 by Plk1 is essential for mitotic progression. *Cancer Res* 68: 7550–7560

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S & Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185: 1481–1486

Leitgeb N & Schröttner J (2003) Electrosensibility and Electromagnetic Hypersensitivity. *Bioelectromagnetics* 24: 387–94

Leszczynski D, Joenväärä S, Reivinen J & Kuokka R (2002) Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70: 120–9

Leveque P, Reineix A & Jecko B (1992a) Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas: application of FDTD method. *Electron Lett* 28: 539–541

Leveque Ph, Reineix A & Jecko B (1992b) Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas - Application of FDTD method. *Electron Lett* 28: 539–541

Levine MS & Holland AJ (2018) The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev* 32: 620–638

Li W, Li J & Bao J (2012a) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci CMLS* 69: 1125–1136

Li X, Newbern JM, Wu Y, Morgan-Smith M, Zhong J, Charron J & Snider WD (2012b) MEK Is a Key Regulator of Gliogenesis in the Developing Brain. *Neuron* 75: 1035–1050

- Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ & Han J (1996) The Primary Structure of p38 $\gamma$ : A New Member of p38 Group of MAP Kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 334–340
- Liang Y-C, Lee C-C, Yao Y-L, Lai C-C, Schmitz ML & Yang W-M (2016) SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep* 6: 26509
- Liedtke W & Friedman JM (2003) Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13698–13703
- Lieu T, Jayaweera G, Zhao P, Poole DP, Jensen D, Grace M, McIntyre P, Bron R, Wilson YM, Krappitz M, *et al* (2014) The Bile Acid Receptor TGR5 Activates the TRPA1 Channel to Induce Itch in Mice. *Gastroenterology* 147: 1417–1428
- Lin H-K, Bergmann S & Pandolfi PP (2004) Cytoplasmic PML function in TGF- $\beta$  signalling. *Nature* 431: 205–211
- Lindell I (2005) Evolution of Electromagnetics in the 19th Century. *Adv Radio Sci - Kleinheubacher Berichte* 3
- Lindquist S (1986) The Heat-Shock Response. *Annu Rev Biochem* 55: 1151–1191
- Liu B & Qin F (2019) Patch-Clamp Combined with Fast Temperature Jumps to Study Thermal TRP Channels. In *TRP Channels: Methods and Protocols*, Ferrer-Montiel A & Hucho T (eds) pp 125–141. New York, NY: Springer
- Liu B, Yao J, Zhu MX & Qin F (2011) Hysteresis of gating underlines sensitization of TRPV3 channels. *J Gen Physiol* 138: 509–520
- Liu K, Zhang G, Wang Z, Liu Y, Dong J, Dong X, Liu J, Cao J, Ao L & Zhang S (2014) The protective effect of autophagy on mouse spermatocyte derived cells exposure to 1800MHz radiofrequency electromagnetic radiation. *Toxicol Lett* 228: 216–24
- Liu L & Rohacs T (2020) Regulation of the cold-sensing TRPM8 channels by phosphoinositides and Gq-coupled receptors. *Channels* 14: 79–86
- Liu Y, Tai J, Li G, Zhang Z, Xue J, Liu H, Zhu H, Cheng J, Liu Y, Li A, *et al* (2012) Exposure to 1950-MHz TD-SCDMA Electromagnetic Fields Affects the Apoptosis of Astrocytes via Caspase-3-Dependent Pathway. *PLoS ONE* 7: e42332
- Lixia S, Yao K, Kaijun W, Deqiang L, Huajun H, Xiangwei G, Baohong W, Wei Z, Jianling L & Wei W (2006) Effects of 1.8GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 602: 135–142
- Loi Abeille 2020 (D.A.S.) Mes Débit Absorpt Spécifique  
LOI n° 2015-136 du 9 février 2015 relative à la sobriété, à la transparence, à l'information et à la concertation en matière d'exposition aux ondes électromagnétiques (1) (2015)
- López-Sáez JF, de la Torre C, Pincheira J & Giménez-Martín G (1998) Cell proliferation and cancer. *Histol Histopathol* 13: 1197–1214
- Lorda-Diez C, Montero J, Garcia-Porrero J & Hurle J (2015) Interdigital tissue regression in the developing limb of vertebrates. *Int J Dev Biol* 59: 55–62
- de Lorge JO & Ezell CS (1980) Observing-responses of rats exposed to 1.28- and 5.62-GHz microwaves. *Bioelectromagnetics* 1: 183–198
- Louria-Hayon I, Alsheich-Bartok O, Levav-Cohen Y, Silberman I, Berger M, Grossman T, Matentzoglou K, Jiang Y-H, Muller S, Scheffner M, *et al* (2009) E6AP promotes the degradation of the PML tumor suppressor. *Cell Death Differ* 16: 1156–1166
- Lu M, Sohn K-J, Kim S-W, Li C-R, Kim S, Kim D-K & Park J-S (2009) Alpha-helix 1 in the DNA-binding domain of heat shock factor 1 regulates its heat-induced trimerization and DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* 385: 612–617
- Lu X, Niyato D, Wang P, Kim DI & Han Z (2015) Wireless charger networking for mobile devices: fundamentals, standards, and applications. *IEEE Wirel Commun* 22: 126–135

Lu Y-S, Huang B-T & Huang Y-X (2012) Reactive oxygen species formation and apoptosis in human peripheral blood mononuclear cell induced by 900 MHz mobile phone radiation. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 740280

Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie-Filali O, Bisgaard C, Manta S, Lambas-Senas L, Wiborg O, Haddjeri N, Piñeyro G, *et al* (2007) Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron* 55: 712–25

Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL & Lefkowitz RJ (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by  $\beta$ -arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci* 98: 2449–2454

Lwin Z & Yokota M (2019) Numerical Analysis of SAR and Temperature Distribution in Two Dimensional Human Head Model based on FDTD Parameters and the Polarization of Electromagnetic Wave. *AEU - Int J Electron Commun* 104

Lyle DB, Schechter P, Adey WR & Lundak RL (1983) Suppression of T-lymphocyte cytotoxicity following exposure to sinusoidally amplitude-modulated fields. *Bioelectromagnetics* 4: 281–292

## M

Ma X, Qiu S, Luo J, Ma Y, Ngai C-Y, Shen B, Wong C, Huang Y & Yao X (2010) Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca<sup>2+</sup> influx. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 851–858

Mace PD & Riedl SJ (2010) Molecular Cell Death Platforms and Assemblies. *Curr Opin Cell Biol* 22: 828–836

MacFarlane M & Williams AC (2004) Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5: 674–678

Mahmud M (2019) Cellular Mobile Technologies (1G to 5G) and Massive MIMO. *Int J Sci Res IJSR* 8: 929–937

Mai TC, Delanaud S, Bach V, Braun A, Pelletier A & de Seze R (2020) Effect of non-thermal radiofrequency on body temperature in mice. *Sci Rep* 10: 5724

Majeski AE & Fred Dice J (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2435–2444

Malkiel E, Sheng J, Katz J & Strickler JR (2003) The three-dimensional flow field generated by a feeding calanoid copepod measured using digital holography. *J Exp Biol* 206: 3657–3666

Malladi S, Challa-Malladi M, Fearnhead HO & Bratton SB (2009) The Apaf-1\*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J* 28: 1916–1925

Mamenko M, Zaika OL, Boukelmoune N, Berrout J, O’Neil RG & Pochynyuk O (2013) Discrete control of TRPV4 channel function in the distal nephron by protein kinases A and C. *J Biol Chem* 288: 20306–20314

Manna D & Ghosh R (2016) Effect of radiofrequency radiation in cultured mammalian cells: A review. *Electromagn Biol Med* 35: 265–301

Marinelli F, La Sala D, Ciccio G, Cattini L, Trimarchi C, Putti S, Zamparelli A, Giuliani L, Tomassetti G & Cinti C (2004) Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between pro-apoptotic and pro-survival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells. *J Cell Physiol* 198: 324–332

Markov MS (2005) “Biological Windows”: A Tribute to W. Ross Adey. *The Environmentalist* 25: 67–74

- Marquet P, Rappaz B, Magistretti PJ, Cuhe E, Emery Y, Colomb T & Depeursinge C (2005) Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Opt Lett* 30: 468–470
- Marte B (2004) Cell division and cancer. *Nature* 432: 293–293
- Martin R (2020) Introductory Physics: Building Models to Describe Our World Queen's University Library
- Martínez-Ruiz A, Villanueva L, González de Orduña C, López-Ferrer D, Higuera MA, Tarín C, Rodríguez-Crespo I, Vázquez J & Lamas S (2005) S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8525–8530
- di Masi A, Cilli D, Berardinelli F, Talarico A, Pallavicini I, Pennisi R, Leone S, Antocchia A, Noguera NI, Lo-Coco F, *et al* (2016) PML nuclear body disruption impairs DNA double-strand break sensing and repair in APL. *Cell Death Dis* 7: e2308–e2308
- Masroori N, Merindol N & Berthoux L (2016) The interferon-induced antiviral protein PML (TRIM19) promotes the restriction and transcriptional silencing of lentiviruses in a context-specific, isoform-specific fashion. *Retrovirology* 13: 19
- Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohyama K & Komori T (2012) Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. *J Bone Miner Res* 27: 1708–1721
- Mathew A, Mathur SK, Jolly C, Fox SG, Kim S & Morimoto RI (2001) Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21: 7163–71
- Matsuda N & Tanaka K (2010) Uncovering the roles of PINK1 and parkin in mitophagy. *Autophagy* 6: 952–954
- Matta JA & Ahern GP (2007) Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels: Voltage-independent gating of TRPV1 and TRPM8. *J Physiol* 585: 469–482
- Maul GG, Negorev D, Bell P & Ishov AM (2000) Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* 129: 278–287
- Maul GG, Yu E, Ishov AM & Epstein AL (1995) Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem* 59: 498–513
- McAlexander MA, Luttmann MA, Hunsberger GE & Udem BJ (2014) Transient receptor potential vanilloid 4 activation constricts the human bronchus via the release of cysteinyl leukotrienes. *J Pharmacol Exp Ther* 349: 118–125
- McCulloch TW, MacLean DM & Kammermeier PJ (2020) Comparing the performance of mScarlet-I, mRuby3, and mCherry as FRET acceptors for mNeonGreen. *PLoS One* 15: e0219886
- McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K & Benjamin IJ (1998) Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273: 7523–7528
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I & Codogno P (2010) Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol-Cell Physiol* 298: C776–C785
- Meier P, Finch A & Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407: 796–801
- Meister M, Tomasovic A, Banning A & Tikkanen R (2013) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *Int J Mol Sci* 14: 4854–4884
- Meng X, Chen Y, Macip S & Leppard K (2021a) PML-II regulates ERK and AKT signal activation and IFN $\alpha$ -induced cell death. *Cell Commun Signal* 19: 70

- Meng X, Chen Y, Macip S & Leppard K (2021b) PML-II regulates ERK and AKT signal activation and IFN $\alpha$ -induced cell death. *Cell Commun Signal* 19: 70
- Merola P, Marino C, Lovisolo GA, Pinto R, Laconi C & Negroni A (2006) Proliferation and apoptosis in a neuroblastoma cell line exposed to 900 MHz modulated radiofrequency field. *Bioelectromagnetics* 27: 164–171
- Micale L, Chaignat E, Fusco C, Reymond A & Merla G (2012) The tripartite motif: structure and function. *Adv Exp Med Biol* 770: 11–25
- Middleton AJ, Wright JD & Day CL (2017) Regulation of E2s: A Role for Additional Ubiquitin Binding Sites? *J Mol Biol* 429: 3430–3440
- Mijaljica D, Prescott M & Devenish RJ (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7: 673–682
- Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K & Yahara I (1994) The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol Cell Biol* 14: 1459–1464
- Miniotis MF, Mukwaya A & Wingren AG (2014) Digital Holographic Microscopy for Non-Invasive Monitoring of Cell Cycle Arrest in L929 Cells. *PLOS ONE* 9: e106546
- Miura N, Asaka N, Shinyashiki N & Mashimo S (1994) Microwave dielectric study on bound water of globule proteins in aqueous solution. *Biopolymers* 34: 357–364
- Miyakoshi J, Tonomura H, Koyama S, Narita E & Shinohara N (2019) Effects of Exposure to 5.8 GHz Electromagnetic Field on Micronucleus Formation, DNA Strand Breaks, and Heat Shock Protein Expressions in Cells Derived From Human Eye. *IEEE Trans Nanobioscience* 18: 257–260
- Mizushima N & Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12: 823–830
- Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A & Matsuda M (2001) Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065–8
- Mölder A, Sebesta M, Gustafsson M, Gisselson L, Wingren AG & Alm K (2008) Non-invasive, label-free cell counting and quantitative analysis of adherent cells using digital holography. *J Microsc* 232: 240–247
- Montell C (2001) Physiology, Phylogeny, and Functions of the TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci STKE* 2001
- Moore C, Cevikbas F, Pasolli HA, Chen Y, Kong W, Kempkes C, Parekh P, Lee SH, Kontchou N-A, Yeh I, *et al* (2013) UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E3225-3234
- Moparthi L, Kichko TI, Eberhardt M, Högestätt ED, Kjellbom P, Johanson U, Reeh PW, Leffler A, Filipovic MR & Zygmunt PM (2016) Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep* 6: 28763
- Moran MM, McAlexander MA, Bíró T & Szallasi A (2011) Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10: 601–620
- Morimoto RI (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409–1410
- Morrison DK (2012) MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011254
- Mosavi LK, Minor DL & Peng Z-Y (2002) Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16029–16034

Muller S (1998) Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17: 61–70

Müller S, Hoege C, Pyrowolakis G & Jentsch S (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 202–210

Murbach M, Zastrow E, Neufeld E, Cabot E, Kainz W & Kuster N (2015) Heating and Safety Concerns of the Radio-Frequency Field in MRI. *Curr Radiol Rep* 3: 45

Murphy PJM, Morishima Y, Kovacs JJ, Yao T-P & Pratt WB (2005) Regulation of the Dynamics of hsp90 Action on the Glucocorticoid Receptor by Acetylation/Deacetylation of the Chaperone \*. *J Biol Chem* 280: 33792–33799

Murshid A, Chou S-D, Prince T, Zhang Y, Bharti A & Calderwood SK (2010) Protein Kinase A Binds and Activates Heat Shock Factor 1. *PLOS ONE* 5: e13830

## N

Nadeau V & Charron J (2014) Essential role of the ERK/MAPK pathway in blood-placental barrier formation. *Dev Camb Engl* 141: 2825–2837

Nakai A & Morimoto RI (1993) Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* 13: 1983–1997

Nakai A, Suzuki M & Tanabe M (2000) Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 19: 1545–1554

Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S & Kurihara T (2004) Protein kinase C alpha requirement in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, which is linked to the induction of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *Neurochem Int* 44: 205–214

National Toxicology Program (2018a) Toxicology and carcinogenesis studies in Sprague Dawley (Hsd:Sprague Dawley SD) rats exposed to whole-body radio frequency radiation at a frequency (900 MHz) and modulations (GSM and CDMA) used by cell phones. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser: NTP-TR-595*

National Toxicology Program (2018b) Toxicology and carcinogenesis studies in B6C3F1/N mice exposed to whole-body radio frequency radiation at a frequency (1,900 MHz) and modulations (GSM and CDMA) used by cell phones. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser: NTP-TR-596*

Newhart A, Negorev DG, Rafalska-Metcalf IU, Yang T, Maul GG & Janicki SM (2013) Sp100A promotes chromatin decondensation at a cytomegalovirus-promoter-regulated transcription site. *Mol Biol Cell* 24: 1454–1468

Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M & Kitabayashi I (2005) Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood* 105: 292–300

Nielsen M, Overgaard J, Sørensen J, Holmstrup M, Justesen J & Loeschcke V (2006) Role of HSF activation for resistance to heat, cold and high-temperature knock-down. *J Insect Physiol* 51: 1320–9

Nieto-Posadas A, Jara-Oseguera A & Rosenbaum T (2011) TRP Channel Gating Physiology. *Curr Top Med Chem* 11: 2131–2150

Nieto-Sotelo J, Wiederrecht G, Okuda A & Parker CS (1990) The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* 62: 807–817



Nilius B & Szallasi A (2015) Chapter 23 - Are Brain TRPs Viable Targets for Curing Neurodegenerative Disorders and Improving Mental Health? In *TRP Channels as Therapeutic Targets*, Szallasi A (ed) pp 419–456. Boston: Academic Press

Nilius B & Voets T (2013) The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Rep* 14: 152–163

Nisole S, Stoye JP & Saïb A (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3: 799–808

Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CEP, Müller J & Cross MJ (2012) ERK5: structure, regulation and function. *Cell Signal* 24: 2187–2196

Niwa-Kawakita M, Ferhi O, Soilihi H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V & de Thé H (2017) PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *J Exp Med* 214: 3197–3206

Niwa-Kawakita M, Wu H-C, Thé H de & Lallemand-Breitenbach V (2018) PML nuclear bodies, membrane-less domains acting as ROS sensors? *Semin Cell Dev Biol* 80: 29–34

Nuclear and unclear functions of SUMO | Nature Reviews Molecular Cell Biology

Nussinov R, Tsai C-JJ & Jang H (2018) Oncogenic Ras Isoforms Signaling Specificity at the Membrane. *Cancer Res* 78: 593–602

## O

Olivares E, Salgado S, Maidana JP, Herrera G, Campos M, Madrid R & Orio P (2015) TRPM8-Dependent Dynamic Response in a Mathematical Model of Cold Thermoreceptor. *PLoS ONE* 10: e0139314

Ono K & Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12: 1–13

Orlacchio R, andrieu G, joushomme A, patrignoni L, Hurtier F, Poullietier de Gannes F, Lagroye I, Percherancier Y, Arnaud-Cormos D & Levêque P (2022) A novel reverberation chamber for in vitro bioelectromagnetic experiments at 3.5 GHz. *IEEE Trans Electromagn Compat*

Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD & Morrison DK (2003) Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol CB* 13: 1356–1364

Ostling P, Björk JK, Roos-Mattjus P, Mezger V & Sistonen L (2007) Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J Biol Chem* 282: 7077–7086

Ozgur E, Guler G, Kismali G & Seyhan N (2014) Mobile Phone Radiation Alters Proliferation of Hepatocarcinoma Cells. *Cell Biochem Biophys* 70: 983–991

## P

Palmer RM, Ferrige AG & Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524–526

Panzano VC, Kang K & Garrity PA (2010) Infrared Snake Eyes: TRPA1 and the Thermal Sensitivity of the Snake Pit Organ. *Sci Signal* 3

Parzych KR & Klionsky DJ (2014) An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal* 20: 460–473

- Pau G, Chaudet C, Collotta M & Zhao D (2018) Next Generation Wireless Technologies for Internet of Things. *Sensors* 18
- Paulsen CE, Armache J-P, Gao Y, Cheng Y & Julius D (2015) Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520: 511–517
- Pearl LH & Prodromou C (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75: 271–294
- Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Ciocce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, *et al* (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406: 207–210
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, *et al* (2002) A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108: 705–715
- Peixoto-Neves D, Wang Q, Leal-Cardoso JH, Rossoni LV & Jaggar JH (2015) Eugenol dilates mesenteric arteries and reduces systemic BP by activating endothelial cell TRPV4 channels. *Br J Pharmacol* 172: 3484–3494
- Pelletier A, Delanaud S, Décima P, Thuroczy G, de S e. z. e., Cerri M, Bach V, Libert JP & Loos N (2013a) Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy. *Environ Sci Pollut Res Int* 20: 2735–46
- Pelletier A, Delanaud S, Décima P, Thuroczy G, de Seze R, Cerri M, Bach V, Libert J-P & Loos N (2013b) Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy balance in developing rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 20: 2735–2746
- Pelletier A, Delanaud S, de Seze R, Bach V, Libert J-PP & Loos N (2014) Does exposure to a radiofrequency electromagnetic field modify thermal preference in juvenile rats? *PLoS One* 9: e99007
- Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M & Heveker N (2005) Bioluminescence Resonance Energy Transfer Reveals Ligand-induced Conformational Changes in CXCR4 Homo- and Heterodimers. *J Biol Chem* 280: 9895–9903
- Percherancier Y, Germain-Desprez D, Galisson F, Mascle XH, Dianoux L, Estephan P, Chelbi-Alix MK & Aubry M (2009) Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem* 284: 16595–608
- Pérez de Vega MJ, Gómez-Monterrey I, Ferrer-Montiel A & González-Muñiz R (2016) Transient Receptor Potential Melastatin 8 Channel (TRPM8) Modulation: Cool Entryway for Treating Pain and Cancer. *J Med Chem* 59: 10006–10029
- Pérez J-P & Lagoute C (2001) Thermodynamique: fondements et applications avec 250 exercices et problèmes résolus 3e éd. Paris: Dunod
- Peters WJ, Jackson RW & Iwano K (1979) Effect of controlled electromagnetic radiation on the growth of cells in tissue culture. *J Surg Res* 27: 8–13
- Phelps CB & Gaudet R (2007) The Role of the N Terminus and Transmembrane Domain of TRPM8 in Channel Localization and Tetramerization. *J Biol Chem* 282: 36474–36480
- Picard D, Khursheed B, Garabedian MJ, Fortin MG, Lindquist S & Yamamoto KR (1990) Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348: 166–168
- Pirkkala L, Nykänen P & Sistonen L (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118–1131
- Polk C (2019) CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields 0 ed. CRC Press

Polk C & Postow E eds. (2019) CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields Boca Raton: CRC Press

Pooam M, Jourdan N, Aguida B, Dahon C, Baouz S, Terry C, Raad H & Ahmad M (2022) Exposure to 1.8 GHz radiofrequency field modulates ROS in human HEK293 cells as a function of signal amplitude. *Commun Integr Biol* 15: 54–66

Poon IKH, Hulett MD & Parish CR (2010) Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ* 17: 381–397

Poque E, Arnaud-Cormos D, Patrignoni L, Ruigrok HJ, Poullétier De Gannes F, Hurtier A, Renom R, Garenne A, Lagroye I, Lévêque P, *et al* (2020) Effects of radiofrequency fields on RAS and ERK kinases activity in live cells using the bioluminescence resonance energy transfer technique. *Int J Radiat Biol* 96: 836–843

Poque E, Ruigrok HJ, Arnaud-Cormos D, Habauzit D, Chappe Y, Martin C, De Gannes FP, Hurtier A, Garenne A, Lagroye I, *et al* (2021) Effects of radiofrequency field exposure on proteotoxic-induced and heat-induced HSF1 response in live cells using the bioluminescence resonance energy transfer technique. *Cell Stress Chaperones* 26: 241–251

Poston E & Swicord ML (1986) Modulated Fields and ‘Window’ Effects. In *CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields* CRC Press

Pratt WB (1992) Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 14: 841–848

Pratt WB & Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med Maywood NJ* 228: 111–133

Privalov PL & Crane-Robinson C (2017) Role of water in the formation of macromolecular structures. *Eur Biophys J* 46: 203–224

## R

Raghavan V, Orsat V & Meda V (2005) The Microwave Processing of Foods. *Stewart Postharvest Rev* 1: 1–8

Ramaswamy H & Tang J (2008) Microwave and Radio Frequency Heating. *Food Sci Technol Int* 14: 423–427

Rappaz B, Marquet P, Cuche E, Emery Y, Depeursinge C & Magistretti PJ (2005) Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Opt Express* 13: 9361–9373

Raucci A, Palumbo R & Bianchi ME (2007) HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity* 40: 285–289

Ravichandran KS (2003) “Recruitment Signals” from Apoptotic Cells: Invitation to a Quiet Meal. *Cell* 113: 817–820

Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C & Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12: 747–757

Reddy KB, Nabha SM & Atanaskova N (2003) Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22: 395–403

Reid G (2005) ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to? *Pflug Arch* 451: 250–263

Rikihisa Y (1984) Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae. *Anat Rec* 208: 319–327

Roach HI & Clarke NM (2000) Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 82: 601–613

Roesslein M, Schibilsky D, Muller L, Goebel U, Schwer C, Humar M, Schmidt R, Geiger K, Pahl H-L, Pannen B, *et al* (2008) Thiopental Protects Human T Lymphocytes from Apoptosis in Vitro via the Expression of Heat Shock Protein 70. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 217–25

Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M & Gordon SE (2004) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123: 53–62

Rosenberger DC, Binzen U, Treede R-D & Greffrath W (2020) The capsaicin receptor TRPV1 is the first line defense protecting from acute non damaging heat: a translational approach. *J Transl Med* 18: 28

Roy M, Li Z & Sacks DB (2005) IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol* 25: 7940–7952

Ruigrok HJ, Arnaud-Cormos D, Hurtier A, Poque E, de Gannes FP, Ruffié G, Bonnaudin F, Lagroye I, Sojic N, Arbault S, *et al* (2018) Activation of the TRPV1 Thermoreceptor Induced by Modulated or Unmodulated 1800 MHz Radiofrequency Field Exposure. *Radiat Res* 189: 95–103

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

Rusten TE & Simonsen A (2008) ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle Georget Tex* 7: 1166–1172

## S

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G & Vandenabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861–2874

Sahin U, Ferhi O, Jeanne M, Benhenda S, Berthier C, Jollivet F, Niwa-Kawakita M, Faklaris O, Setterblad N, de Thé H, *et al* (2014a) Oxidative stress–induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J Cell Biol* 204: 931–945

Sahin U, Lallemand-Breitenbach V & de Thé H (2014b) PML nuclear bodies: regulation, function and therapeutic perspectives. *J Pathol* 234: 289–291

Sahin U, de Thé H & Lallemand-Breitenbach V (2014c) PML nuclear bodies: Assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation. *Nucleus* 5: 499–507

Salsman J, Stathakis A, Parker E, Chung D, Anthes LE, Koskovich KL, Lahsae S, Gaston D, Kukurba KR, Smith KS, *et al* (2017) PML nuclear bodies contribute to the basal expression of the mTOR inhibitor DDIT4. *Sci Rep* 7: 45038

Sanchez S, Milochau A, Ruffie G, Poullétier de Gannes F, Lagroye I, Haro E, Surleve-Bazeille J-EE, Billaudel B, Lassegues M & Veyret B (2006) Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals. In vitro study on isolated primary cells and reconstructed epidermis. *FEBS J* 273: 5491–507

Sánchez-Moreno A, Guevara-Hernández E, Contreras-Cervera R, Rangel-Yescas G, Ladrón-de-Guevara E, Rosenbaum T & Islas LD (2018) Irreversible temperature gating in trpv1 sheds light on channel activation. *eLife* 7: e36372

- Sandqvist A, Björk JK, Åkerfelt M, Chitikova Z, Grichine A, Vourc'h C, Jolly C, Salminen TA, Nymalm Y & Sistonen L (2009) Heterotrimerization of Heat-Shock Factors 1 and 2 Provides a Transcriptional Switch in Response to Distinct Stimuli. *Mol Biol Cell* 20: 1340–1347
- Santoro N, Johansson N & Thiele DJ (1998) Heat Shock Element Architecture Is an Important Determinant in the Temperature and Transactivation Domain Requirements for Heat Shock Transcription Factor. *Mol Cell Biol* 18: 6340–6352
- Sarria I, Ling J, Zhu MX & Gu JG (2011) TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP(2): distinction from tachyphylaxis. *J Neurophysiol* 106: 3056–3066
- Saslow W (2002) Maxwell's Equations and Electromagnetic Radiation. In pp 630–677.
- Sato S, Fujita N & Tsuruo T (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10832–10837
- Scaglioni PP, Rabellino A, Yung TM, Bernardi R, Choi S, Konstantinidou G, Nardella C, Cheng K & Pandolfi PP (2012) Translation-dependent mechanisms lead to PML upregulation and mediate oncogenic K-RAS-induced cellular senescence. *EMBO Mol Med* 4: 594–602
- Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, Singh B, Teruya-Feldstein J, Tempst P & Pandolfi PP (2006) A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126: 269–283
- Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A & Weber MJ (1998) MP1: A MEK Binding Partner That Enhances Enzymatic Activation of the MAP Kinase Cascade. *Science* 281: 1668–1671
- Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Hoffmann H-H, Michailidis E, Cetrulo Lorenzi JC, Mendoza P, Rutkowska M, Bednarski E, Gaebler C, *et al* (2020) Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J Exp Med* 217
- Schnars U & Jüptner W (1994) Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. *Appl Opt* 33: 179–181
- Scholey J, Brust-Mascher I & Mogilner A (2003) Cell Division. *Nature* 422: 746–52
- Schuermann D & Mevissen M (2021) Manmade Electromagnetic Fields and Oxidative Stress— Biological Effects and Consequences for Health. *Int J Mol Sci*: 33
- Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K & Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14: 2501–2514
- Seeler J-S & Dejean A (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 690–699
- Sekijima M, Takeda H, Yasunaga K, Sakuma N, Hirose H, Nojima T & Miyakoshi J (2010) 2-GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields have no significant effect on cell proliferation and gene expression profile in human cells. *J Radiat Res (Tokyo)* 51: 277–284
- Shahin S, Banerjee S, Swarup V, Singh SP & Chaturvedi CM (2018) From the Cover: 2.45-GHz Microwave Radiation Impairs Hippocampal Learning and Spatial Memory: Involvement of Local Stress Mechanism-Induced Suppression of iGluR/ERK/CREB Signaling. *Toxicol Sci* 161: 349–374
- Shaner NC, Lambert GG, Chamma A, Ni Y, Cranfill PJ, Baird MA, Sell BR, Allen JR, Day RN, Israelsson M, *et al* (2013) A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10: 407–409
- Sheikh AQ, Taghian T, Hemingway B, Cho H, Kogan AB & Narboneva DA (2013) Regulation of endothelial MAPK/ERK signalling and capillary morphogenesis by low-amplitude electric field. *J R Soc Interface* 10: 20120548

Sheppard AR, Swicord ML & Balzano Q (2008a) Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. *Health Phys* 95: 365–96

Sheppard AR, Swicord ML & Balzano Q (2008b) Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. *Health Phys* 95: 365–396

Shin SH, Lee EJ, Hyun S, Chun J, Kim Y & Kang SS (2012) Phosphorylation on the Ser 824 residue of TRPV4 prefers to bind with F-actin than with microtubules to expand the cell surface area. *Cell Signal* 24: 641–651

Si H, Heyken W-T, Wölfle SE, Tysiac M, Schubert R, Grgic I, Vilianovich L, Giebing G, Maier T, Gross V, *et al* (2006) Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *Circ Res* 99: 537–544

Silke J, Verhagen AM, Ekert PG & Vaux DL (2000) Sequence as well as functional similarity for DIABLO/Smac and Grim, Reaper and Hid? *Cell Death Differ* 7: 1275

Simkó M, Remondini D, Zeni O & Scarfi M (2016) Quality Matters: Systematic Analysis of Endpoints Related to “Cellular Life” in Vitro Data of Radiofrequency Electromagnetic Field Exposure. *Int J Environ Res Public Health* 13: 701

Sinica V, Zimova, Barvikova, Macikova, Barvík I & Vlachova V (2019) Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells* 9: 57

Sisco NJ, Luu DD, Kim M & Horn WDV (2020) PIRT the TRP Channel Regulating Protein Binds Calmodulin and Cholesterol-Like Ligands. 17

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, *et al* (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144: 281–292

Soncin F, Zhang X, Chu B, Wang X, Asea A, Ann Stevenson M, Sacks DB & Calderwood SK (2003) Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 700–706

Song X, Wang C, Hu H, Yu C & Bai C (2011) Microwave induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cell line. *Chin Med J (Engl)* 124: 1193–1198

Song Y, Zhan L, Yu M, Huang C, Meng X, Ma T, Zhang L & Li J (2014) TRPV4 channel inhibits TGF- $\beta$ 1-induced proliferation of hepatic stellate cells. *PLoS One* 9: e101179

Sorger PK & Nelson HC (1989) Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59: 807–813

Sorger PK & Pelham HR (1988) Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54: 855–864

Söti C, Rácz A & Csermely P (2002) A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J Biol Chem* 277: 7066–7075

SSM’s Scientific Council on Electromagnetic Fields (2020) Recent Research on EMF and Health Risk - Fourteenth report from SSM’s Scientific Council on Electromagnetic Fields, 2019

Stadler M, Chelbi-Alix MK, Koken MH, Venturini L, Lee C, Saïb A, Quignon F, Pelicano L, Guillemain MC & Schindler C (1995) Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 11: 2565–2573

de Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G & Lowe SW (2004) PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13: 523–535

- Stehmeier P & Muller S (2009) Phospho-Regulated SUMO Interaction Modules Connect the SUMO System to CK2 Signaling. *Mol Cell* 33: 400–409
- Stepp WH, Meyers JM & McBride AA (2013) Sp100 provides intrinsic immunity against human papillomavirus infection. *mBio* 4: e00845-00813
- Stern S, Margolin L, Weiss B, Lu ST & Michaelson SM (1979) Microwaves: effect on thermoregulatory behavior in rats. *Science* 206: 1198–1201
- Streich FC & Lima CD (2014) Structural and Functional Insights to Ubiquitin-Like Protein Conjugation. *Annu Rev Biophys* 43: 357–379
- Strotmann R, Semtner M, Kepura F, Plant TD & Schöneberg T (2010) Interdomain Interactions Control Ca<sup>2+</sup>-Dependent Potentiation in the Cation Channel TRPV4. *PLoS ONE* 5: e10580
- Stroupe C (2011) Autophagy: Cells SNARE Selves. *Curr Biol* 21: R697–R699
- Stryer L (1978) Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annu Rev Biochem* 47: 819–846
- Subbarao Sreedhar A, Kalmár É, Csermely P & Shen Y-F (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 562: 11–15
- Sun C, Wei X, Fei Y, Su L, Zhao X, Chen G & Xu Z (2016) Mobile phone signal exposure triggers a hormesis-like effect in Atm<sup>+/+</sup> and Atm<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts. *Sci Rep* 6: 37423
- Sun Y, Liu W-ZZ, Liu T, Feng X, Yang N & Zhou H-FF (2015) Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 35: 600–4
- Sundhar K & Miller LC (2017) 5G For Dummies John Wiley & Sons, Inc.
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T & Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20: 5971–5981
- Suzuki K & Ohsumi Y (2007) Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 581: 2156–2161
- Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K & Imai M (2003a) Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278: 22664–22668
- Suzuki M, Watanabe Y, Oyama Y, Mizuno A, Kusano E, Hirao A & Ookawara S (2003b) Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci Lett* 353: 189–192
- Szymanski L, Cios A, Lewicki S, Szymanski P & Stankiewicz W (2018a) Fas/FasL pathway and cytokines in keratinocytes in atopic dermatitis - Manipulation by the electromagnetic field. *PLoS One* 13: e0205103
- Szymanski L, Cios A, Lewicki S, Szymanski P & Stankiewicz W (2018b) Fas/FasL pathway and cytokines in keratinocytes in atopic dermatitis – Manipulation by the electromagnetic field. *PLOS ONE* 13: e0205103

## T

- Tableau de bord des expérimentations 5G en France *Arcep*
- Taflove A & Hagness SC (1995) Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time-Domain Method 3rd edition. Boston: Artech House
- Takeda-Nakazawa H, Harada N, Shen J, Kubo N, Zenner H-P & Yamashita T (2007) Hyposmotic stimulation-induced nitric oxide production in outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 230: 93–104

Takemori Y, Enoki Y, Yamamoto N, Fukai Y, Adachi K & Sakurai H (2009) Mutational analysis of human heat-shock transcription factor 1 reveals a regulatory role for oligomerization in DNA-binding specificity. *Biochem J* 424: 253–261

Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Liu XD, Liu PC, Thiele DJ & Nakai A (1999) The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J Biol Chem* 274: 27845–27856

Tang J, Zhang Y, Yang L, Chen Q, Tan L, Zuo S, Feng H, Chen Z & Zhu G (2015) Exposure to 900 MHz electromagnetic fields activates the mmp-1/ERK pathway and causes blood-brain barrier damage and cognitive impairment in rats. *Brain Res* 1601: 92–101

Tatham M, Geoffroy M-C, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray E, Palvimo J & Hay R (2008) RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10: 538–46

Terris B, Baldin V, Dubois S, Degott C, Flejou JF, Hénin D & Dejean A (1995) PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res* 55: 1590–1597

Tessier S, Martin-Martin N, de Thé H, Carracedo A & Lallemand-Breitenbach V (2017) Promyelocytic Leukemia Protein, a Protein at the Crossroad of Oxidative Stress and Metabolism. *Antioxid Redox Signal* 26: 432–444

Teter SA, Eggerton KP, Scott SV, Kim J, Fischer AM & Klionsky DJ (2001) Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem* 276: 2083–2087

de Thé H, Le Bras M & Lallemand-Breitenbach V (2012) The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *J Cell Biol* 198: 11–21

The Nobel Prize in Physics 1971 [NobelPrize.org](http://NobelPrize.org)

Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, McCafferty GP, Chendrimada TP, Lashinger ESR, Gordon E, Evans L, *et al* (2008) N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[2,4-Dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a Novel and Potent Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel Agonist Induces Urinary Bladder Contraction and Hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 432–442

Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ & Luttrell LM (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 277: 9429–9436

Tombe F (2020) The Significance of the Poynting Vector.

Topol J, Ruden DM & Parker CS (1985) Sequences required for in vitro transcriptional activation of a *Drosophila* hsp 70 gene. *Cell* 42: 527–537

Towers CG, Wodetzki D & Thorburn A (2019) Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *J Cell Biol* 219: e201909033

Transient receptor potential vanilloid 4 inhibits rat HSC-T6 apoptosis through induction of autophagy - PubMed

Tsoy A, Saliev T, Abzhanova E, Turgambayeva A, Kaiyrylykzy A, Akishev M, Saparbayev S, Umbayev B & Askarova S (2019) The Effects of Mobile Phone Radiofrequency Electromagnetic Fields on  $\beta$ -Amyloid-Induced Oxidative Stress in Human and Rat Primary Astrocytes. *Neuroscience* 408: 46–57

## U



Ueda T, Shikano M, Kamiya T, Joh T & Ugawa S (2011) The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca<sup>2+</sup> in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 301: G138–G147

Urizar E, Yano H, Kolster R, Galés C, Lambert N & Javitch JA (2011) CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nat Chem Biol* 7: 624–630

## V

Valbonesi P, Franzellitti S, Bersani F, Contin A & Fabbri E (2014a) Effects of the exposure to intermittent 1.8 GHz radio frequency electromagnetic fields on HSP70 expression and MAPK signaling pathways in PC12 cells. *Int J Radiat Biol* 90: 382–91

Valbonesi P, Franzellitti S, Bersani F, Contin A & Fabbri E (2014b) Effects of the exposure to intermittent 1.8 GHz radio frequency electromagnetic fields on HSP70 expression and MAPK signaling pathways in PC12 cells. *Int J Radiat Biol* 90: 382–391

Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch | American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology

Vassort G & Fauconnier J (2008) Les canaux TRP (transient receptor potential) - Une nouvelle famille de canaux à expression variée. *médecine/sciences* 24: 163–168

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

vecchia P, R M, G Z, J L, R S, A S, & ICNIRP (2009b) Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz) 1st ed. ICNIRP

Vennekens R, Menigoz A & Nilius B (2012) TRPs in the Brain. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 163: 27–64

Verduijn J, Van der Meeren L, Krysko DV & Skirtach AG (2021) Deep learning with digital holographic microscopy discriminates apoptosis and necroptosis. *Cell Death Discov* 7: 1–10

Verma P, Kumar A & Goswami C (2010) TRPV4-mediated channelopathies. *Channels Austin Tex* 4: 319–328

Vertegaal ACO (2010) SUMO chains: polymeric signals. *Biochem Soc Trans* 38: 46–49

Vincent F, Acevedo A, Nguyen MT, Dourado M, DeFalco J, Gustafson A, Spiro P, Emerling DE, Kelly MG & Duncton MAJ (2009) Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 490–4

Voellmy R (2006) Feedback regulation of the heat shock response. *Handb Exp Pharmacol*: 43–68

Voellmy R & Boellmann F (2007) Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol* 594: 89–99

Voisset E, Moravcsik E, Stratford EW, Jaye A, Palgrave CJ, Hills RK, Salomoni P, Kogan SC, Solomon E & Grimwade D (2018) Pml nuclear body disruption cooperates in APL pathogenesis and impairs DNA damage repair pathways in mice. *Blood* 131: 636–648

Vomastek T, Schaeffer H-J, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA & Weber MJ (2004) Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6981–6986

Voss AK, Thomas T & Gruss P (2000) Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Dev Camb Engl* 127: 1–11

Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T & 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

Vuister GW, Kim S-J, Orosz A, Marquardt J, Wu C & Bax A (1994) Solution structure of the DNA-binding domain of Drosophila heat shock transcription factor. *Nat Struct Biol* 1: 605–614

Wallach D, Boldin M, Goncharov T, Goltsev Y, Mett I, Malinin N, Adar R, Kovalenko A & Varfolomeev E (1996) Exploring cell death mechanisms by analyzing signaling cascades of the TNF/NGF receptor family. *Behring Inst Mitt*: 144–155

## W

Wandinger SK, Richter K & Buchner J (2008) The Hsp90 Chaperone Machinery. *J Biol Chem* 283: 18473–18477

Wang H & Woolf CJ (2005) Pain TRPs. *Neuron* 46: 9–12

Wang L, Cvetkov TL, Chance MR & Moiseenkova-Bell VY (2012) Identification of in vivo disulfide conformation of TRPA1 ion channel. *J Biol Chem* 287: 6169–6176

Wang L-FF, Li X, Gao Y-BB, Wang S-MM, Zhao L, Dong J, Yao B-WW, Xu X-PP, Chang G-MM, Zhou H-MM, *et al* (2015) Activation of VEGF/Flk-1-ERK Pathway Induced Blood-Brain Barrier Injury After Microwave Exposure. *Mol Neurobiol* 52: 478–91

Wang P, Benhenda S, Wu H, Lallemand-Breitenbach V, Zhen T, Jollivet F, Peres L, Li Y, Chen S-J, Chen Z, *et al* (2018) RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nat Commun* 9: 1277

Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M & Noguchi K (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain J Neurol* 131: 1241–1251

Wang X, Khaleque MA, Zhao MJ, Zhong R, Gaestel M & Calderwood SK (2006) Phosphorylation of HSF1 by MAPK-Activated Protein Kinase 2 on Serine 121, Inhibits Transcriptional Activity and Promotes HSP90 Binding \*. *J Biol Chem* 281: 782–791

Wang X & Tournier C (2006) Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* 18: 753–760

Wang Y, Jiang Z, Zhang L, Zhang Z, Liao Y & Cai P (2022) 3.5-GHz radiofrequency electromagnetic radiation promotes the development of Drosophila melanogaster. *Environ Pollut* 294: 118646

Wang Y, Zhang H, Zhang Z, Sun B, Tang C, Zhang L, Jiang Z, Ding B, Liao Y & Cai P (2021) Simulated mobile communication frequencies (3.5 GHz) emitted by a signal generator affects the sleep of Drosophila melanogaster. *Environ Pollut* 283: 117087

Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi R & Pandolfi PP (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20: 266–272

Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G & Nilius B (2002) Heat-evoked Activation of TRPV4 Channels in a HEK293 Cell Expression System and in Native Mouse Aorta Endothelial Cells \*. *J Biol Chem* 277: 47044–47051

Watilliaux A, Edeline J-M, Lévêque P, Jay TM & Mallat M (2011) Effect of Exposure to 1,800 MHz Electromagnetic Fields on Heat Shock Proteins and Glial Cells in the Brain of Developing Rats. *Neurotox Res* 20: 109–119

Wegierski T, Lewandrowski U, Müller B, Sickmann A & Walz G (2009) Tyrosine phosphorylation modulates the activity of TRPV4 in response to defined stimuli. *J Biol Chem* 284: 2923–2933

Weisshaar SR, Keusekotten K, Krause A, Horst C, Springer HM, Götsche K, Dohmen RJ & Praefcke GJK (2008) Arsenic trioxide stimulates SUMO-2/3 modification leading to RNF4-dependent proteolytic targeting of PML. *FEBS Lett* 582: 3174–3178

Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Sistonen L & Morimoto RI (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323: 1063–1066

White JPM, Cibelli M, Urban L, Nilius B, McGeown JG & Nagy I (2016) TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiol Rev* 96: 911–973

Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD & Davis RJ (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269: 403–407

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB & Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143–180

Wilson P (2017) Chapter 1 - Grounding and Wiring. In *The Circuit Designer's Companion (Fourth Edition)*, Wilson P (ed) pp 1–47. Newnes

Wilson T & Hastings JW (1998) Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 197–230

Wojtkowiak JW, Rothberg JM, Kumar V, Schramm KJ, Haller E, Proemsey JB, Lloyd MC, Sloane BF & Gillies RJ (2012) Chronic Autophagy Is a Cellular Adaptation to Tumor Acidic pH Microenvironments. *Cancer Res* 72: 3938–3947

Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR & Martin P (2000) Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Dev Camb Engl* 127: 5245–5252

World Health Organization & Safety IP on C (1993) Electromagnetic fields (300 Hz to 300 GHz) World Health Organization

Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F & Huber LA (2001) A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* 152: 765–776

## X

Xiao H & Lis JT (1988) Germline Transformation Used to Define Key Features of Heat-Shock Response Elements. *Science* 239: 1139–1142

Xiao H, Perisic O & Lis JT (1991) Cooperative binding of drosophila heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* 64: 585–593

Xiaolan W, Feng W, Lanzhigao & Ruian C (2011) Understanding and Application of Gauss Theorem in Electrostatic Field.

Xing H, Chen M, Ling J, Tan W & Gu JG (2007) TRPM8 Mechanism of Cold Allodynia after Chronic Nerve Injury. *J Neurosci* 27: 13680–13690

Xu C, Liu R, Zhang Q, Chen X, Qian Y & Fang W (2016) The Diversification of Evolutionarily Conserved MAPK Cascades Correlates with the Evolution of Fungal Species and Development of Lifestyles. *Genome Biol Evol* 9: 311–322

Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, *et al* (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418: 181–186

Xu L, Han Y, Chen X, Aierken A, Wen H, Zheng W, Wang H, Lu X, Zhao Z, Ma C, *et al* (2020) Molecular mechanisms underlying menthol binding and activation of TRPM8 ion channel. *Nat Commun* 11: 3790

Xu P & Roizman B (2017) The SP100 component of ND10 enhances accumulation of PML and suppresses replication and the assembly of HSV replication compartments. *Proc Natl Acad Sci* 114: 201703395

Xu S, Chen G, Chen C, Sun C, Zhang D, Murbach M, Kuster N, Zeng Q & Xu Z (2013) Cell Type-Dependent Induction of DNA Damage by 1800 MHz Radiofrequency Electromagnetic Fields Does Not Result in Significant Cellular Dysfunctions. *PLoS ONE* 8: e54906

Xu Y, Piston DW & Johnson CH (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci* 96: 151–156

Xu Y-M, Huang D-Y, Chiu J-F & Lau ATY (2012) Post-Translational Modification of Human Heat Shock Factors and Their Functions: A Recent Update by Proteomic Approach. *J Proteome Res* 11: 2625–2634

Xu Z-X, Zou W-X, Lin P & Chang K-S (2005) A role for PML3 in centrosome duplication and genome stability. *Mol Cell* 17: 721–732

## Y

Yamada H, Tada-Oikawa S, Uchida A & Kawanishi S (1999) TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 130–133

Yamamoto N, Takemori Y, Sakurai M, Sugiyama K & Sakurai H (2009) Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family. *FEBS J* 276: 1962–1974

Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Morita A & Shimada S (2008) TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *Am J Physiol-Cell Physiol* 295: C296–C301

Yan W, Yan M, Ruan Z & Qiu M (2008) Coordinate transformations make perfect invisibility cloaks with arbitrary shape. *New J Phys* 10: 043040

Yang H, Zhang Y, Wu X, Gan P, Luo X, Zhong S & Zuo W (2022) Effects of Acute Exposure to 3500 MHz (5G) Radiofrequency Electromagnetic Radiation on Anxiety-Like Behavior and the Auditory Cortex in Guinea Pigs. *Bioelectromagnetics* 43: 106–118

Yang J, Cumberbatch D, Centanni S, Shi S-QQ, Winder D, Webb D & Johnson CH (2016) Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca<sup>++</sup>sensing. *Nat Commun* 7: 13268

Yang S, Kuo C, Bisi JE & Kim MK (2002) PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* 4: 865–870

Yang X, Yu D-D, Yan F, Jing Y, Han Z-P, Sun K, Liang L, Hou J & Wei L-X (2015) The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci* 5: 14

Yaribeygi H, Panahi Y, Sahraei H, Johnston TP & Sahebkar A (2017) The impact of stress on body function: A review. *EXCLI J* 16: 1057–1072

Yin J, Yang Z, Cao H, Liu T, Zhou Z & Wu C (2019) A Survey on Bluetooth 5.0 and Mesh: New Milestones of IoT. *ACM Trans Sens Netw* 15: 1–29

- Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC & Lee S-Y (2018) Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science* 359: 237–241
- Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E & Eskelinen E-L (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5: 1180–1185
- Yoon S & Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24: 21–44
- Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP & Kitabayashi I (2007) PML-Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  Inhibits PML IV Enhancement of PU.1-Induced C/EBP $\epsilon$  Expression in Myeloid Differentiation. *Mol Cell Biol* 27: 5819–5834
- Young JTF & Heikkilä JJ (2010) Proteasome inhibition induces hsp30 and hsp70 gene expression as well as the acquisition of thermotolerance in *Xenopus laevis* A6 cells. *Cell Stress Chaperones* 15: 323–334
- Yu Y, Yao K, Wu W, Wang K, Chen G & Lu D (2008) Effects of exposure to 1.8 GHz radiofrequency field on the expression of Hsps and phosphorylation of MAPKs in human lens epithelial cells. *Cell Res* 18: 1233–5
- Yuan J & Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802–809
- Yuan W & Krug RM (2001) Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J* 20: 362–371
- Yuan W-C, Lee Y-R, Huang S-F, Lin Y-M, Chen T-Y, Chung H-C, Tsai C-H, Chen H-Y, Chiang C-T, Lai C-K, *et al* (2011) A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. *Cancer Cell* 20: 214–228

## Z

- Zhang D-W, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu B-J, Lin S-C, Dong M-Q & Han J (2009) RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325: 332–336
- Zhang L, Stuber F, Lippuner C, Schiff M & Stamer UM (2016) Phorbol-12-myristate-13-acetate induces nociceptin in human Mono Mac 6 cells via multiple transduction signalling pathways. *Br J Anaesth* 117: 250–257
- Zhang Q, Kang R, Zeh, III HJ, Lotze MT & Tang D (2013) DAMPs and autophagy. *Autophagy* 9: 451–458
- Zhang X-W, Yan X-J, Zhou Z-R, Yang F-F, Wu Z-Y, Sun H-B, Liang W-X, Song A-X, Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, *et al* (2010) Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR $\alpha$  oncoprotein by directly binding PML. *Science* 328: 240–243
- Zhang Y, Frejtag W, Dai R & Mivechi NF (2001) Heat shock factor-4 (HSF-4a) is a repressor of HSF-1 mediated transcription. *J Cell Biochem* 82: 692–703
- Zhang Y, Murshid A, Prince T & Calderwood SK (2011) Protein Kinase A Regulates Molecular Chaperone Transcription and Protein Aggregation. *PLOS ONE* 6: e28950
- Zhao L, Yang Y-FF, Gao Y-BB, Wang S-MM, Wang L-FF, Zuo H-YY, Dong J, Xu X-PP, Su Z-TT, Zhou H-MM, *et al* (2014a) Upregulation of HIF-1 $\alpha$  via activation of ERK and PI3K pathway mediated protective response to microwave-induced mitochondrial injury in neuron-like cells. *Mol Neurobiol* 50: 1024–34

Zhao P, Lieu T, Barlow N, Metcalf M, Veldhuis NA, Jensen DD, Kocan M, Sostegni S, Haerteis S, Baraznenok V, *et al* (2014b) Cathepsin S causes inflammatory pain via biased agonism of PAR2 and TRPV4. *J Biol Chem* 289: 27215–27234

Zhao P, Lieu T, Barlow N, Sostegni S, Haerteis S, Korbmacher C, Liedtke W, Jimenez-Vargas NN, Vanner SJ & Bunnett NW (2015) Neutrophil Elastase Activates Protease-activated Receptor-2 (PAR2) and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) to Cause Inflammation and Pain. *J Biol Chem* 290: 13875–13887

Zhong H, Ceballos CC, Massengill CI, Muniak MA, Ma L, Qin M, Petrie SK & Mao T (2021) High-fidelity, efficient, and reversible labeling of endogenous proteins using CRISPR-based designer exon insertion. *eLife* 10: e64911

Zhou W, Feng X, Wu Y, Bengel J, Zhang Z & Chen Z (2009) FGF-receptor substrate 2 functions as a molecular sensor integrating external regulatory signals into the FGF pathway. *Cell Res* 19: 1165–1177

Zhu X, Guo W & Wu X (2012) Frequency- and temperature-dependent dielectric properties of fruit juices associated with pasteurization by dielectric heating. *J Food Eng* 109: 258–266

Zuo H, Lin T, Wang D, Peng R, Wang S, Gao Y, Xu X, Zhao L, Wang S & Su Z (2015) RKIP Regulates Neural Cell Apoptosis Induced by Exposure to Microwave Radiation Partly Through the MEK/ERK/CREB Pathway. *Mol Neurobiol* 51: 1520–9

Annexe 1 – Tableau réunissant les paramètres d'expositions des références de la partie sur le bioélectromagnétisme des protéines de la voie MAPK

Référence	Cellules	Porteuse	DAS	Modulation	Durée	Effet
Buttiglione et al, 2007a	Neuroblastome humain SH-SY5Y	900 MHz	1 W/kg	GSM	5, 15, 30 min, 6h et 24 h	Augmentation de l'expression du gène Egr-1 (activateur de l'apoptose), des protéines MAPK ERK1/2 et SAPK/JNK, et diminution de l'expression de Bcl-2 et la survivine (inhibiteurs de l'apoptose).
Caraglia et al, 2005	Carcinome épidermoïde oropharyngé humain KB	1 950 MHz	3,6 ± 0,2 mW/g	CW	1, 2 ou 3h	45 % d'apoptose en plus après 3h d'exposition, 2,5 fois moins de RAS et RAF-1, 2,5 fois moins d'activité de RAS et ERK. Diminution de l'activité de p38 et de l'expression de HSP90.
Friedman et al, 2007	Rat1 et HeLa	875 MHz	0.07 mW/cm2 à 0.31 mW/cm2	CW	0, 5, 10, 15, 20, 30 min	Augmentation de l'activité de JNK-1 et de l'expression de HSP27 et 70. Activation de ERK, production de ROS et NADH oxydase
Kim et al, 2012	Cellules épithéliales mammaires humaines MCF10A	837 MHz (CDMA) 1 950 MHz (WCDMA)	4 W/kg 2 W/kg par onde pour co-exposition CDMA+WCDMA	CDMA et WCDMA	2 et 4h par jour durant 3 jours	Aucun effet sur HSP27 et ERK1/2 quel que soit le signal, la combinaison, ou les répétitions testées.
Liu et al, 2014	Spermatocytes de souris GC-2	1 800 MHz	2 et 4 W/kg	GSM	24h	Autophagie et des dommages à l'ADN dans les cellules GC-2 via la génération de ROS et l'activation de ERK. Pas d'effets sur l'apoptose.

Marinelli et al, 2004	acute T-lymphoblastoid leukemia cells (CCRF-CEM)	900 MHz	3,5 mW/kg	CW	2, 4, 12, 24, et 48h	2-12 h d'exposition : Ruptures de l'ADN et déclenchement de l'apoptose 24-48h d'exposition : Activation de RAS, Bcl2 et Akt1.
Shahin et al, 2018	Hippocampe de souris	2 450 MHz	0.0146 W/kg	CW	15, 30 et 60 jours	Apprentissage lent ; CRH, CRH-R1, i-NOS, corticostérone sérique augmentée; iGluR, n-NOS, PSD-95, protéine kinase C $\epsilon$ , protéine kinase A, ERK-p-ERK, CREB et p-CREB diminuée.
Sheikh et al, 2013	Cellules endothéliales	7 500 MHz	0,1 W/kg	Pulses 4,5 ms 15 Hz ou 50 Hz 0,3 ms	12 à 24h	Augmentation de la phosphorylation de ERK mais pas JNK ou p38. Augmentation de l'activité de MEK-cRaf, MEK et de l'angiogénèse. Pas d'effet sur la prolifération et l'apoptose.
Szymanski et al, 2018	HaCaT, PCS-200-010, cellules endothéliales humaines EA.hy926 saines et de dermatite atopique (DA)	900 MHz	0,024 W/kg	Impulsion de 570 $\mu$ s toutes les 1,14 ms	1h	Baisse de l'expression de Fas, FasL, p-ERK, p-JNK et p-p38 MAPK, et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-31 et TNF $\alpha$ dans les kératinocytes AD.
Tang et al, 2015	Hippocampe, cortex, barrière hématoencéphalique de rat	900 MHz	0,016 W/kg corps entier et 2 W/kg sur la tête	CW	3h par jours pendant 14 ou 28 jours	Augmentation de p-ERK et p-JNK mais pas de p-p38 MAPK dans les cellules HaCaT. 28 jours: Altération de manière significative la mémoire spatiale et endommagement de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique chez le rat en activant la voie mdkp-1/ERK.
Tsoy et al, 2019	Astrocytes primaires humains et de rat	918 MHz	0,20 W/kg	Pulse de 0,580 ms, répétition 217 Hz	24h	Réduction des ROS et inhibition de la phosphorylation induite par H2O2 de p38MAPK et ERK1/2.
Valbonesi et al, 2014a	PC12	1 800 MHz	2 W/kg	CW, GSM-217Hz, GSM-talk	4, 16 ou 24 h	Augmentation de l'expression d'ARNm de HSP70 avec une modulation GSM-217Hz.
Wang et al, 2015	ECV304 (Cellule de carcinome de vessie humaine) et Astrocytes primaires de rat	2 856 MHz	50 mW/cm2	500 pulses par seconde d'une durée de 500 ns	5 minutes	Domages à la barrière hémato-encéphalique en activant la voie VEGF/Flk-1-ERK, améliorant la phosphorylation de Tyr de l'occludine, tout en inhibant partiellement l'expression et l'interaction de l'occludine avec la zonula occludens-1.



Yu et al, 2008	Cellules épithéliales du cristallin humain	1 800 MHz	2, 3, 4 W/kg	CW	0, 5, 15, 30, 60 et 120 min	Augmentation de l'expression de HSP27 et 70 et la phosphorylation de ERK1/2, et JNK1/2. Pas d'effet sur P38.
Zhao et al, 2014a	PC12 (dérivées de phéochromocytome de rat)	2 856 MHz d'après une référence (non dit dans l'article)	30 mW/cm <sup>2</sup>	(non dit dans l'article)	5 min	Augmentation de HIF-1 $\alpha$ via l'activation des voies ERK et PI3K.
Zuo et al, 2015	PC12	2 856 MHz	19 W/kg	CW	5 min	RKIP régule l'apoptose des cellules neurales induite par l'exposition au rayonnement par la voie MEK/ERK/CREB

Annexe 2 – Tableau réunissant les paramètres d'expositions des références de la partie sur le bioélectromagnétisme des protéines HSF& HSP

Référence	Cellules	Porteuse	DAS	Modulation	Durée	Effet
Kwee et al, 2001	Cellules amniotiques épithéliales humaines transformées (AIMA)	960 MHz	2,1 mW/kg	GSM	20 min	Augmentation de production de HSP70, mais pas de HSP27.
Aït-Aïssa et al, 2013	Hippocampe et cortex de rat	2 450 MHz	0, 0,08, 0,4 et 4 W/kg	WiFi	2h par jours du jour 6 à 21 de gestation et les 5 premières semaines de vie	L'expression de 3-NT (marqueur de ROS) et de protéines Hsp25 and Hsp70 dans différentes zones de l'hippocampe et du cortex n'a pas varié avec et sans exposition.
Calabrò, 2012	SH-SY5Y	1 800 MHz	0,086 W/kg	GSM	2 ou 4h	Pas d'effet sur la viabilité cellulaire, l'expression de Hsp27, l'activité de la caspase-3 (et donc l'apoptose). Diminution de l'expression de Hsp20 à 2h et 4h, et augmentation à 4h pour Hsp70.
Ennamany et al, 2008	Epiderme humain reconstitué (RHE)	900 MHz	Inconnu	Inconnu	6h	33 gènes dont la régulation est augmentée (dont HSP 27, 70, 90), 10 dont la régulation est diminuée.
IARC, 2013					Revue	
Kesari et al, 2014	Cerveau de rat	2 115 MHz	0,26 W/kg	UMTS	2h par jours pendant 60 jours	Augmentation de la rupture double brin de l'ADN, de l'apoptose, du risque de fragmentation de l'ADN, du cytochrome c, des protéines de choc thermique, de Bax et de Bcl-2, surproduction de ROS. "Les radiations des téléphones portables 3G affectent le fonctionnement du cerveau et provoquent plusieurs troubles neurologiques."

Kim et al, 2012	Cellules épithéliales mammaires humaines MCF10A	837 MHz (CDMA) 1 950 MHz (WCDMA)	4 W/kg 2 W/kg par onde pour co-exposition CDMA+WCDMA	CDMA et WCDMA	2 et 4h par jour durant 3 jours	Aucun effet sur HSP27 et ERK1/2 quel que soit le signal, la combinaison, ou les répétitions testées.
Leszczynski et al, 2002, 27	cellules endothéliales humaines EA.hy926	900 MHz	1,8 à 2,5 W/kg (moyenne de 2 W/kg)	GSM	1 h	Activation des voies hsp27/p38MAPK.
Lixia et al, 2006	SRA01/04-hLEC	1 800 MHz	1, 2, et 3 W/kg	GSM, TDMA	30, 60, 120, 240 min	Dommmages à l'ADN à 3 W/kg entre 0 et 30 min après l'exposition. Augmentation de HSP70 à 2 et 3 W/kg après 2h d'exposition. Pas d'effet sur la prolifération.
López-Furelos et al, 2016	Cerveau et le cervelet de rats	Signaux combinés 900 ou 2 450 MHz ou les deux	Corps : 0,07 - 0,09 W/kg Cerveau : 0,02 - 0,16 W/kg Cervelet : 0,04 - 0,17 W/kg	CW	1 à 2h	Augmentation des niveaux de HSP 90, 70 et de caspase-3.
McNamee & Chauhan, 2009						
Miyakoshi et al, 2019	cellules épithéliales cornéennes humaines (HCE-T)	5 800 MHz	1 mW/cm2	CW	24h	Pas d'effet sur la rupture de brin d'ADN ou l'expression de la protéine Hsp27, Hsp70 et Hsp 90α
Novoselova et al, 2017	RAW 264.7 Macrophages	De 8 500 à 18 000 MHz (balayage de 1 Hz)	1 μW/cm2	CW	1h	La cascade de signalisation p38 MAPK est directement impliquée dans la réponse des macrophages aux RF.
Sanchez et al, 2006	Fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF) et épiderme humain reconstruit (hRE)	900 MHz	2W/kg	GSM	48h	Pas d'effet sur l'apoptose, la nécrose, l'épaisseur, la prolifération. Augmentation de l'expression de HSP70.

Sepehrimanes et al, 2014	Testicule de rat	900 MHz	0,19 à 1,22 W/kg	GSM	1, 2 ou 4h par jour pendant 30 jours	Induction de protéines HSP. Modification du stress oxydatif, et de protéines du cytosquelette.
Valbonesi et al, 2014b	PC12	1 800 MHz	2 W/kg	CW, GSM-217Hz, GSM-talk	4, 16 ou 24 h	Augmentation de l'expression d'ARNm de HSP70 avec une modulation GSM-217Hz.
vecchia et al, 2009						Revue
Watilliaux et al, 2011	Cerveaux de rat	1 800 MHz	1,7 à 2,5 W/kg	GSM	2h	Pas d'effet la quantité de HSP60, HSC70 ou HSP90, sur la sérine racémase, les transporteurs de glutamate, y compris GLT1 et GLAST, ou sur la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) dans des extraits de tissus totaux ou solubles. Aucune différence dans la morphologie ou la distribution des cellules microgliales.
Yang et al, 2012	Hippocampe de rat	2 450 MHz	6 W/kg	Pulses de 2 ms avec une répétition de 500 pps	20 min	Augmentation du niveau d'expression de HSP70 et HSP27.



# ANNEXE 3 – ARTICLES EN SECOND OU TROISIÈME AUTEUR






## Article 1

**Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel  
Activity in Response to Hypoxia**



## Article

# Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia

Solène Barbeau<sup>1,2</sup>, Alexandre Joushomme<sup>3,4,†</sup>, Yann Chappe<sup>3,4,†</sup>, Guillaume Cardouat<sup>1,2</sup>, Isabelle Baudrimont<sup>1,2</sup> , Véronique Freund-Michel<sup>1,2</sup>, Christelle Guibert<sup>1,2</sup> , Roger Marthan<sup>1,2,5</sup> , Patrick Berger<sup>1,2,5</sup> , Pierre Vacher<sup>1,2</sup> , Yann Percherancier<sup>3,4</sup>, Jean-François Quignard<sup>1,2</sup> and Thomas Ducret<sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Univ. Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France; solene.barbeau@u-bordeaux.fr (S.B.); guillaume.cardouat@u-bordeaux.fr (G.C.); isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr (I.B.); veronique.michel@u-bordeaux.fr (V.F.-M.); christelle.guibert@u-bordeaux.fr (C.G.); roger.marthan@u-bordeaux.fr (R.M.); patrick.berger@u-bordeaux.fr (P.B.); pierre.vacher@inserm.fr (P.V.); jean-francois.quignard@u-bordeaux.fr (J.-F.Q.)
  - <sup>2</sup> INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France
  - <sup>3</sup> Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, UMR5518, Univ. Bordeaux, F-33400 Talence, France; alexandre.joushomme@u-bordeaux.fr (A.J.); yann.chappe@u-bordeaux.fr (Y.C.); yann.percherancier@u-bordeaux.fr (Y.P.)
  - <sup>4</sup> CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Laboratoire de L'integration du Matériau au Système, UMR5518, F-33400 Talence, France
  - <sup>5</sup> CHU (Centre Hospitalier Universitaire) Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, F-33600 Pessac, France
- \* Correspondence: thomas.ducret@u-bordeaux.fr  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Barbeau, S.; Joushomme, A.; Chappe, Y.; Cardouat, G.; Baudrimont, I.; Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Marthan, R.; Berger, P.; Vacher, P.; et al. Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia. *Biomolecules* **2022**, *12*, 954. <https://doi.org/10.3390/biom12070954>

Academic Editors: Jeffrey Stuart and Fereshteh Moradi

Received: 13 May 2022

Accepted: 14 June 2022

Published: 7 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is a polymodal Ca<sup>2+</sup>-permeable channel involved in various hypoxia-sensitive pathophysiological phenomena. Different tools are available to study channel activity, requiring cells to be cultured at specific optimal densities. In the present study, we examined if cell density may influence the effect of hypoxia on TRPV4 activity. Transiently TRPV4-transfected HEK293T cells were seeded at low or high densities corresponding to non-confluent or confluent cells, respectively, on the day of experiments, and cultured under in vitro normoxia or hypoxia. TRPV4-mediated cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses, single-channel currents, and Ca<sup>2+</sup> influx through the channel were measured using Ca<sup>2+</sup> imaging/microspectrofluorimetric assay, patch-clamp, and Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), respectively. TRPV4 plasma membrane translocation was studied using confocal microscopy, biotinylation of cell surface proteins, and BRET. Our results show that hypoxia exposure has a differential effect on TRPV4 activation depending on cell confluence. At low confluence levels, TRPV4 response is increased in hypoxia, whereas at high confluence levels, TRPV4 response is strongly inhibited, due to channel internalization. Thus, cell density appears to be a crucial parameter for TRPV4 channel activity.

**Keywords:** BRET; calcium; cell culture conditions; cell density; patch-clamp; stretch-activated channel; TRP channel

## 1. Introduction

Transient receptor potential (TRP) channels constitute a superfamily of non-selective cationic channels that exhibit a common structure. They are composed of N- and C-terminal regions containing protein interaction motifs and six transmembrane domains (TM1-TM6). The putative ion conducting pore is located between the fifth and sixth TM domains. According to their activation stimuli and the presence of regulatory domains on the cytosolic



N- and C-termini, the TRP superfamily is subdivided into seven main subfamilies: TRPC1-7 (Canonical), TRPV1-6 (Vanilloid), TRPM1-8 (Melastatin), TRPP1-4 (Polycystin), TRPML1-3 (Mucolipin), TRPA1 (Ankyrin), and TRPN (no mechanoreceptor potential C, also named NOMPC). Functional TRPs are composed of four homo- or heteromultimeric subunits.

Among TRPV channels, TRPV4 is a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel whose expression in mammals is widespread throughout the body: ear, eye, skin, cardiovascular, digestive, immune, musculoskeletal, nervous, reproductive, and respiratory systems (for review see [1]). Due to its  $\text{Ca}^{2+}$  permeability ( $\text{PCa}/\text{PNa} \approx 7$  in HEK293 cells transiently transfected with wild type TRPV4, [2]), activation of TRPV4 induces an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) which plays a key role in fundamental cellular processes such as apoptosis, contraction, migration, and proliferation in many cell types. Thus, owing to its ubiquitous expression and its role in mediating  $\text{Ca}^{2+}$  influx, it is now recognized that TRPV4 supports a great number of roles in various physiological and disease states [3].

A wide variety of stimuli, including physical (cell swelling and shear stress), thermal (moderate heat), and chemical (endogenous and exogenous ligands) stimuli such as the arachidonic acid metabolite epoxyeicosatrienoic acid and the synthetic agonist GSK-1016790A, in particular [4], activate TRPV4. In addition, other modulatory intermediates affect the channel function. Indeed, a range of phosphorylations or protein–protein interactions affect the sensitivity to gating stimuli or channel trafficking. For example, in TRPV4 transfected HEK293 cells, the serine/threonine protein kinases A and C (PKA and PKC) modulate the gating of the channel by cell swelling [5]. In the same cellular model (neurons), plasma membrane localization of TRPV4 is also modulated by the cytoskeletal protein kinase C and casein kinase substrate (PACSIN 3) [6], the ubiquitin ligase AIP4 [7], the ubiquitously expressed endoplasmic reticulum-associated protein OS-9 [8], the stromal interaction molecule 1 (STIM1) [9], or the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [10]. Moreover, several studies show a modulatory role of hypoxia on TRPV4 channel function, which occurs, not only in a variety of chronic lung diseases [11], but also in other organ systems and related diseases [12]. Indeed, TRPV4 activity is increased by hypoxic stimuli in rat pulmonary arterial smooth muscle cells [13–15], human umbilical vascular endothelial cells [16], rat hippocampal astrocytes [17], human SH-SY5Y neuroblastoma cell line [18], rat heart tissue-derived H9C2 cardiac myoblast cell line, and neonatal rat ventricle myocytes [19].

Whereas TRPV4 is obviously mechanosensitive [20], there is additional evidence that parameters such as confluence for adherent cells affect whole-cell mechanical behaviour, e.g., confluent fibroblastic cells were 50% stiffer than non-confluent ones [21]. Therefore, culture conditions under which the cell seeding is performed may modulate the functionality of the channel. Thus, in the present study, we investigated the influence of cell density on the effect of hypoxia on TRPV4 activity. We sought to compare TRPV4-induced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  responses ( $\text{Ca}^{2+}$  imaging and microspectrofluorimetric assay) and single channel activity (patch-clamp technique in cell-attached configuration) in transiently TRPV4-transfected HEK293T cells seeded at low (non-confluent cells) and high (confluent cells) densities, and cultured under in vitro normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) for 48 h. Note that in this study, the terms “normoxia” and “hypoxia” are used to distinguish between the various levels of oxygenation in the incubator. Thus, “normoxia” corresponds to atmospheric oxygen pressure, the commonly used oxygen pressure for cell cultures, but not to “tissue normoxia” also called “physioxia” which is characteristic of each tissue [22].

Direct  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the channel was measured using an intramolecular Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) probe in which the TRPV4 channel was fused to a BRET sensor with high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  (Calflux-VTN) [23]. TRPV4 plasma membrane translocation was studied using confocal microscopy, cell surface biotinylation of proteins, and bystander BRET in which TRPV4 channel membrane density was monitored [24]. Our results show that hypoxia exposure has a differential effect on TRPV4 activation depending on cell confluence. At low confluence levels, hypoxia increases TRPV4 response, whereas at

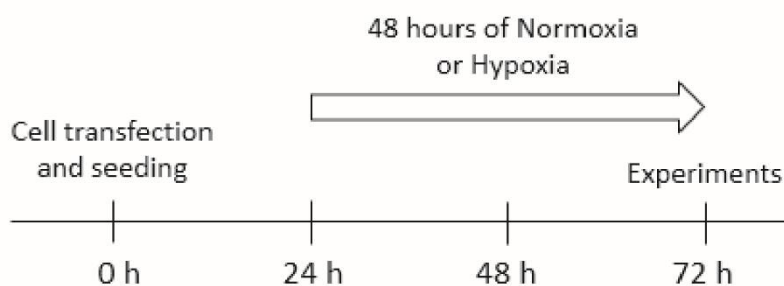
high confluence levels, TRPV4 response is strongly inhibited, due to channel internalization. Thus, cell density appears to be a crucial parameter for TRPV4 channel activity.

## 2. Materials and Methods

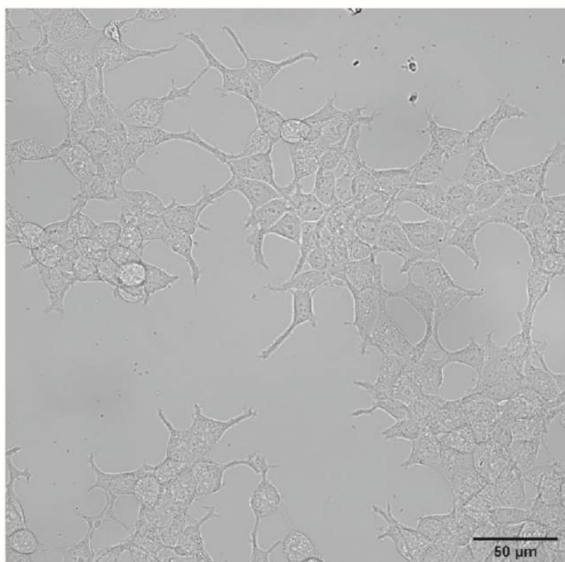
### 2.1. Cell Culture

Transiently transfected HEK293T were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% nonessential amino acids, and 10% foetal bovine serum (FBS). In order to test the influence of cell density, cells were seeded on adequate support, either at a density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, referred to as the low-density (LD) condition, or at a density of  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>, referred to as the high-density (HD) condition, corresponding to non-confluent or confluent cells, respectively, on the day of experiments, after 72 h of culture: 24 h of transfection plus 48 h of normoxia or hypoxia (Figure 1). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere gassed with 5% CO<sub>2</sub>. HEK293T from control group ("normoxia") were exposed to a gas mixture containing 21% O<sub>2</sub>, 74% N<sub>2</sub>, and 5% CO<sub>2</sub>. Cells from the hypoxia group were exposed to a gas mixture containing 1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, and 5% CO<sub>2</sub> ("hypoxia") for 48 h in a tri-gas incubator (Heracell 150i, ThermoScientific, Saint Herblain, France).

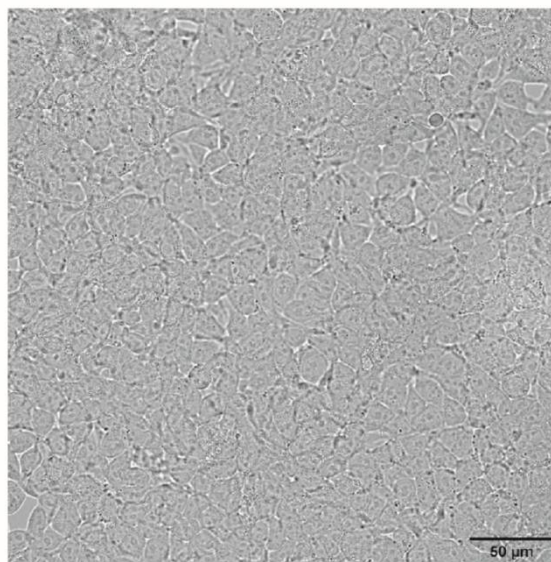
(a)



(b)



(c)



**Figure 1.** Cell culture conditions (a) timeline protocol for cell experiments, (b,c) representative phase-contrast fields of HEK293T cells seeded at (b) low ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) or (c) high ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) densities after 72 h of culture. Scale bar = 50  $\mu$ m (magnification 40 $\times$ ).

### 2.2. Plasmids and Transfection

To generate the BRET constructs, mNeonGreen (mNeonG) and nanoluciferase (nLuc) were mainly used to improve the brightness of the assay and are referred to as mNeonG and nLuc in the rest of this paper. For confocal microscopy, TRPV4-YFP and non-tagged TRPV4

were used in biotinylation and calcium assays, respectively in order to keep native structure and avoid signal interference of the fluorophore with the Fura emitting wavelength during the calcium test.

Mammalian expression vectors for the mNeonG-TRPV4-nLuc has been previously described in [25]. The mammalian expression vector encoding the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 fusion protein was constructed using cDNA “bricks”, obtained by gene synthesis (Genescript, Leiden, The Netherlands), that contains the cDNA sequences for mNeonG (bricks 1.1), the calflux calcium ion sensor (Calflux, brick 1.2), nLuc (brick 1.3) and TRPV4 ion channel (brick 2 and 3) as indicated in Supplementary Figure S1. The corresponding sequences are given in Supplementary Table S1.

A similar strategy was used to construct TRPV4-YFP, TRPV4-nLuc, and non-tagged TRPV4 with cDNA bricks that encode empty cDNA bricks (brick 1), to rebuild the Kozak sequence before ATG and TRPV4 ion channel (bricks 2 and 3) and YFP, nLuc, or Stop (brick 4) (Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S1).

To construct vectors encoding mNeonG-CAAX fusion proteins, in order to evaluate TRPV4 endocytosis by measuring the decrease in the non-specific BRET (bystander BRET), we used cDNA bricks containing mNeonGreen (brick 1), and CAAX (brick 2). All brick sequences are given in Supplementary Table S1 and were provided as cDNA cloned into a pUC-Kana vector devoid of BsmBI restriction sites (Genescript).

Using the BsmBI type IIS enzyme and T4 DNA ligase, the cDNA bricks were assembled in frame and in the right order into pcDNA3.1(+)-Lac Z vector, which allowed direct visualization of the assembly efficiency using a colorimetric test based on alpha complementation. Briefly, a ligation mix containing 2  $\mu$ L of T4 DNA ligase buffer 10X, 1 U of BsmBI enzyme, 1 U of T4 DNA ligase, 0.4 mM ATP, 4 mM dithiothreitol, 200 ng of pcDNA3.1(+)-Lac Z vector, and 100 ng of each brick needed to obtain the cited final construct. Then the mix was subjected to 35–40 cycles alternating two steps (step 1: 37 °C for 1 min, step 2: 16 °C for 1 min) before the enzymes were inactivated for 5 min at 55 °C. The ligation mix was then used to transform *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  by thermal shock to amplify the plasmids.

The day of transfection, cells were trypsinized and transient transfections were performed on suspended cells using polyethylenimine (PEI, linear, Mr 25,000; Polysciences, Warrington, PA, USA) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as already described in [26]. For patch-clamp and Ca<sup>2+</sup> assays, TRPV4 WT or other BRET probes were transfected with 0.1  $\mu$ g of the corresponding expression vector and 1.9  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector for a 6-well plate equivalent. For confocal imaging, TRPV4-YFP was transfected with 0.25  $\mu$ g of the corresponding expression vector and 1.75  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector for a 6-well plate equivalent. When intramolecular BRET assays were performed using Calflux BRET sensor N-terminally fused to TRPV4, HEK293T cells were transfected with 0.01  $\mu$ g of the corresponding expression vector and 2  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector. Alternatively, HEK293T cells were transfected with 0.01  $\mu$ g of TRPV4-nLuc expression vector and 2  $\mu$ g of mNeonG-CAAX expression vector for intermolecular BRET assays. Resuspended cells were seeded on adequate support (glass coverslips, Petri dishes, or 96-well plates) at low or high densities.

### 2.3. Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Measurements

Variations in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> were determined using the Fura-2-LR/AM and Fluo-4/AM dyes. Briefly, for single cell measurements, cells seeded on glass coverslips were incubated with 5  $\mu$ M Fura-2-LR/AM in Krebs-HEPES solution (see composition below) at 37 °C for 30 min, then washed and maintained in the same saline solution before fluorescence measurements. Cells were placed in a chamber of an inverted epifluorescence microscope (Nikon, Eclipse Ti2-U) equipped with a Nikon Apo Plan x40/1.3 NA oil immersion objective. Digital images were sampled at 16-bit resolution by a fast-scan digital camera (Hamamatsu, ORCA-Flash4.0 LT+). Fura-2-LR was alternately excited at 340 and 380 nm using a pE-340 Fura illuminator (CoolLED). The ratio R<sub>340/380</sub> of the fluorescence intensity emitted at

510 nm at the two excitation wavelengths was calculated. Regions of interest were drawn around each cell to detect cellular ratio variations. The amplitude of the calcium rise was determined as the maximum  $\Delta R_{340/380}$  reached during the recording time, i.e., between 30 and 420 s (corresponding to time after GSK1016790A application), depending on the cells. Imaging was controlled by NIS-Elements AR 5.3 imaging software (Nikon, Champigny sur Marne, France). All the images were background subtracted. These measurements allowed determining the percentage of responding cells, and then, their selection for analyses.

For cell population measurements, cells seeded in 96-well plates were incubated with 2  $\mu$ M Fluo-4/AM in Krebs-HEPES solution at 37 °C for 30 min, then washed and maintained in the same saline solution before the fluorescence measurements. The Fluo-4/AM fluorescence intensity was measured at 485/520 nm (excitation/emission) using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France), in the same conditions as BRET measurements.  $\Delta(F/F_0)$  represents the difference between  $F/F_0$  and the basal  $F/F_0$  measured without GSK.

When mentioned, the TRPV4 inhibitor, HC067047, was added at 1  $\mu$ M final concentration to the extracellular solution 30 min before the ejection of TRPV4 agonist, GSK1016790A, in the bathing solution at concentrations mentioned in the text.

#### 2.4. Electrophysiological Recordings

Single-channel activity was recorded from cell-attached patches using the technique described by Hamill et al. [27]. The electrodes were pulled on a DMZ-Universal puller (Zeitz Instruments) in two stages from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.16 mm ID, Harvard Apparatus). The pipettes had a mean resistance of 5–7 M $\Omega$  when measured in standard recording conditions. Cells seeded on Petri dishes were viewed under phase contrast with a Nikon Diaphot inverted microscope. A RK 400 patch amplifier (Biologic) was used for cell-attached recordings. Channel activity was recorded over 60 s (one series of 60 sweeps of 1 s). Stimulus control, data acquisition, and processing were carried out on a computer fitted with a Digidata 1550 interface, using Clampex v11 software (Molecular Devices, Foster City, CA, USA). Current records were filtered with a HumSilencer noise eliminator (Molecular Devices). Data were analysed using Clampfit v11 software (Molecular Devices). GSK1016790A was applied to the recorded cell via the recording pipette in absence or presence of HC067047 in the pipette solution and bathing solution.

#### 2.5. Confocal Imaging

TRPV4-YFP and mNeonG-CAAX transfected HEK293T seeded in 96-well plates were observed as “living cells” under a Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope using a Nikon Apo Plan x60/1.4 NA oil immersion objective (excitation wavelength 488 nm; emitted fluorescence recorded at 500–530 nm).

#### 2.6. Cell Surface Biotinylation

Cells, seeded on 6-well plates coated with polylysine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), were detached with accutase (400–600 units/mL from Sigma) and resuspended after centrifugation in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Centrifugations were performed between each step to pellet cells. They were labelled for 30 min at 4 °C with membrane-impermeable EZ-link NHS-SS-biotin (0.5 mg/mL, Pierce, 21331) to biotinylate surface proteins. Afterward, the unconjugated biotin was quenched for 20 min at 4 °C with 50 mM Tris·HCl in PBS, and the cells were lysed in RIPA lysis buffer system supplemented with protease inhibitor cocktail (1:100), sodium orthovanadate (1:100), and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Sc-24948) for 30 min at 4 °C. Insoluble materials were then removed by centrifugation at 15,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C, and the amount of protein was assessed by the Lowry method (Bio-Rad, 5000111, Marnes-la-Coquette, France). Equal amounts of proteins were incubated with streptavidin-agarose beads (Pierce, 20353, Rockford, IL, USA) at 4 °C overnight. The biotinylated proteins were then eluted by boiling for 10 min at 95 °C



in Laemmli sample buffer (Bio-Rad, 1610747) supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. Cell lysates of 30  $\mu$ g total or of 350  $\mu$ g biotinylated proteins were used for Western blot analysis.

Proteins were loaded onto a 4–20% acrylamide gel and resolved by electrophoresis. The proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer System. After saturation for 1 h using 0.1% TBS-Tween and 5% nonfat milk, membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody anti-TRPV4, (AB191580, 1:1000, Abcam, Paris, France). The membranes were then treated with the corresponding horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (PI1000, 1:10,000, Vector) for 1 h at room temperature. Membranes were processed for chemiluminescent detection using horseradish peroxidase substrate (Millipore, Molsheim, France) according to the manufacturer's instructions. Immunoblots were then revealed and acquired using a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ System. Images were quantified using Image Laboratory software (Bio-Rad). Equal protein loading was verified using the stain-free method.

## 2.7. BRET Measurements

### 2.7.1. Filter-Based BRET Assays

BRET signals emitted by the total cell population in each well of 96-well plates were measured using a multidetector TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) with emission filters centred at  $460 \pm 20$  nm for nLuc (energy donor) and  $510 \pm 40$  nm for mNeonG (energy acceptor). 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 "BRET" =  $I_{\text{acceptor}}/I_{\text{donor}}$ .

Due to the overlapping emission spectra of nLuc and mNeonG, a fraction of the light detected in the mNeonG filter originates from the nLuc emission, resulting in a contaminating signal [28]. In that configuration, the net BRET was therefore defined as the BRET ratio of cells co-expressing nLuc and mNeonG constructs minus the BRET ratio of cells expressing only the nLuc construct in the same experiment.

To assess the functionality of TRPV4 channel BRET-based probes, Furimazine, the substrate for BRET reaction, was added (diluted at 1/500 in the well) and incubated for 30 min before TRPV4 agonist was injected in the presence or absence of TRPV4 inhibitor. BRET signals were measured in DMEM w/o red phenol, 5 min after the addition of GSK1016790A, a TRPV4 agonist.

### 2.7.2. Spectral BRET Assays

Full BRET spectra were acquired using an optical fibre linked to a spectrometer (Iso-Plane SCT320, TELEDYNE, Lisse, France) equipped with a liquid-nitrogen-cooled charge-coupled device camera for recording the full visible spectrum (BLAZE 400, TELEDYNE). The bioluminescent signal was recorded from transfected cells seeded on glass coverslips and placed into an opaque home-made measurement chamber. Using the LabView programming language (National Instruments), an interface was developed to acquire the bioluminescent spectra and perform real-time spectral decomposition of the BRET signal into its various components, as described in [29].

## 2.8. Recording Solutions

The standard Krebs-HEPES extracellular solution contained (in mM): 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 D-glucose, and 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES). The osmolality (measured with a cryoosmometer type 15 Löser/Fisher Scientific, Illkirch, France) of the external salt solution was adjusted to 310 mosm/kg with mannitol, and pH adjusted to 7.4 with NaOH.

For the cell-attached patch clamp recording, the bathing solution had the following composition (in mM): 140 KCl, 2.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 14 D-glucose, and 10 HEPES (osmolality: 310 mosm/kg; pH = 7.4, adjusted with KOH). The recording pipette was filled with a

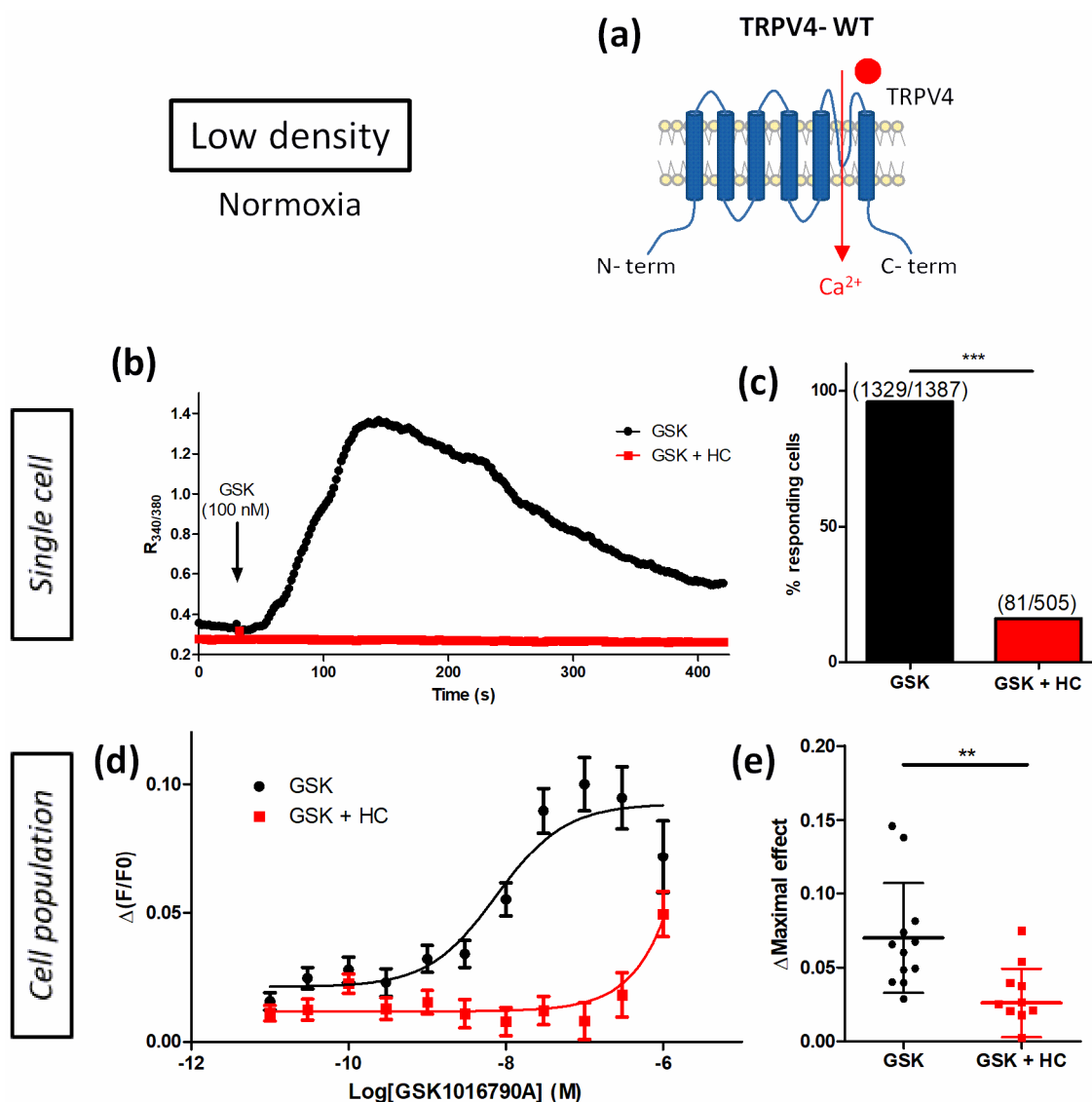
solution containing (in mM): 140 NaCl, 2.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 14 D-glucose, 10 HEPES, and 10 tetraethylammonium chloride (TEA), (osmolality: 310 mosm/kg; pH = 7.4).

### 2.9. Reagents

General salts were from VWR. All other chemicals were purchased from Sigma, except FBS (Eurobio, Les Ulis, France), and furimazine which was obtained from Promega. GSK1016790A and HC067047 were dissolved in DMSO and diluted 1:2000 in the bath to the final mentioned concentrations. At this dilution, the solvent (DMSO) alone had no effect on channel activity.

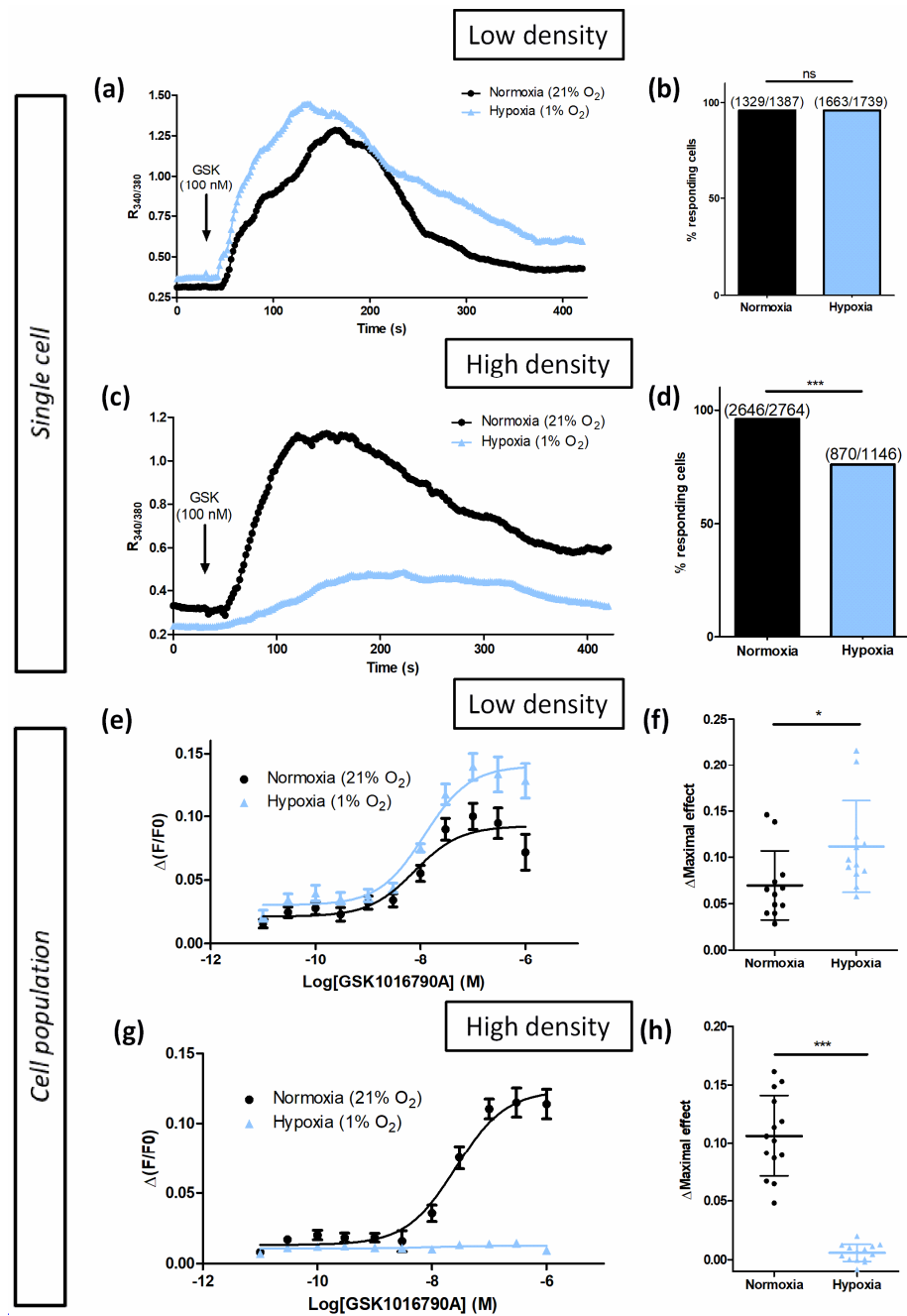
### 2.10. Data and Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The n number of responsive cells (Figures 2 and 3) is indicated in each bar graph figure. A Mann–Whitney test was used to determine statistical significance between two groups. A Kruskal–Wallis followed by Dunn test was used to compare multiple groups. Comparison of cell response proportions was performed with a chi-squared test. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant. Statistical analysis was performed with the Prism 5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).



**Figure 2.** Characterization of TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells cultured under normoxia at low density ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). (a) Schematic representation

of TRPV4-WT. (b,c) Variations of relative cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration (Ratio R<sub>340/380</sub>) were monitored by single-cell fluorescence videomicroscopy in Fura-2-LR/AM loaded cells. HEK-TRPV4 were bathed in physiological saline solution in absence or presence of the specific TRPV4 inhibitor HC067047 (HC, 1 μM). (b) Typical recordings of single cells when GSK1016790A (GSK, 100 nM), a selective TRPV4 agonist, was added at 30 s (as indicated by the arrow), and (c) percentage of responding cells in response to GSK. (d,e) Variations in relative cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration (F/F<sub>0</sub>) were monitored using a microplate spectrophotometer reader in Fluo-4/AM loaded cells. (d) Δ(F/F<sub>0</sub>) concentration–response curves to GSK1016790A in presence or absence of HC067047 (1 μM) and (e) maximal concentration–response curve amplitude (ΔMaximal effect). Data are expressed as mean value ± SD. The number of cells (c) is indicated in brackets. Significant difference is indicated by two asterisks when *p* < 0.01 and three asterisks when *p* < 0.001, Mann–Whitney or chi-squared test.



**Figure 3.** Hypoxia only potentiates TRPV4-induced Ca<sup>2+</sup> responses in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells cultured at low density (1 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>). (a–d) Variations of relative

cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Ratio  $R_{340/380}$ ) were monitored by single-cell fluorescence videomicroscopy in Fura-2-LR/AM loaded cells grown under normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) for 48 h. (a) Typical recordings of single cells when HEK-TRPV4 were bathed in physiological saline solution and GSK1016790A (GSK, 100 nM), a selective TRPV4 agonist, was added at 30 s (as indicated by the arrow), and (b) percentage of responding cells in response to GSK at low density. (c) Typical recordings of single cells when HEK-TRPV4 were bathed in physiological saline solution and GSK1016790A (GSK, 100 nM), a selective TRPV4 agonist, was added at 30 s (as indicated by the arrow), and (d) percentage of responding cells in response to GSK at high density. (e–h) Variations of relative cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (F/F0) were monitored using a microplate spectrophotometer reader in Fluo-4/AM loaded cells grown in normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) for 48 h.  $\Delta(\text{F}/\text{F}_0)$  concentration–response curves to GSK1016790A at (e) low and (g) high densities, and maximal concentration–response curve amplitude ( $\Delta\text{Maximal effect}$ ) at (f) low and (h) high densities. Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. The number of cells (b–d) is indicated in brackets. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$ , three asterisks when  $p < 0.001$ , and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney or chi-squared test.

### 3. Results

#### 3.1. Modulation of Hypoxia-Sensitive TRPV4-Induced $\text{Ca}^{2+}$ Response by Cell Density

##### 3.1.1. Characterization of TRPV4 $\text{Ca}^{2+}$ Response

First, to characterize TRPV4-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells (Figure 2a), experiments were performed using its specific agonist GSK1016790A (GSK) and inhibitor HC067047 (HC) (Figure 2). When cells were cultured at low density (LD), under normoxia, in response to GSK (100 nM), the ratio  $R_{340/380}$  of the emitted fluorescence intensity, measured in single-cell  $\text{Ca}^{2+}$  imaging with Fura-2-LR/AM ratiometric probe, rapidly increased in 96% of stimulated cells (Figure 2b,c). This response was strongly inhibited in the presence of HC (1  $\mu\text{M}$ ) where only 16% of cells responded (Figure 2b,c) with an amplitude ( $\Delta R_{340/380}$ ) of  $0.094 \pm 0.043$  ( $n = 81$  cells) instead of  $1.030 \pm 0.861$  ( $n = 1329$  cells) in the absence of inhibitor, respectively. In  $\text{Ca}^{2+}$  measurements with Fluo-4/AM non-ratiometric probe (cell population), TRPV4-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response was also increased with the agonist in a concentration-dependant manner ( $\text{EC}_{50} = 8.7 \pm 5.5$  nM,  $n = 12$  independent experiments). As expected, pre-treatment with 1  $\mu\text{M}$  HC dramatically right-shifted the apparent potency of GSK to trigger a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx (Figure 2d,e). As already described [18], these results confirmed that GSK-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses were TRPV4 specific in HEK-TRPV4.

##### 3.1.2. Hypoxia Potentiates TRPV4-Induced $\text{Ca}^{2+}$ Responses in Low-Density Cultured Cells

Previous studies have shown that prolonged hypoxia exposure occurring particularly, but not exclusively, in a variety of chronic lung diseases, increases TRPV4 activity in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) [13,14]. Moreover, a similar response was observed when PASMC were cultured under in vitro hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) [15]. We therefore tested whether this potentiating effect of hypoxia could be measured on the ectopically-expressed TRPV4 channel. For this purpose, TRPV4-transfected HEK293T cells were cultured under hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) at LD, a density commonly used for single-cell  $\text{Ca}^{2+}$  imaging studies. As expected, in hypoxic cells, the basal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level was increased in single-cell  $\text{Ca}^{2+}$  imaging with a Fura-2-LR/AM ratiometric probe (Figure 3a,b). The amplitude of TRPV4-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  response was also greater:  $\Delta R_{340/380} = 1.053 \pm 1.169$  ( $n = 1663$  cells) and  $\Delta R_{340/380} = 1.030 \pm 0.861$  ( $n = 1329$  cells) in hypoxic and normoxic cells, respectively. Accordingly, in the concentration–response curve to GSK with Fluo-4/AM non-ratiometric probe (cell population), the amplitude of TRPV4  $\text{Ca}^{2+}$  response was increased by 61% in hypoxia without modification of  $\text{EC}_{50}$  (Figure 3e,f). These results show that hypoxia potentiates TRPV4  $\text{Ca}^{2+}$  responses in HEK-TRPV4 cells cultured at LD.



### 3.1.3. Cell Confluence Alters Hypoxia-Induced TRPV4 Ca<sup>2+</sup> Response Potentiation

Although being mechanosensitive, TRPV4 modulation by cell-to-cell contact has not been investigated in previous studies. Thus, the effect of hypoxia exposure on TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response was evaluated in HEK293T cells cultured at high density (HD) to determine whether cell confluence is a determining parameter. Surprisingly, in TRPV4-transfected HEK293T cultured under hypoxia at HD, basal intracellular Ca<sup>2+</sup> level was decreased in single-cell Ca<sup>2+</sup> imaging with Fura-2-LR/AM ratiometric probe (Figure 3c,d). The amplitude of TRPV4 response to GSK was also smaller:  $\Delta R_{340/380} = 0.327 \pm 0.245$  (n = 870 cells) and  $\Delta R_{340/380} = 0.827 \pm 0.800$  (n = 2646 cells) in hypoxic and normoxic cells, respectively, as well as the percentage of responding cells. Accordingly, in concentration–response to GSK with Fluo-4/AM non-ratiometric probe (cell population), the amplitude of TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response was drastically diminished under hypoxia (Figure 3g,h). Unexpectedly, these results show that hypoxia inhibits TRPV4 Ca<sup>2+</sup> responses to GSK in TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at HD. Thus, these data draw attention to the importance of cell confluence during in vitro experiments, being a cause of altered TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response.

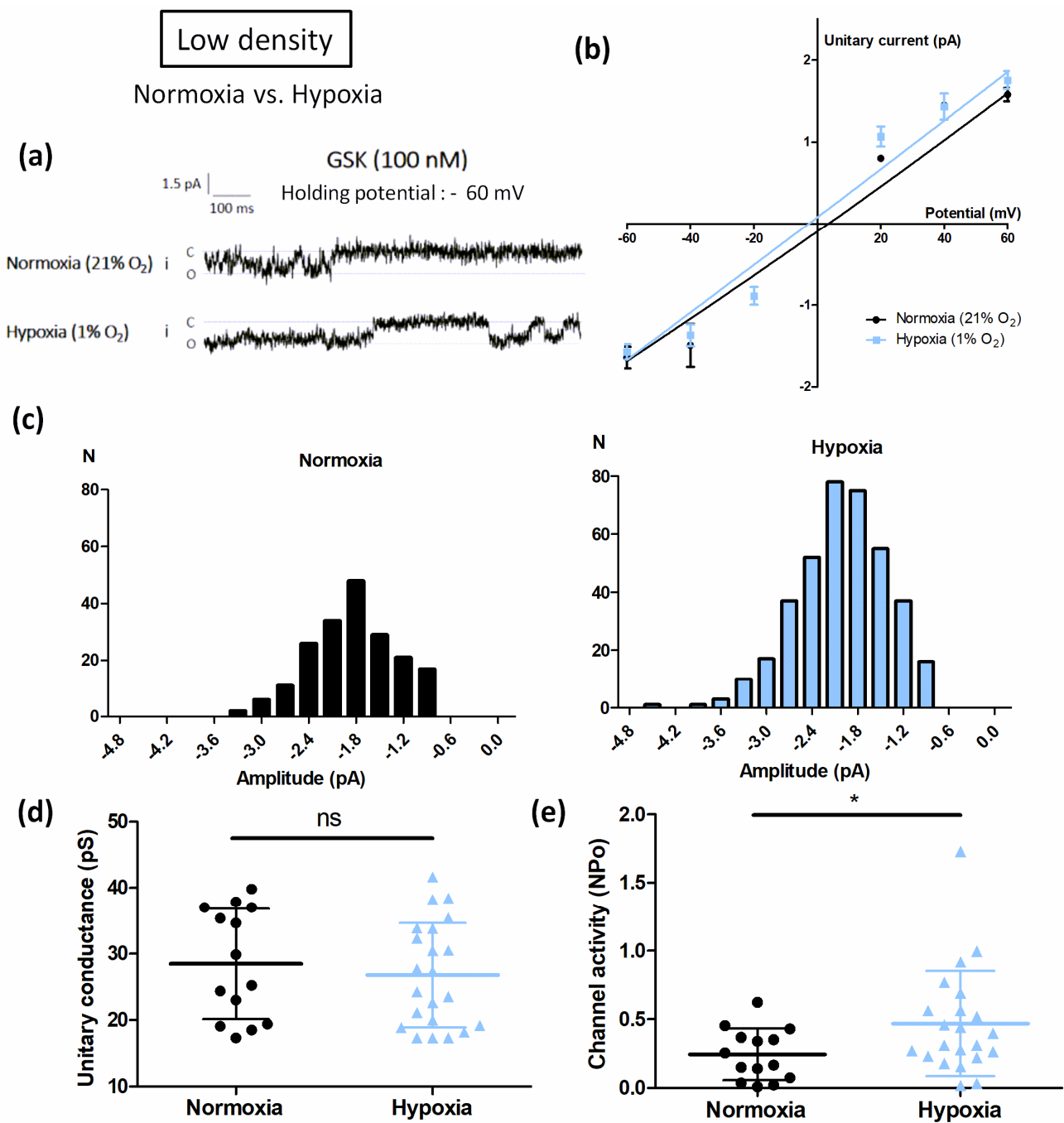
## 3.2. Modulation of Hypoxia-Sensitive TRPV4 Currents by Cell Density

### 3.2.1. Hypoxia Potentiates TRPV4 Currents in Low-Density Cultured Cells

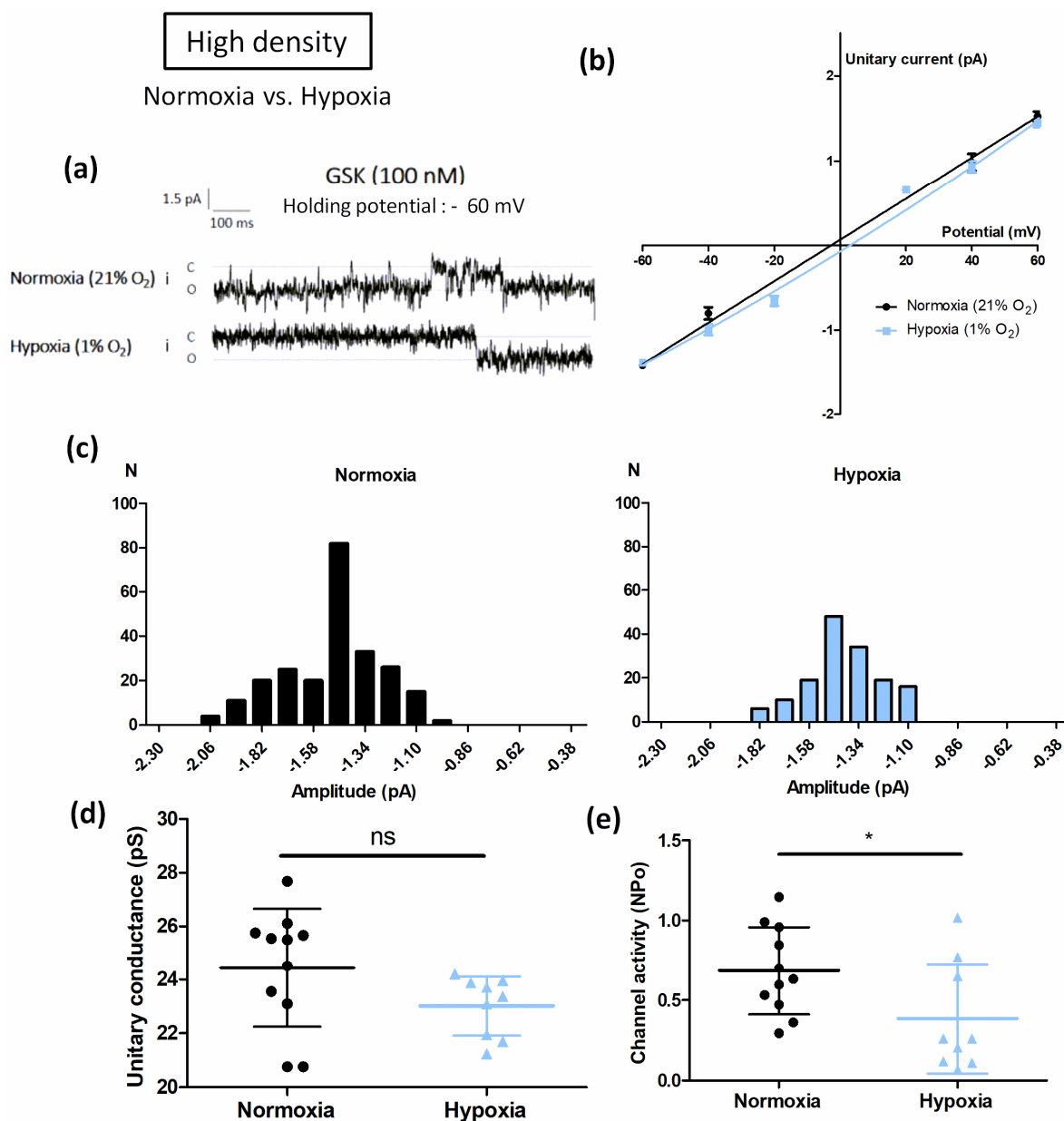
We then sought to confirm this first set of results by using a second technique to study the activity of the TRPV4 channel. We thus investigated the effect of in vitro exposure to hypoxia (1% O<sub>2</sub> for 48 h) on single TRPV4 current using cell-attached patch-clamp recording in TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at LD. Holding potentials were applied from null resting membrane potential obtained using high potassium (140 mM) containing bath solution. Single channel activity was evaluated in presence of GSK (100 nM) inside the patch pipette and unitary current/voltage curves were drawn for normoxic and hypoxic cells (Figure 4a,b). Unitary TRPV4 currents were then analysed at -60 mV holding potential. Conductance and open probability were determined. Whereas hypoxia did not alter TRPV4 unitary conductance ( $28.5 \pm 8.3$  pS (n = 14 cells) and  $26.8 \pm 7.9$  pS (n = 22 cells) for normoxic and hypoxic cells, respectively (Figure 4c,d)), channel activity was increased 1.9-fold (Figure 4e). Thus, as expected, in cells cultured at LD under hypoxia, TRPV4 channel activity was potentiated by these culture conditions.

### 3.2.2. Cell Confluence Alters Hypoxia-Induced TRPV4 Current Potentiation

The influence of cell density on TRPV4 single channel activity was then evaluated using the same protocol with cells cultured at HD under hypoxia. Unitary current/voltage curves were drawn for normoxic and hypoxic cells (Figure 5a–c). As for cells grown at LD, TRPV4 unitary conductance was unaffected by hypoxia:  $24.4 \pm 2.2$  pS (n = 7 cells) and  $23.0 \pm 1.1$  pS (n = 9 cells) for normoxic and hypoxic cells, respectively (Figure 5d). Nevertheless, channel activity was decreased 0.6-fold in hypoxic cells (Figure 5e). Thus, as expected, in cells cultured at HD under hypoxia, TRPV4 channel activity was reduced by these culture conditions. These electrophysiological data corroborate those obtained for Ca<sup>2+</sup> responses, confirming that cell confluence is a crucial parameter to consider.



**Figure 4.** Hypoxia potentiates TRPV4 currents in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells cultured at low density ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). (a) Representative records of current traces (patch clamp; cell-attached configuration at  $-60$  mV holding potential, assuming a resting potential of  $0$  mV) recorded in HEK-TRPV4 cells cultured under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48h at low cell confluence ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). The letters c and o indicate the closed and open channel states, respectively. (b) Unitary current (i)/potential (V) curves, (c) corresponding amplitude histograms shown at  $-60$  mV, (d) unitary conductance, and (e) channel activity (NPo), determined at a holding potential of  $-60$  mV in presence of the TRPV4 agonist GSK1016790A (100 nM). Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$ , and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney test.



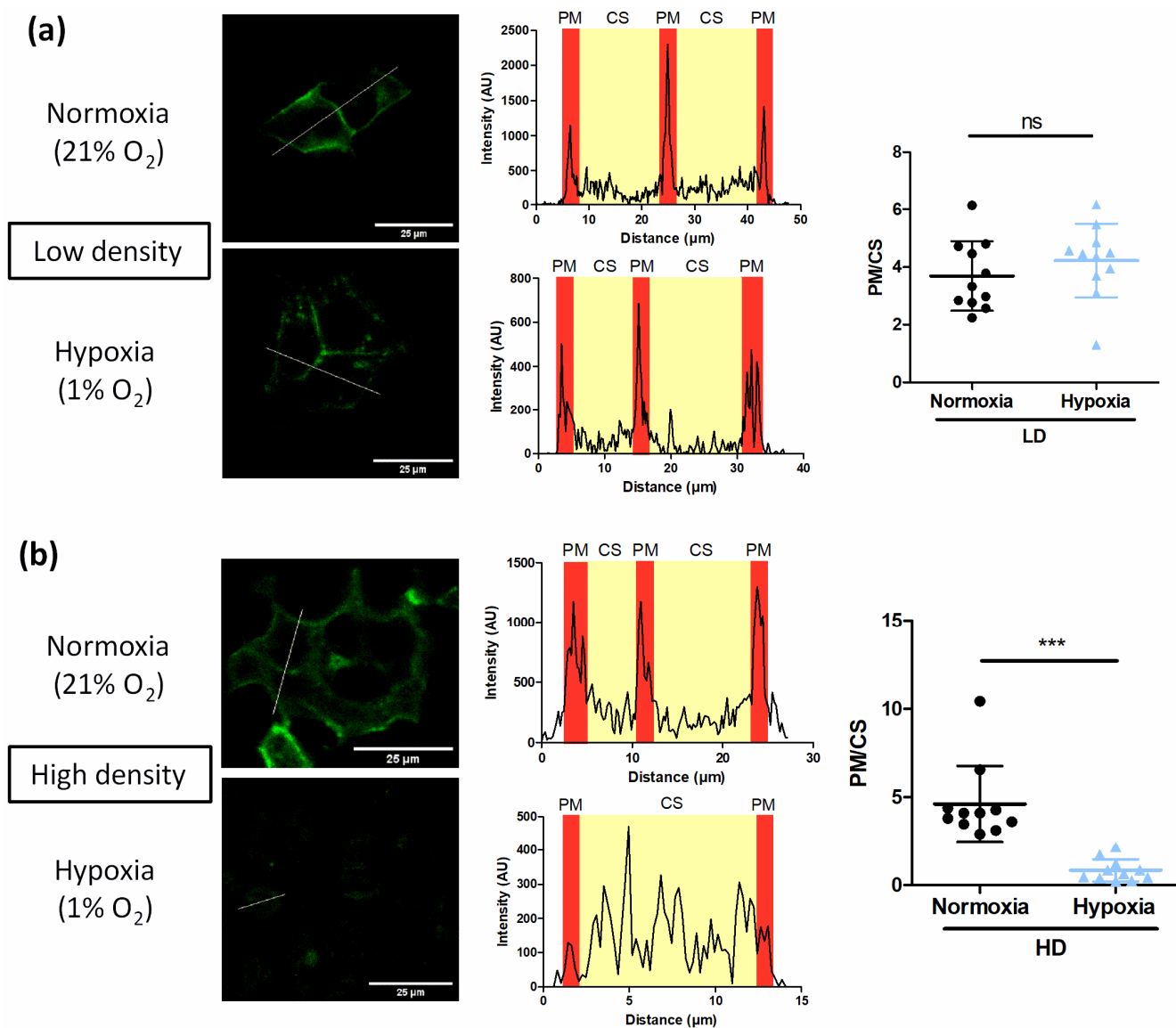
**Figure 5.** Cell confluence alters hypoxia-induced TRPV4 current potentiation in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells. (a) Representative records of current traces (patch clamp; cell-attached configuration at  $-60$  mV holding potential, assuming a resting potential of  $0$  mV) recorded in HEK-TRPV4 cells cultured under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h at high cell confluence ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>). The letters c and o indicate the closed and open channel states, respectively. (b) Unitary current (i)/potential (V) curves, (c) corresponding amplitude histograms shown at  $-60$  mV, (d) unitary conductance, and (e) channel activity (NPo), determined at a holding potential of  $-60$  mV in presence of the TRPV4 agonist GSK1016790A (100 nM). Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$  and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney test.

### 3.3. Cell Density Induces TRPV4 Relocation under Hypoxia

#### 3.3.1. Cell Confluence Reduces Plasma Membrane Density of TRPV4 Channels

A possible explanation for this lack of response to hypoxia at HD could be a relocation of TRPV4. Thus, membrane expression of TRPV4 was evaluated using confocal imaging on living HEK293T cells expressing TRPV4 tagged with YFP, cultured at LD and HD under normoxia or hypoxia. At LD, TRPV4 channels were mainly expressed in the vicinity of

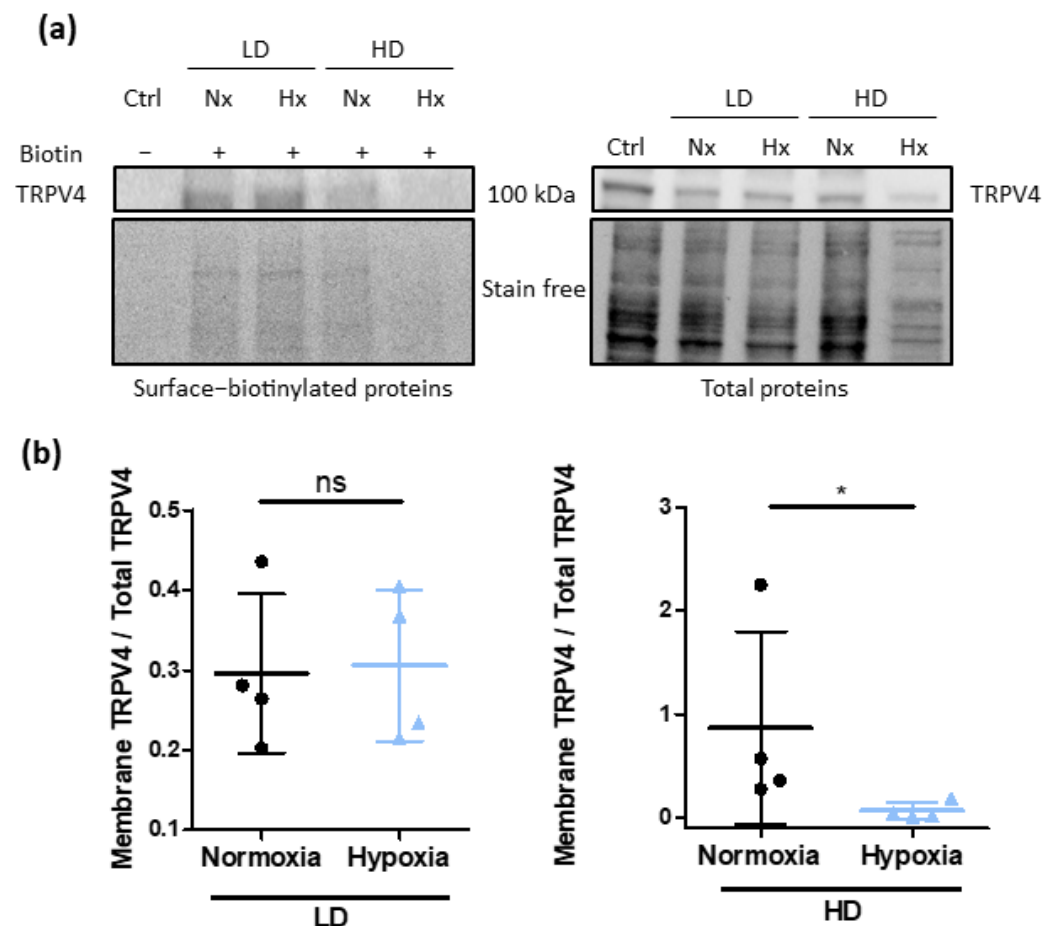
the plasma membrane in both normoxic and hypoxic cells (Figure 6a). At HD, whereas TRPV4 were localized close to the plasma membrane in normoxic cells, TRPV4 channels' locations were more diffuse in the cytoplasm of hypoxic cells (Figure 6b). Indeed, at HD, hypoxia decreased the average ratio (PM/CS) of the fluorescence signal of the plasma membrane (PM) to the fluorescence signal of the cytosol (CS) from  $4.63 \pm 2.15$  ( $n = 11$  fields) to  $0.84 \pm 0.63$  ( $n = 11$  fields) in normoxic and hypoxic cells, respectively (Figure 6b).



**Figure 6.** Cell confluence reduces plasma membrane density of TRPV4 channels in TRPV4-transfected HEK293T cells under hypoxia. Representative confocal fields of living HEK293T cells transfected with TRPV4 tagged with YFP and cultured at (a) low ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and (b) high density ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h (scale bar = 25  $\mu$ m); and corresponding evaluation of TRPV4 membrane localization by the fluorescence intensity profile in arbitrary units (AU) of a typical line scan indicated by the dotted line in cell. The average ratios (PM/CS) of the fluorescence signals of the plasma membrane (PM) to the fluorescence signals of the cytosol (CS) of representative cells are indicated as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by three asterisks when  $p < 0.001$  and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney test.

We confirmed these observations with cell surface biotinylation of TRPV4 (Figure 7). Indeed, TRPV4 was expressed at plasma membrane in cells cultured at low density under both normoxia and hypoxia. However, less TRPV4 was detected in surface-biotinylated

proteins from cells cultured at HD under hypoxia. Membrane TRPV4/Total TRPV4 ratio with stain free normalization decreased from  $0.86 \pm 0.93$  under normoxia to  $0.07 \pm 0.08$  under hypoxia ( $n = 4$  independent experiments). These results confirm that cell confluence induces TRPV4 internalization in hypoxia.



**Figure 7.** Cell confluence reduces plasma membrane expression of TRPV4 channels in TRPV4-transfected HEK293T cells under hypoxia. **(a)** Representative Western blots showing the presence of TRPV4 surface-biotinylated and total proteins from HEK293T cells transfected with TRPV4 WT and cultured at low ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and high density ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h. Samples without biotin were used as negative control. **(b)** Membrane TRPV4/Total TRPV4 ratio was evaluated for each condition with stain free normalization. Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$  and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney test.

### 3.3.2. Cell Confluence Induces TRPV4 Internalization under Hypoxia

Then, membrane expression of TRPV4 was evaluated using a highly dynamic BRET-endocytosis sensor adapted from the study by Namkung et al. [24]. Briefly, the assay relies on the non-specific BRET measurement (bystander BRET) between TRPV4 C-terminally fused to the nLuc (TRPV4-nLuc) and the mNeonG fluorescent acceptor that was anchored to the plasma membrane thanks to its C-terminus fusion to the polybasic sequence and prenylation CAAX box of KRas (mNeonG-CAAX) [24,30] (Supplementary Figure S2). In this assay, the decrease in the bystander BRET between TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX is a direct measure of TRPV4 internalisation and loss of TRPV4 plasma membrane expression.

Since nLuc is an enzyme that consumes O<sub>2</sub> in presence of furimazine, its substrate, to produce visible photons according to the reaction: Furimazine + O<sub>2</sub>  $\rightarrow$  Furimamide + CO<sub>2</sub> + light, we first verified that the diminution of the concentration of O<sub>2</sub> did not affect BRET reaction.

As reported in Figure 2, no modification of the emission spectra was observed, validating the use of these BRET probes in hypoxic conditions.

Moreover, electrophysiological characterization of the BRET probes was performed to verify that TRPV4 channel properties were not modified in the presence of the nLuc. Single channel activity was recorded, and unitary current/voltage curves were drawn for normoxic cells cultured at LD (Supplementary Figure S3). No significant difference in unitary conductance and channel activity were observed between TRPV4-WT and TRPV4-nLuc (Supplementary Figure S3c,d). These results confirmed that the fusion of the nLuc to TRPV4 did not alter TRPV4 channel activity. Thus, TRPV4-nLuc probe can be used to investigate the modification of TRPV4 signalling observed in hypoxia at HD.

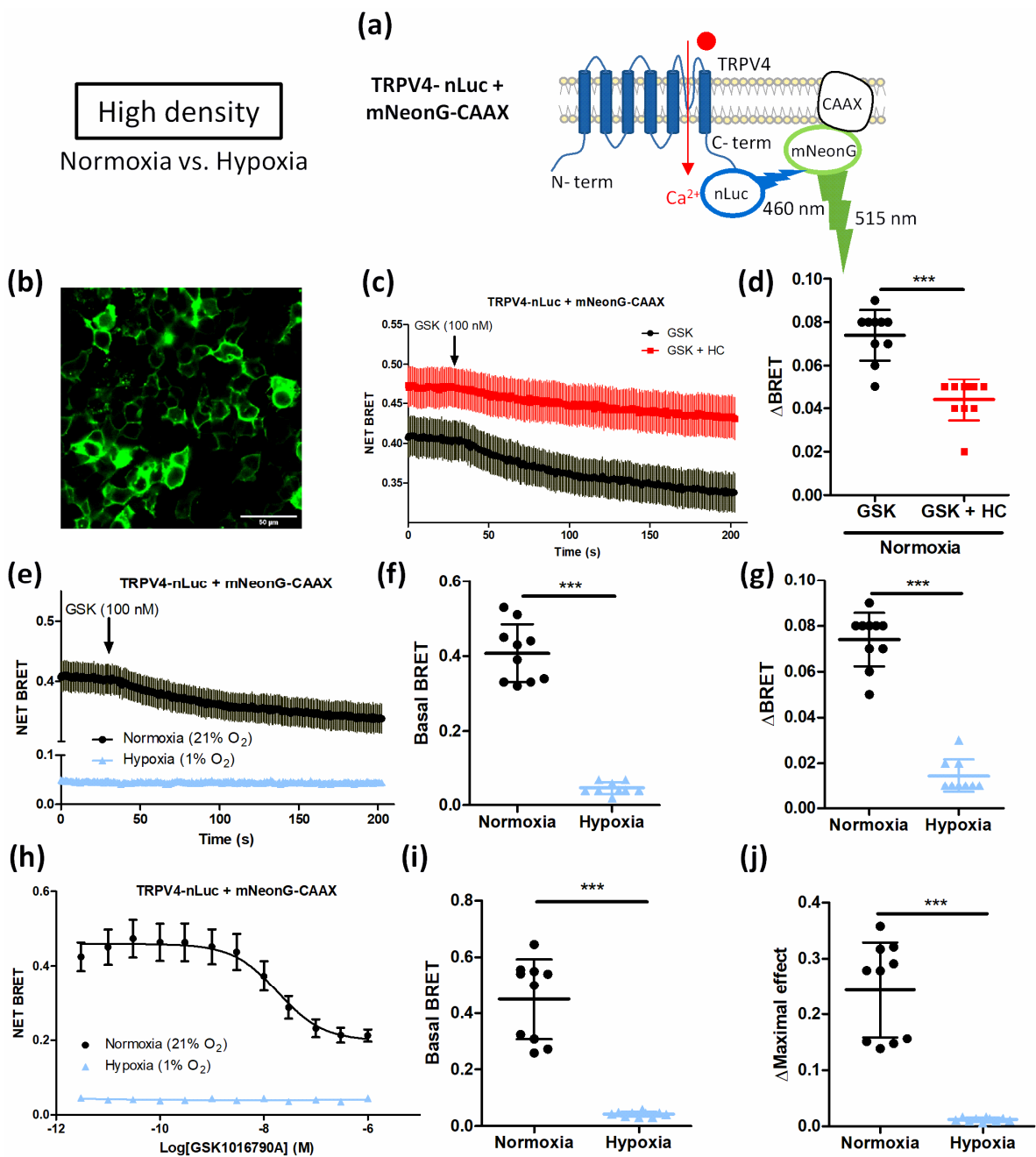
BRET measurements with TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX (Figure 8a) showed that TRPV4 expression at the plasma membrane decreased after GSK stimulation (100 nM), with a maximal absolute BRET amplitude of  $0.074 \pm 0.012$  ( $n = 10$  independent experiments) (Figure 8c,d). These results confirm findings from Baratchi et al. showing that TRPV4 is internalized and translocates to the recycling endosomes after GSK stimulation [10]. In presence of the TRPV4 inhibitor (HC067047), the absolute amplitude of BRET decrease was reduced to  $0.044 \pm 0.010$  ( $n = 10$  independent experiments) (Figure 8c,d), suggesting less TRPV4 internalization after GSK stimulation.

When cells were cultured under hypoxia at HD, basal BRET in kinetics was highly reduced from  $0.407 \pm 0.077$  ( $n = 10$  independent experiments) in normoxic cells to  $0.047 \pm 0.017$  ( $n = 9$  independent experiments) in hypoxic cells (Figure 8e,f). Accordingly, maximal absolute BRET amplitude was 81% lower in hypoxic cells suggesting TRPV4 was already internalized before GSK stimulation (Figure 8e,g). Consistent with these findings, the concentration–response curve to GSK confirmed that basal BRET and BRET decrease in response to GSK were reduced by 91% and 95% respectively in hypoxia (Figure 8h–j). Thus, TRPV4 internalization in response to GSK stimulation was lower in hypoxia at HD due to a loss of membrane expression. This suggests that cell confluence can modulate TRPV4 addressing.

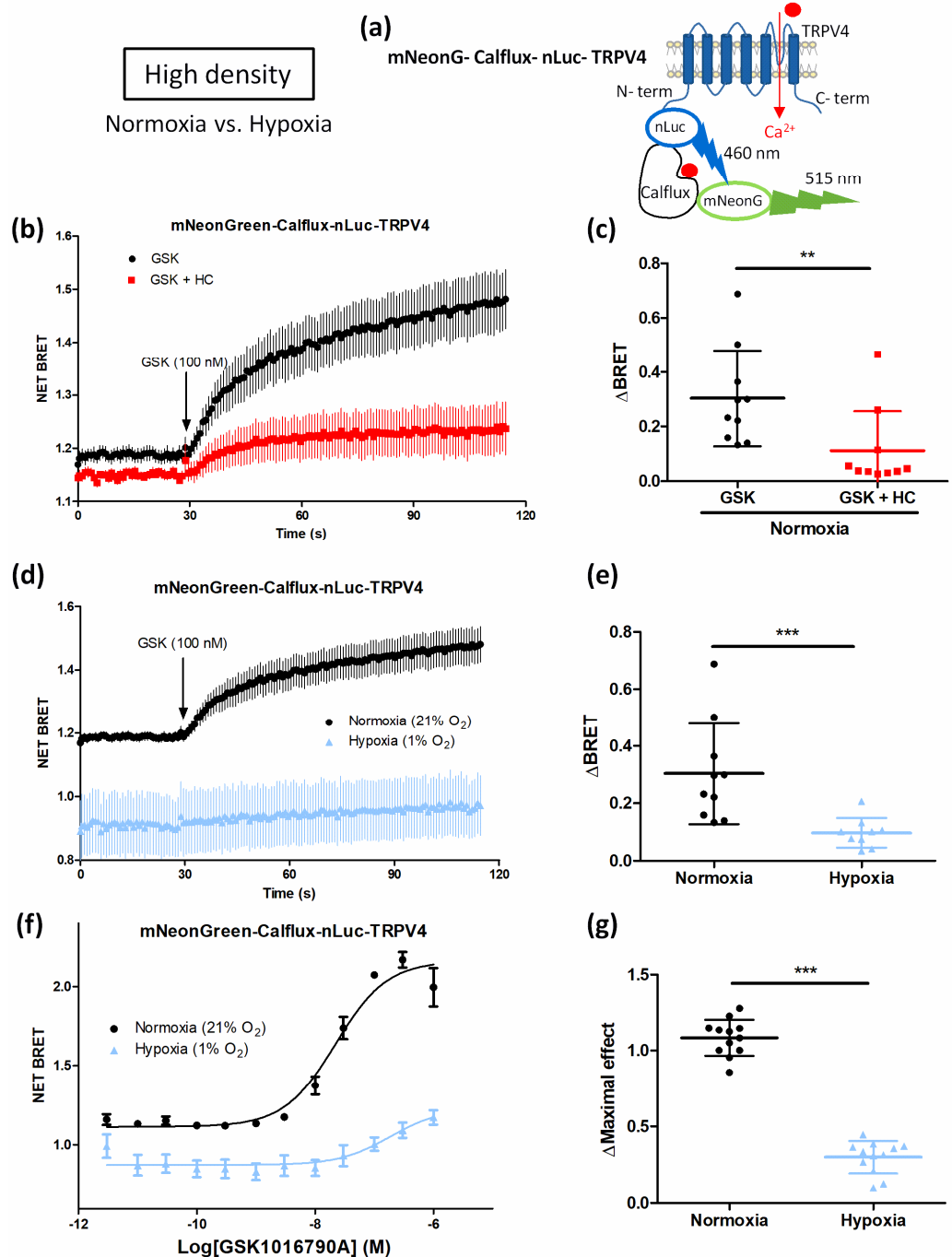
To confirm that hypoxia impairs agonist-induced TRPV4 response because of TRPV4 internalization when HEK-TRPV4 were cultured at HD,  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the TRPV4 pore nanoenvironment was directly monitored using the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 BRET  $\text{Ca}^{2+}$  sensor (Figure 9). Briefly, as already described for the mNeonG-Calflux-nLuc TRPV1 BRET  $\text{Ca}^{2+}$  sensor [23], the TRPV4 channel was fused to the recently described BRET sensor with high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  (Calflux-VTN) [31]. The troponin C domain of the Calflux-VTN BRET sensor was first sandwiched between the mNeonG fluorescent protein and the nLuc bioluminescent protein. The resulting BRET-based  $\text{Ca}^{2+}$  sensor (mNeonG-Calflux-nLuc) was then genetically fused to the N-terminal extremity of the channel.

First, electrophysiological characterization of the BRET probe was performed to verify that TRPV4 channel properties were not modified in presence of the mNeonG-Calflux-nLuc BRET probe (Supplementary Figure S3a–d). Then, HD-grown HEK293T cells expressing mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 BRET probe (Figure 9a) were processed for BRET analysis to monitor  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the TRPV4 pore nanoenvironment in both normoxic and hypoxic conditions. In absence of the TRPV4 inhibitor HC, 100 nM GSK induced a rapid and sustained BRET increase, reflecting  $\text{Ca}^{2+}$  influx through TRPV4 channel (Figure 9b,c). As expected, a diminution of 63% of BRET maximal amplitude was measured in the presence of HC (Figure 9b,c) confirming that  $\text{Ca}^{2+}$  transiting through TRPV4 channel is dependent on its activation.





**Figure 8.** Hypoxia impairs agonist-induced TRPV4 internalization in transiently TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at high density. **(a)** Schematic representation of TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX. **(b)** Representative confocal fields of mNeonG-CAAX transfected HEK293T cells (scale bar = 50 μm). **(c)** Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM) on cells transfected with mNeonG-CAAX and TRPV4-nLuc BRET probes in presence or absence of HC067047 (1 μM) and cultured at high cell confluence (3 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia, and **(d)** maximal absolute amplitude (ΔBRET). **(e)** Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM) on HEK293T cells transfected with mNeonG-CAAX and TRPV4-nLuc BRET probes and cultured under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h, **(f)** basal BRET, and **(g)** maximal absolute amplitude (ΔBRET). **(h)** Concentration–response curves of the effect of GSK1016790A on HEK293T cells transfected with mNeonG-CAAX and TRPV4-nLuc BRET probes and cultured under normoxia or hypoxia, **(i)** basal BRET, and **(j)** maximal concentration–response curve amplitude (ΔMaximal effect). Data are expressed as mean value ± SD. Significant difference is indicated by three asterisks when *p* < 0.001, Mann–Whitney.



**Figure 9.** Cell confluence alters Ca<sup>2+</sup> influx through TRPV4 in transiently mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4-transfected HEK293T cells cultured under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h at high cell confluence (3 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>). (a) Schematic representation of mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4. (b) Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM, applied as indicated by the arrow) on cells transfected with mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4 in presence or absence of HC067047 (1 μM) and cultured at high cell confluence (3 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia (21% O<sub>2</sub>), and (c) maximal amplitude (ΔBRET). (d) Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM) on cells transfected with mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4 cultured at high cell confluence under normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h, and (e) maximal amplitude (ΔBRET). (f) Concentration–response curves of the effect of GSK1016790A on HEK293T cells transfected with mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4 BRET probe and cultured under normoxia or hypoxia at HD, and (g) maximal concentration–response curve amplitude (ΔMaximal effect). Data are expressed as mean value ± SD. The number of independent experiments is indicated in brackets. Significant difference is indicated by two asterisks when *p* < 0.01 and three asterisks when *p* < 0.001, Mann–Whitney test.



When cells were cultured under hypoxia, the magnitude of the maximal response to GSK was also inhibited by 68% in response to GSK (Figure 9d,e) and the maximal efficacy of GSK was decreased by 73% in the concentration–response curve with a right-shift of the apparent potency of GSK (Figure 9f,g). These results suggest that less  $\text{Ca}^{2+}$  transits through TRPV4 in hypoxic cells grown at HD, in accordance with our previous results (Figures 3 and 5). Altogether, these data show that at HD, hypoxia induces TRPV4 internalisation and thereby alters agonist-induced TRPV4 activation. These results therefore suggest that, at high cell confluence, hypoxia can influence TRPV4 activity by modulating the density of TRPV4 at the plasma membrane.

#### 4. Discussion

In previous studies, in PASMOC from chronically hypoxic rats naturally expressing TRPV4, we and others have already described that *in vivo* chronic hypoxia increases TRPV4 channel activity [13,14]. We have also shown that culturing PASMOC from normoxic rats under *in vitro* hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) produces the same effects on TRPV4, increasing its  $\text{Ca}^{2+}$  response and channel activity [15]. In another article, the effect of hypoxia on TRPV4 was also assessed on cells without native expression of the channel [18]. In that study, TRPV4-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx was reported to be increased in TRPV4-transfected HEK293T cells (cultured at  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, corresponding to LD in our study) treated with cobalt chloride, an experimental condition known to mimic hypoxia [18]. In the present study, we have shown that TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at LD under hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) display higher TRPV4 responses to GSK stimulation.

Indeed, both  $\text{Ca}^{2+}$  responses and TRPV4 channel activity were increased in the hypoxic condition, confirming the effect of hypoxia on TRPV4 *in vitro*. How TRPV4 is modulated by hypoxia is still unclear, but there is evidence suggesting a specific effect of hypoxia on binding sites of the TRPV1 channel, affecting its conformation [32]. Thus, since TRPV channel members share high sequence identity (for example TRPV1 and TRPV4 share 45% sequence identity) [33], TRPV4 may also be modulated by hypoxia through conformational changes via a specific effect of hypoxia on amino acid residues. These changes could arise from post-translational modifications such as hydroxylation. Indeed, it was previously shown that TRPV3, another member of the TRPV family, was hydroxylated by FIH (factor inhibiting hypoxia inducible factors) on asparagine 242 in intracellular ankyrin repeat domains [34]. Hypoxia, inhibitors of FIH or mutation on asparagine 242 resulted in potentiation of TRPV3-mediated currents suggesting that oxygen-dependent hydroxylation can modulate ion channel activity [34].

In addition, our study reveals an impact of cell density on TRPV4 channel activity and  $\text{Ca}^{2+}$  response modulation by hypoxia. Our results show that hypoxia had a differential effect in TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at either LD or HD. Surprisingly, agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses and channel activity were decreased in hypoxic cells at HD. Several studies previously reported that cell density affects various physiological processes. Accordingly, it was found that confluent osteoblastic cells had a higher basal  $\text{Ca}^{2+}$  level than non-confluent ones and that  $\text{Ca}^{2+}$  responses to ionomycin, thapsigargin, ATP, and caffeine were reduced at high density [35]. This decrease was dependent on the formation of cell junctions, diminution of the inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptor and smooth-surfaced endoplasmic reticulum expression [35]. Additionally, in rat aortic smooth muscle cells, there is evidence that cell confluence affects  $\beta$ -adrenergic receptor signalling. Indeed, at HD, isoprenaline response involved both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors, whereas at LD, the response only involved  $\beta_2$ -adrenergic receptor and the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) rise was reduced in comparison with cells grown at HD [36]. In smooth muscle cells, the modification of this signalling pathway could alter various physiological responses such as contraction, migration or proliferation. Modulation of  $\beta$ -adrenergic receptor signalling by cell confluence was reported in HEK293 cells stably overexpressing  $\beta_2$ -adrenergic receptor. According to cell density, the transduction signalling pathway selectivity of cells'  $\beta_2$ -adrenergic receptor ligands was different. As a

consequence, some ligands induced an increase in intracellular cAMP without activating extracellular signal-regulated kinase (ERK) only in the HD condition, whereas at LD, ERK was phosphorylated following cAMP increase [37].

An important feature of cell density that can explain the modulation of cell responses is the modification of the tension in the plasma membrane with confluence inducing a change in cell mechanical behaviour. Indeed, it was shown that the rigidity of osteoblastic and fibroblastic cells was altered with culture conditions [21]. Confluent cells were stiffer than non-confluent ones and formed aligned stress fibres in response to mechanical stress, affecting cytoskeleton microstructure. Moreover, the increased formation of cell–cell junctions in confluent cells also increased the rigidity of the cytoskeleton [21]. Moreover, hypoxia was shown to induce cytoskeleton reorganization in PASMC where actin filament and intermediate filament networks were more abundant [15]. Since TRPV4 directly interacts with the cytoskeleton [38], cell contacts can impair cytoskeleton organization and reorganization in response to hypoxia, and consequently TRPV4 trafficking or conformational change. Indeed, as reported, confluence increased claudin-2 expression, a component of tight junctions, controlled by zonula occludens-1 and -2 and Rac [39]. These cell contacts also inhibited proliferation through the reduction of the formation of F-stress fibres induced by inhibition of YAP/TAZ (co-transcriptional regulators) signalling that impaired autophagosome formation [40]. This study suggests that modifications of cell confluence and matrix stiffness regulate YAP/TAZ activity, actin dynamics, and autophagy that are involved especially in proliferation and sensitivity to hypoxia via altered Hippo signalling. This pathway is regulated by AMP-activated protein kinase and mechanistic target of rapamycin (mTOR), determining cell proliferation [40,41]. The Hippo pathway is also known to be affected by hypoxia since reactive oxygen species (ROS) production induces transcriptional changes through the MST/YAP/FoxO pathway and leads to the activation of pro-apoptotic genes [41]. The fact that both cell density and matrix stiffness, as well as hypoxia, can affect cell signalling corroborates the previous assumption that TRPV4, as a mechanosensitive channel, may be particularly affected by these parameters.

Thus, the loss of TRPV4 response under hypoxia at HD could be explained by a relocation of the channel. Indeed, our present results suggest TRPV4 internalization in these conditions. First, in confocal imaging, TRPV4 was expressed in the vicinity of the plasma membrane at LD under both normoxia and hypoxia but only in normoxia for cells grown at HD. However, at HD under hypoxia, TRPV4 staining was diffuse in the cells suggesting a cytosolic expression. Moreover, cell surface biotinylation showed that TRPV4 was expressed at the plasma membrane at LD under both normoxia and hypoxia and in normoxia for cells grown at HD. But at HD under hypoxia, TRPV4 membrane addressing was reduced. To further analyse TRPV4 membrane expression, we built on a bystander BRET assay initially described to quantitatively monitor G protein-coupled receptors (GPCRs) and  $\beta$ -arrestin trafficking [24]. We anticipated that such an assay could specifically assess TRPV4 endocytosis by measuring the decrease in the non-specific BRET (bystander BRET) occurring in the plasma membrane plane between TRPV4 fused to the bioluminescent donor nLuc (TRPV4-nLuc) and a fluorescent acceptor fused to a plasma membrane-anchoring peptide such as the CAAX peptide [24]. As shown in Figure 9, this assay confirmed the observation of a former study [10] indicating that GSK triggers a rapid endocytosis of TRPV4, as shown by the progressive decrease in the BRET value between TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX following GSK challenging. Moreover, we could confirm that, in hypoxic cells grown at HD, TRPV4 expression at the plasma membrane was highly reduced and TRPV4 did not respond anymore to a further activation by GSK. This indicates that TRPV4 activation was impaired in hypoxia at HD due to an already internalized channel in this condition. The study from Baratchi et al. reported that TRPV4 translocated to the recycling endosomes after GSK stimulation and that the density of TRPV4 at the plasma membrane was controlled through both complete and partial vesicular fusion [10]. It is noteworthy that shear stress stimulation can also modify TRPV4 trafficking in endothelial cells where TRPV4 co-localized with  $\beta$ -catenin, an adapter protein of the adherens junctions

at the point of cell–cell contact, and relocalised after shear stress, losing their interaction with  $\beta$ -catenin [42].

The endocytosis process is known to be mechanosensitive and can thus be regulated by membrane tension and rigidity in association with changes in membrane composition. It was shown that increased membrane tension and rigidity decrease global endocytosis [43,44] whereas hypoxia promotes endocytosis (e.g., of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and alveolar epithelial sodium channel (ENaC) [44].

Overall, the combination of high cell density and hypoxia might change cell rigidity and lipid membrane composition, modulating TRPV4 activation. Such modifications could affect TRPV4 localisation through impairment of TRPV4 addressing to membrane or internalization following desensitisation of the channel. Even though our data show that TRPV4 is clearly sensitive to cell density, it is highly probable that many other channels can also be affected by cell density. Indeed, mechanosensitivity is very important in many physiological processes. A wide range of channels (SAC, stretch-activated channels) act as mechanotransducers by converting physical forces into biological signals [20]. Thus, the loss of TRPV4 expression to the membrane could be compensated by the action of other SAC. Indeed, such a compensatory mechanism was demonstrated for filamins in cultured podocytes exposed to mechanical stress where the knock-out of filamin A was compensated by the expression of filamin B [45]. A similar effect was reported in smooth muscle cells in which an increase in TRPC3 expression was observed when TRPC6 was invalidated [46].

Indeed, the present study shows how experimental conditions can be important parameters when evaluating the effect of hypoxia on TRPV4 channel, and more widely on ionic channels, considering the modification of their expression, trafficking and activity. This also raises awareness of the choice of models used in experimentation. Here, we compared cell confluence in a two dimensional (2D) cell culture model, but it would be interesting to study how TRPV4 responds to hypoxia in a three dimensional (3D) cell culture model, more relevant to physiological conditions, where cells undergo important mechanical tension since they have more cell-to-cell interactions and interact with the extracellular matrix [47,48]. Interestingly, in a 3D model, TRPV4 displayed a diffuse cytoplasmic localization in three types of cancer cells [49], suggesting that TRPV4 localisation is very sensitive to mechanical forces. In addition, another study demonstrated that osteogenic differentiation is regulated by reciprocal feedback between cell volume expansion and TRPV4 activation in mesenchymal stem cells cultured in 3D matrices [50]. These data support the idea that TRPV4 is not only sensitive to cell density in conventional 2D models but can also be affected by mechanical stress occurring in 3D models.

In conclusion, our data highlight the importance of a specific culture condition, namely cell confluence, which can influence many cellular processes. We show that HD alters TRPV4 addressing to the plasma membrane and, thus, GSK-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses in cells exposed to hypoxia. Accordingly, cell confluence should be taken into account when using cell culture to study various pathophysiological pathways, especially considering the differential impact of hypoxia on TRPV4 channel signalling. These results also raise awareness of the impact of techniques and methods of investigation on physiological cell responses.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12070954/s1>, Figure S1: Schematic representation of the golden-gate strategies used to tag TRPV4 and construct the different BRET probes; Figure S2: Characterization of emission spectra of TRPV4 BRET probes in transiently transfected HEK293T cells cultured under normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) at high cell confluence ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>); Figure S3: Electrophysiological characterization of TRPV4 BRET probes in transiently TRPV4-transfected HEK293T cells cultured under normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) at low cell confluence ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>); Table S1: Sequences of cDNA “bricks” used.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.B., Y.P., J.-F.Q. and T.D.; methodology, S.B., A.J., Y.C., Y.P., J.-F.Q. and T.D.; validation, S.B. and T.D.; formal analysis, S.B.; investigation, S.B.; resources, A.J., Y.C. and Y.P.; writing—original draft preparation, S.B. and T.D.; writing—review and editing, S.B., A.J., Y.C., G.C., I.B., V.F.-M., C.G., R.M., P.B., P.V., Y.P., J.-F.Q. and T.D.; visualization, S.B. and T.D.; supervision, Y.P. and T.D.; project administration, T.D.; funding acquisition, Y.P. and T.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the French National Research Agency (ANR), grant number ANR-19-CE44-0010-02 (the CANALBRET project) and the New Aquitaine regional council (Région Nouvelle-Aquitaine), grant number AAPR2020I-2019-8151810 (the PHYSTRIG project).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. White, J.P.; Cibelli, M.; Urban, L.; Nilius, B.; McGeown, J.G.; Nagy, I. Trpv4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 911–973. [[CrossRef](#)]
2. Voets, T.; Prenen, J.; Vriens, J.; Watanabe, H.; Janssens, A.; Wissenbach, U.; Bodding, M.; Droogmans, G.; Nilius, B. Molecular Determinants of Permeation through the Cation Channel Trpv4. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33704–33710. [[CrossRef](#)]
3. Rosenbaum, T.; Benitez-Angeles, M.; Sanchez-Hernandez, R.; Morales-Lazaro, S.L.; Hiriart, M.; Morales-Buenrostro, L.E.; Torres-Quiroz, F. Trpv4: A Physio and Pathophysiologically Significant Ion Channel. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3837. [[CrossRef](#)]
4. Toft-Bertelsen, T.L.; MacAulay, N. Trping to the Point of Clarity: Understanding the Function of the Complex Trpv4 Ion Channel. *Cells* **2021**, *10*, 165. [[CrossRef](#)]
5. Fan, H.C.; Zhang, X.; McNaughton, P.A. Activation of the Trpv4 Ion Channel Is Enhanced by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27884–27891. [[CrossRef](#)]
6. D’Hoedt, D.; Owsianik, G.; Prenen, J.; Cuajungco, M.P.; Grimm, C.; Heller, S.; Voets, T.; Nilius, B. Stimulus-Specific Modulation of the Cation Channel Trpv4 by Pacsin 3. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6272–6280. [[CrossRef](#)]
7. Wegierski, T.; Hill, K.; Schaefer, M.; Walz, G. The Hect Ubiquitin Ligase Aip4 Regulates the Cell Surface Expression of Select Trp Channels. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5659–5669. [[CrossRef](#)]
8. Wang, Y.; Fu, X.; Gaiser, S.; Kottgen, M.; Kramer-Zucker, A.; Walz, G.; Wegierski, T. Os-9 Regulates the Transit and Polyubiquitination of Trpv4 in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 36561–36570. [[CrossRef](#)]
9. Shin, S.H.; Lee, E.J.; Chun, J.; Hyun, S.; Kang, S.S. Phosphorylation on Trpv4 Serine 824 Regulates Interaction with Stim1. *Open Biochem. J.* **2015**, *9*, 24–33. [[CrossRef](#)]
10. Baratchi, S.; Keov, P.; Darby, W.G.; Lai, A.; Khoshmanesh, K.; Thurgood, P.; Vahidi, P.; Ejendal, K.; McIntyre, P. The Trpv4 Agonist Gsk1016790a Regulates the Membrane Expression of Trpv4 Channels. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 6. [[CrossRef](#)]
11. Tuder, R.M.; Yun, J.H.; Bhunia, A.; Fijalkowska, I. Hypoxia and Chronic Lung Disease. *J. Mol. Med.* **2007**, *12*, 1317–1324. [[CrossRef](#)]
12. Lee, J.W.; Ko, J.; Ju, C.; Eltzschig, H.K. Hypoxia Signaling in Human Diseases and Therapeutic Targets. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 1–13. [[CrossRef](#)]
13. Yang, X.R.; Lin, A.H.; Hughes, J.M.; Flavahan, N.A.; Cao, Y.N.; Liedtke, W.; Sham, J.S. Upregulation of Osmo-Mechanosensitive Trpv4 Channel Facilitates Chronic Hypoxia-Induced Myogenic Tone and Pulmonary Hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2012**, *6*, L555–L568. [[CrossRef](#)]
14. Dahan, D.; Ducret, T.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Esteve, E. Implication of the Ryanodine Receptor in Trpv4-Induced Calcium Response in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Normoxic and Chronically Hypoxic Rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2012**, *9*, L824–L833. [[CrossRef](#)]
15. Parpaite, T.; Cardouat, G.; Mauroux, M.; Gillibert-Duplantier, J.; Robillard, P.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Ducret, T. Effect of Hypoxia on Trpv1 and Trpv4 Channels in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Pflug. Arch.* **2016**, *1*, 111–130. [[CrossRef](#)]
16. Rath, G.; Saliez, J.; Behets, G.; Romero-Perez, M.; Leon-Gomez, E.; Bouzin, C.; Vriens, J.; Nilius, B.; Feron, O.; Dessy, C. Vascular Hypoxic Preconditioning Relies on Trpv4-Dependent Calcium Influx and Proper Intercellular Gap Junctions Communication. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2241–2249. [[CrossRef](#)]
17. Butenko, O.; Dzamba, D.; Benesova, J.; Honsa, P.; Benfenati, V.; Rusnakova, V.; Ferroni, S.; Anderova, M. The Increased Activity of Trpv4 Channel in the Astrocytes of the Adult Rat Hippocampus after Cerebral Hypoxia/Ischemia. *PLoS ONE* **2012**, *6*, e39959. [[CrossRef](#)]
18. Ozsimsek, A.; Naziroglu, M. The Involvement of Trpv4 on the Hypoxia-Induced Oxidative Neurotoxicity and Apoptosis in a Neuronal Cell Line: Protective Role of Melatonin. *Neurotoxicology* **2021**, *87*, 136–148. [[CrossRef](#)]



19. Wu, Q.F.; Qian, C.; Zhao, N.; Dong, Q.; Li, J.; Wang, B.B.; Chen, L.; Yu, L.; Han, B.; Du, Y.M.; et al. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Involves in Hypoxia/Reoxygenation Injury in Cardiomyocytes. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2828. [[CrossRef](#)]
20. Barbeau, S.; Gilbert, G.; Cardouat, G.; Baudrimont, I.; Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Marthan, R.; Vacher, P.; Quignard, J.F.; Ducret, T. Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1389. [[CrossRef](#)]
21. Jaasma, M.J.; Jackson, W.M.; Keaveny, T.M. The Effects of Morphology, Confluency, and Phenotype on Whole-Cell Mechanical Behavior. *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 759–768. [[CrossRef](#)]
22. Carreau, A.; el Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why Is the Partial Oxygen Pressure of Human Tissues a Crucial Parameter? Small Molecules and Hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1239–1253. [[CrossRef](#)]
23. Chappe, Y.; Pierredon, S.; Joushomme, A.; Molle, P.; Garenne, A.; Canovi, A.; Barbeau, S.; de Gannes, F.P.; Hurtier, A.; Lagroye, I.; et al. Genetically-Encoded Bret Probes Enlight Ligand Bias-Induced Variable Ion Selectivity in Trpv1 and P2 × 5/7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* submitted. **2022**.
24. Namkung, Y.; le Gouill, C.; Lukashova, V.; Kobayashi, H.; Hogue, M.; Khoury, E.; Song, M.; Bouvier, M.; Laporte, S.A. Monitoring G Protein-Coupled Receptor and Beta-Arrestin Trafficking in Live Cells Using Enhanced Bystander Bret. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12178. [[CrossRef](#)]
25. Chappe, Y.; Michel, P.; Joushomme, A.; Barbeau, S.; Pierredon, S.; Baron, L.; Garenne, A.; de Gannes, F.P.; Hurtier, A.; Mayer, S.; et al. High-Throughput Screening of Transient Receptor Potential Channel 1 Ligands in the Light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer Technique. *Mol. Pharmacol.* **2021**, *100*, 237–257. [[CrossRef](#)]
26. Percherancier, Y.; Berchiche, Y.A.; Slight, I.; Volkmer-Engert, R.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Bouvier, M.; Heveker, N. Bioluminescence Resonance Energy Transfer Reveals Ligand-Induced Conformational Changes in Cxcr4 Homo- and Heterodimers. *J. Biol. Chem.* **2005**, *11*, 9895–9903. [[CrossRef](#)]
27. Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflug. Arch.* **1981**, *2*, 85–100. [[CrossRef](#)]
28. Hamdan, F.F.; Percherancier, Y.; Breton, B.; Bouvier, M. Monitoring Protein-Protein Interactions in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (Bret). *Curr. Protoc. Neurosci.* **2006**, *5*, 23. [[CrossRef](#)]
29. Ruigrok, H.J.; Shahid, G.; Goudeau, B.; de Gannes, F.P.; Poque-Haro, E.; Hurtier, A.; Lagroye, I.; Vacher, P.; Arbault, S.; Sojic, N.; et al. Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Three Trpv Channels. *Biophys. J.* **2017**, *1*, 87–98. [[CrossRef](#)]
30. Zacharias, D.A.; Violin, J.D.; Newton, A.C.; Tsien, R.Y. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric Gfps into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **2002**, *296*, 913–916. [[CrossRef](#)]
31. Yang, J.; Cumberbatch, D.; Centanni, S.; Shi, S.Q.; Winder, D.; Webb, D.; Johnson, C.H. Coupling Optogenetic Stimulation with Nanoluc-Based Luminescence (Bret) Ca(++) Sensing. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13268. [[CrossRef](#)]
32. Kim, K.S.; Yoo, H.Y.; Park, K.S.; Kim, J.K.; Zhang, Y.H.; Kim, S.J. Differential Effects of Acute Hypoxia on the Activation of Trpv1 by Capsaicin and Acidic Ph. *J. Physiol. Sci.* **2012**, *2*, 93–103. [[CrossRef](#)]
33. Nilius, B.; Vriens, J.; Prenen, J.; Droogmans, G.; Voets, T. Trpv4 Calcium Entry Channel: A Paradigm for Gating Diversity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *2*, C195–C205. [[CrossRef](#)]
34. Karttunen, S.; Duffield, M.; Scrimgeour, N.R.; Squires, L.; Lim, W.L.; Dallas, M.L.; Scragg, J.L.; Chicher, J.; Dave, K.A.; Whitelaw, M.L.; et al. Oxygen-Dependent Hydroxylation by Fih Regulates the Trpv3 Ion Channel. *J. Cell Sci.* **2015**, *2*, 225–231.
35. Koizumi, T.; Hikiji, H.; Shin, W.S.; Takato, T.; Fukuda, S.; Abe, T.; Koshikiya, N.; Iwasawa, K.; Toyo-oka, T. Cell Density and Growth-Dependent Down-Regulation of Both Intracellular Calcium Responses to Agonist Stimuli and Expression of Smooth-Surfaced Endoplasmic Reticulum in Mc3t3-E1 Osteoblast-Like Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *8*, 6433–6439. [[CrossRef](#)]
36. Belacel-Ouari, M.; Zhang, L.; Hubert, F.; Assaly, R.; Gerbier, R.; Jockers, R.; Dauphin, F.; Lechene, P.; Fischmeister, R.; Manoury, B.; et al. Influence of Cell Confluence on the Camp Signalling Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell Signal* **2017**, *35*, 118–128. [[CrossRef](#)]
37. Kaya, A.I.; Onaran, H.O.; Ozcan, G.; Ambrosio, C.; Costa, T.; Balli, S.; Ugur, O. Cell Contact-Dependent Functional Selectivity of Beta2-Adrenergic Receptor Ligands in Stimulating Camp Accumulation and Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *9*, 6362–6374. [[CrossRef](#)]
38. Goswami, C.; Kuhn, J.; Heppenstall, P.A.; Hucho, T. Importance of Non-Selective Cation Channel Trpv4 Interaction with Cytoskeleton and Their Reciprocal Regulations in Cultured Cells. *PLoS ONE* **2010**, *7*, e11654. [[CrossRef](#)]
39. Amoozadeh, Y.; Anwer, S.; Dan, Q.; Venugopal, S.; Shi, Y.; Branchard, E.; Liedtke, E.; Ailenberg, M.; Rotstein, O.D.; Kapus, A.; et al. Cell Confluence Regulates Claudin-2 Expression: Possible Role for Zo-1 and Rac. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2018**, *3*, C366–C378. [[CrossRef](#)]
40. Pavel, M.; Renna, M.; Park, S.J.; Menzies, F.M.; Ricketts, T.; Fullgrave, J.; Ashkenazi, A.; Frake, R.A.; Lombarte, A.C.; Bento, C.F.; et al. Contact Inhibition Controls Cell Survival and Proliferation Via Yap/Taz-Autophagy Axis. *Nat. Commun.* **2018**, *1*, 2961. [[CrossRef](#)]
41. Zeybek, N.D.; Baysal, E.; Bozdemir, O.; Buber, E. Hippo Signaling: A Stress Response Pathway in Stem Cells. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* **2021**, *7*, 824–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Baratchi, S.; Knoerzer, M.; Khoshmanesh, K.; Mitchell, A.; McIntyre, P. Shear Stress Regulates Trpv4 Channel Clustering and Translocation from Adherens Junctions to the Basal Membrane. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Joseph, J.G.; Liu, A.P. Mechanical Regulation of Endocytosis: New Insights and Recent Advances. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, e1900278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lopez-Hernandez, T.; Haucke, V.; Maritzen, T. Endocytosis in the Adaptation to Cellular Stress. *Cell Stress* **2020**, *4*, 230–247. [[CrossRef](#)]
45. Greiten, J.K.; Kliewe, F.; Schnarre, A.; Artelt, N.; Schroder, S.; Rogge, H.; Amann, K.; Daniel, C.; Lindenmeyer, M.T.; Cohen, C.D.; et al. The Role of Filamins in Mechanically Stressed Podocytes. *FASEB J.* **2021**, *35*, e21560. [[CrossRef](#)]
46. Dietrich, A.; Schnitzler, Y.; Mederos, M.; Gollasch, M.; Gross, V.; Storch, U.; Dubrovskaya, G.; Obst, M.; Yildirim, E.; Salanova, B.; et al. Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in *Trpc6*<sup>-/-</sup> Mice. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 6980–6989. [[CrossRef](#)]
47. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2d Vs. 3d Cell Culture. *Physiology* **2017**, *32*, 266–277. [[CrossRef](#)]
48. Hameed, P.; Manivasagam, G. An Overview of Bio-Actuation in Collagen Hydrogels: A Mechanobiological Phenomenon. *Biophys. Rev.* **2021**, *13*, 387–403. [[CrossRef](#)]
49. Miermont, A.; Lee, S.W.L.; Adriani, G.; Kamm, R.D. Quantitative Screening of the Effects of Hyper-Osmotic Stress on Cancer Cells Cultured in 2- or 3-Dimensional Settings. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13782. [[CrossRef](#)]
50. Lee, H.P.; Stowers, R.; Chaudhuri, O. Volume Expansion and *Trpv4* Activation Regulate Stem Cell Fate in Three-Dimensional Microenvironments. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 529. [[CrossRef](#)]



# Article 2

**High-Throughput Screening of Transient  
Receptor Potential Channel 1 Ligands in the  
Light of the Bioluminescence Resonance  
Energy Transfer Technique**





# High-Throughput Screening of Transient Receptor Potential Channel 1 Ligands in the Light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer Technique<sup>[S]</sup>

Yann Chappe, Pauline Michel, Alexandre Joushomme, Solène Barbeau, Sandra Pierredon, Luc Baron, André Garenne, Florence Poullétier De Gannes, Annabelle Hurtier, Stanislas Mayer, Isabelle Lagroye, Jean-François Quignard, Thomas Ducret, Vincent Compan, Christelle Franchet, Yann Percherancier

Bordeaux University, CNRS, IMS Laboratory, UMR5218, F-33400 Talence, France (Y.C., A.J., A.G., F.P.D.G., A.H., I.L., Y.P.); Domain Therapeutics, BIOPARC 1, 850 Boulevard Sébastien Brant, F-67400 Illkirch, France (P.M., L.B., S.M., C.F.); Univ. Bordeaux and INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France (S.B., J.F.Q., T.D.); and IGF, CNRS, INSERM, Univ. Montpellier, F-34094 Montpellier, France (S.P., V.C.)

Received March 5, 2021; accepted May 17, 2021

## ABSTRACT

Ion channels are attractive drug targets for many therapeutic applications. However, high-throughput screening (HTS) of drug candidates is difficult and remains very expensive. We thus assessed the suitability of the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technique as a new HTS method for ion-channel studies by taking advantage of our recently characterized intra- and intermolecular BRET probes targeting the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) ion channel. These BRET probes monitor conformational changes during TRPV1 gating and subsequent coupling with calmodulin, two molecular events that are intractable using reference techniques such as automated calcium assay (ACA) and automated patch-clamp (APC). We screened the small-sized Prestwick chemical library, encompassing 1200 compounds with high structural diversity, using either intra- and intermolecular BRET probes or ACA. Secondary screening of the detected hits was done using APC. Multiparametric analysis of our results shed light on the capability of calmodulin inhibitors included in the Prestwick

library to inhibit TRPV1 activation by capsaicin. BRET was the lead technique for this identification process. Finally, we present data exemplifying the use of intramolecular BRET probes to study other transient receptor potential (TRP) channels and non-TRPs ion channels. Knowing the ease of use of BRET biosensors and the low cost of the BRET technique, these assays may advantageously be included for extending ion-channel drug screening.

## SIGNIFICANCE STATEMENT

This study screened a chemical library against TRPV1 ion channel using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) molecular probes and compared the results with the ones obtained using reference techniques such as automated calcium assay and automated patch-clamp. Multiparametric analysis of our results shed light on the capability of calmodulin antagonists to inhibit chemical activation of TRPV1 and indicates that BRET probes may advantageously be included in ion channel drug screening campaigns.

## Introduction

Ion channels are pore-forming membrane proteins allowing ions to flow across membranes. Widely regarded as attractive drug targets for many therapeutic applications, ion channels are the second largest class of membrane proteins for drug discovery behind G protein-coupled receptors (GPCRs). They account for worldwide sales above \$18 billion, which highlights their tractable nature (Wickenden et al., 2012; Global data, 2020). Nonetheless, despite its commercial potential

The research leading to these results received funding from Aquitaine Science Transfert, the Technology Transfer Accelerator Office of New Aquitaine (France); the French National Research Agency (ANR) (grant agreement ANR-19-CE44-0010-02, the CANALBRET project); and the New Aquitaine regional council (grant agreement AAPR2020I-2019-8140410, The PHYSTRIG project).

The authors declare that there is no conflict of interest.

<https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000271>.

<sup>[S]</sup> This article has supplemental material available at [molpharm.aspetjournals.org](http://molpharm.aspetjournals.org).

**ABBREVIATIONS:** ACA, automated calcium assay; AMG517, N-[4-[[6-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]-4-pyrimidinyl]oxy]-2-benzothiazolyl]acetamide; APC, automated patch-clamp; BCT C, N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)piperazine-1-carboxamide; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; CAPS, capsaicin; CaM, calmodulin; CPZ, capsazepine; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK293T, Human embryonic kidney 293 cells, that expresses a mutant version of the SV40 large T antigen; HTS, high-throughput screening; HuH7, Human hepatocyte-derived carcinoma cell line 7; Lac Z, E. Coli bacteria gene encoding the  $\beta$ -galactosidase enzyme; mNeonG, mNeon green protein; nLuc, nano luciferase; rLuc2, renilla luciferase 2; OLDA, N-Oleoyldopamine; RTX, resiniferatoxin; sYFP2, yellow super fluorescent protein 2; T4, DNA ligase from bacteriophage T4; TM, transmembrane domain; TRPV1, transient receptor potential channel 1; TRP, transient receptor potential channel; YFP, Yellow Fluorescent Protein.

and academic relevance, *in vitro* pharmacological profiling of most ion channels remains unaddressed (Bagal et al., 2015).

Automated patch-clamp (APC) is rapidly emerging and provides increased throughput screening of ion channel targets (Obergrussberger et al., 2018), but it remains expensive and requires expert handling (Terstappen et al., 2010; Yu et al., 2016). As a consequence, indirect readout technologies are often used for initial screening to be later confirmed by APC. Generally, these techniques take advantage of fluorescent probes to monitor changes in membrane potential or concentration of cytoplasmic ions such as calcium (Terstappen et al., 2010; Yu et al., 2016; McGivern and Ding, 2020). Such assays give only an indirect readout of channel activity, since they monitor molecular mechanisms that are spatially or temporally distant from the studied channel with the risk that the tested compound could up- or downmodulate nonspecific targets. They are therefore prone to a high yield of false positives (Clare, 2010). This drawback can be bypassed by measuring events proximal to the studied ion channel once activated.

For the last twenty years, resonance energy transfer-based techniques have revolutionized molecular pharmacology and biochemistry, allowing measurement of protein-protein interaction and protein conformational changes in real-time in live cells (Miyawaki and Niino, 2015). These techniques are based on the nonradiative intra- or intermolecular transfer of energy between an energy donor and a compatible fluorescent energy acceptor. Such quantum mechanism strictly relies on molecular proximity (around 100 Å) and orientation between donor and acceptor molecules for energy transfer, making it ideal for probing either protein conformational changes or the dynamic of protein-protein interactions. Independence from an external energy source for donor excitation gives bioluminescence resonance energy transfer (BRET) some advantages over related methods, such as fluorescence resonance energy transfer, by avoiding cells photodamage, fluorophore photobleaching, background autofluorescence, or direct acceptor excitation (Pfleger et al., 2006). Thanks to these advantages, BRET assays have been widely implemented for GPCR and kinases drug screening (Bacart et al., 2008; Kocan and Pfleger, 2011; Schann et al., 2013; Ayoub, 2016).

Ironically, although ion channels have been perceived as the next GPCR for the last 15 years, according to their importance as a drug target (Kaczorowski et al., 2008), they only recently benefited from BRET technology (Robertson et al., 2016; Ruigrok et al., 2017). Such BRET probes monitor molecular events related to ion-channel activation (conformational changes during gating and protein-protein interactions dynamics) that are of utmost importance for ion channel pharmacology while being intractable using either one of the aforementioned reference techniques for ion-channel HTS. They, therefore, opened up new prospects for improving the effectiveness of ion-channel drug screening. Nonetheless, acceptance of intra- and intermolecular BRET assays as novel tools for ion-channel drug screening relies on their efficiency with regards to conventional methods and need therefore a solid proof-of-concept of their operability and effectiveness under real drug screening conditions.

Here, we assessed the suitability of the BRET technique as a new HTS method for ion channels by taking advantage of our recently characterized intra- and intermolecular BRET probes targeting TRPV1 conformational changes during

gating and subsequent coupling with calmodulin (CaM), two events leading to TRPV1 activation and regulation (Ruigrok et al., 2017). We then screened the small-sized Prestwick chemical library, encompassing 1200 FDA- and EMA-approved compounds with high structural diversity using either automated calcium assays (ACAs) or our intra- and intermolecular BRET probes. We next performed a secondary screen of the detected hits with an APC. Multiparametric analysis of our results put into light the power of the BRET technique to unravel hits compounds that would not have been detected with conventional methods such as ACA and APC. Finally, we present data exemplifying the use of intramolecular BRET probes for the study of other TRPs and non-TRPs ion channels.

## Materials and Methods

**Plasmids.** The mammalian expression vector encoding sYFP2-TRPV1-rLuc2, TRPV1-rLuc2, and sYFP2-CaM were described in (Ruigrok et al., 2017). To generate the other BRET constructs, mNeonGreen and nanoluciferase were used to improve the brightness of the assay in some experiments, and are referred as mNeonG and nLuc for short in the rest of this paper. Mammalian expression vectors for the expression of the nLuc-ion channel-mNeonG or mNeonG-ion channel-nLuc fusion proteins were constructed using cDNA bricks obtained by gene synthesis (Genescript, Leiden, Netherlands) that encode, respectively, nLuc or mNeonGreen (brick 1), any ion channel described in the text (brick 2), and mNeonGreen or nLuc (brick 3). Using the BsmBI type IIS enzyme and T4 DNA ligase, the cDNA Bricks were assembled in frame and in the right order into pcDNA 3.1(+)-Lac Z vector, which allowed direct visualization of the assembly efficiency using a colorimetric test based on alpha complementation (Supplemental Table 1). Briefly, a ligation mix containing 2 µl of T4 DNA ligase buffer 10X, 1 U of BsmBI enzyme, 1 U of T4 DNA ligase, 0.4 mM ATP, 4 mM dithiothreitol, 100 ng of pcDNA3.1(+)-Lac Z vector, and 100 ng of bricks 1–3 was subjected to 35 cycles alternating two steps (step 1: 37°C for 1 minute, step 2: 25°C for 1 minute) before the enzymes were inactivated for 5 minutes at 55°C. The ligation mix was then used to transform *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  by thermal shock. The mammalian expression vector for Sulfonyleurea receptor 1 (SUR1) subunit is a kind gift from Jean Révilloud (Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) and was cotransfected with the intramolecular BRET probe targeting the inwardly-rectifying potassium (Kir) channels Kir6.1 at a 1:1 ratio. Mammalian expression vector coding for human calmodulin (clone ID: OHu22088) is from Genescript and was cotransfected with the intramolecular BRET probe targeting the calcium-activated potassium channel KCa2.3 at a 4:1 ratio.

**Reagents.** Olvanil, OLDA, resiniferatoxin (RTX), AMG517, AMG9810, BCTC, JNJ-17203212, and AMG21629 were all from Tocris (Bristol, UK). Capsaicin (CAPS) and capsaizepine (CPZ) were from Sigma (Lyon, France). Coelenterazine H (Nanolight Technology, Pinetop, AZ) was added to a final concentration of 5 µM. The Prestwick chemical library, a collection of off-patent drugs with high chemical and pharmacological diversity, has been obtained from Prestwick Chemical Inc (Illkirch-Graffenstaden, France; <https://www.prestwickchemical.com/screening-libraries/prestwick-chemical-library/>). Of note, we used the previous version of that library with 1200 compounds. Indeed, this library is regularly updated by adding new compounds of interest and removing others.

**Cell Culture and Transfections for BRET Assays.** HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (catalog number D6429; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units.mL<sup>-1</sup> penicillin, and streptomycin. HuH7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (catalog number 31885023; Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 1% glutamax (catalog number 35050-038; Thermo Fisher Scientific), 10% fetal bovine serum, 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin, and streptomycin.

For BRET assays performed in 96-well plates, cells were seeded at a density of 500,000 cells in 6-well dishes, 24 hours before transfection. Transient transfections were performed using polyethylenimine (PEI, linear, Mr 25,000; catalog number 23966 Polysciences, Warrington, PA) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as explained in (Percherancier et al., 2009). For intramolecular BRET assays, HEK293T cells were transfected with 0.1 µg of sYFP2-TRPV1-rLuc2 and 1.9 µg of empty pcDNA3.1(+) vector, whereas HEK293T cells were transfected with 0.1 µg of TRPV1-rLuc2 expression vector and 1.9 µg of sYFP2-CaM expression vectors for intermolecular BRET assays. After overnight incubation, transfected cells were detached and resuspended in DMEM without red phenol (catalog number 21063-029; ThermoFisher Scientific) containing 10% fetal bovine serum and 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin and streptomycin before being seeded at 10<sup>5</sup> cells per well in 96-well white plates (ref 655083, Greiner Bio One, Courtabouf, France). Cells were left in culture for an additional 24 hours before being processed for BRET assay.

BRET assays in high-throughput conditions were performed in 384-well plates using either HEK293T cells transfected with TRPV1-rLuc2 and sYFP2-CaM or HuH7 cells transfected with sYFP2-TRPV1-rLuc2. Briefly, on the day of the transfection, HEK293T and HuH7 cells were rinsed, detached, and resuspended at a density of 350,000–375,000 cells/mL in DMEM without phenol red (catalog number 11880028; ThermoFisher Scientific) supplemented with 1% glutamax, 5% fetal bovine serum, 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin, and streptomycin. Two DNA mix containing either 50 ng/mL of the hTRPV1-rLuc2 expression vector, 200 ng/mL of the sYFP2-Calmodulin expression vector, and 750 ng/mL of noncoding salmon sperm DNA for the intermolecular BRET assay, or 800 ng/mL of YFP-hTRPV1-Luc expression vector and 200 ng/mL of salmon sperm DNA for the intramolecular BRET assay, were prepared in 150 mM NaCl and mixed with an equal volume of PEI, 3 times more concentrated than total DNA [i.e., 3:1 (w/w) PEI/DNA ratio]. The DNA/PEI mix was then incubated for 15 minutes at room temperature before being added to the corresponding cell suspension at a ratio of 1:10 (v/v). HuH7 cells were then seeded directly into white opaque 384-well microplates (catalog number 781080; Greiner Bio One SAS, Les Ulis, France) at a rate of 20 µL per well, i.e., 7,500 cells per well, and were left in culture for an additional 24 hours before being processed for BRET assay. HEK293T cells were seeded into a 75-cm<sup>2</sup> flask (catalog number 15632011; Invitrogen) and were left in culture for an additional 24 hours before being detached and resuspended in equilibration buffer (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, pH 7.5) at a density of 750,000 cells mL<sup>-1</sup>. A 384-well plate was then filled with 20 µL (15,000 cells) of the cell suspension per well and left for equilibration for 1 hour at 22°C in the dark before being processed for BRET assay.

**BRET Measurement in 96-Well Plates.** After the addition of Coelenterazine H into the red-phenol-free cell culture medium at a final concentration of 5 µM, BRET signals were measured using a multidetector TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) and emission filters centered at 540 ± 40 nm for YFP and 480 ± 20 nm for Luc, or 515 ± 40 nm for mNeonGreen and 460 ± 20 nm for nLuc.

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

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

Because of 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 (Hamdan et al., 2006). In that

configuration, the net BRET was therefore 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 ion channel BRET-based probes, Coelenterazine H was added to the cell culture medium 5 minutes before the injection of agonists and antagonists and subsequent BRET readings. In these experiments, the maximal quantity of DMSO was 0.3%. All experiments were performed at 37°C and pH 7.4 unless otherwise indicated.

**Concentration-Response and Drug Screening Using Intramolecular and Intermolecular BRET Assays in 384-Well Plates.** Screening of the Prestwick chemical library was performed at 22°C (intermolecular test) or 37°C (intramolecular test) using a 2-step injection protocol. One minute after the injection of Coelenterazine H in each well (10 µL, 5 µM final) to initiate the bioluminescent reaction catalyzed by the luciferase enzyme, 10 µL of the tested compounds (15 µM final) or vehicle alone was injected to assess each compound ability to activate TRPV1 (hereafter designated as activation mode). BRET measurements were performed 5 minutes (intermolecular BRET assay) or 15 minutes (intramolecular BRET assay) after compound injection using an EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) with emission filters centered at 535 ± 15 nm for YFP ( $I_{acceptor}$ ) and 480 ± 15 nm for Luc ( $I_{donor}$ ). Immediately after this first BRET measurement, 20 µL of the prototypic agonist CAPS (final concentration: 500 nM) was injected in each well to assess the ability of each compound to inhibit chemical activation of TRPV1 (hereafter designed as “inhibition mode”). A second BRET measurement was then performed after CAPS injection. In the inhibition mode, the final concentration of the tested compound was 10 µM.

The data in the activation mode are expressed according to eq. 2, and data in the inhibition mode are expressed according to eq. 3.

$$\% \text{ of CAPS effect} = 100 \times \left( \frac{BRET_{comp} - BRET_{base}}{BRET_{CAPS_{max}} - BRET_{base}} \right) \quad (2)$$

$$\% \text{ of inhibition} = \left( \frac{BRET_{comp} - BRET_{CAPSEC80}}{BRET_{base} - BRET_{CAPSEC80}} \times 100 \right) \quad (3)$$

where  $BRET_{comp}$  is the net BRET in the presence of the compound,  $BRET_{base}$  is the basal BRET before injection of the compounds,  $BRET_{CAPS_{EC80}}$  and  $BRET_{CAPS_{max}}$  are the net BRET measured in presence of 500 nM and 15 µM capsaicin, respectively. Two independent runs (n1 and n2) were performed, and an arbitrary percent activation or inhibition cut-off of 30% was chosen to select hit compounds. A counter screen was performed using HEK293T cells transfected with TRPV1-rLuc2 alone. The compound effects on TRPV1 intra- and intermolecular BRET probes were validated only if the basal BRET of TRPV1-rLuc2 remained unaffected during the counter screen step.

In all experiments performed in 384-well plates, the final quantity of DMSO was 1% in the activation mode and 0.87% in the inhibition mode. Reference compounds effects were assessed both in the activation and inhibition modes using identical protocols, except that concentration-response curves were performed instead of a single concentration measurement. All injection steps were done using a TECAN EVO Freedom 150 Platform (TECAN, Männedorf, Switzerland).

**Automated Calcium Assay.** Automated calcium assays were outsourced to Eurofins Pharma Discovery Services (St. Charles, MO). Briefly, HEK293 cell line stably expressing human TRPV1 (Eurofins catalog number CYL3063) were plated in 384-well plates in maintaining medium and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hours, the medium was aspirated from the 384 wells and 40 µL of

dye loading buffer (Hanks' balanced salt solution supplemented with 20 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM probenecid, and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fluo-8  $\text{Ca}^{2+}$  dye) was added to the cells in each well. The assay plate was incubated at 30°C and 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified chamber for at least 80 minutes prior to washing and addition of the Assay buffer (Hanks' balanced salt solution supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4). The calcium-flux assays were performed on a Molecular Devices' FLIPR<sup>Tetra</sup> plate reader (San Jose, CA) using an excitation filter centered at 482.5  $\pm$  12.5 nm and an emission filter centered at 545  $\pm$  30 nm. Concentration-response curves were obtained in duplicate by either injecting increasing concentrations of the indicated reference agonist compounds or by injecting increasing concentration of the indicated reference antagonist compound followed, 3 minutes later, by an injection of 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS. Single-point screening of the Prestwick chemical library was performed using an initial injection of the tested compounds at a final concentration of 15  $\mu\text{M}$  to assess each compound's ability to activate TRPV1 for 180 seconds, followed by a second injection of 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS to assess each compound's ability to inhibit CAPS-activated TRPV1 for another 180 seconds. In the inhibition mode, the final concentration of the tested compound was 10  $\mu\text{M}$ . The compound wells, reference agonist, reference antagonist, and background vehicle controls were prepared in DMSO at 0.44% final in the activation assay and 0.33% final in the inhibition assay. Two independent experiments were performed on all duplicate tests. All plates were subjected to appropriate baseline corrections. Once baseline corrections were processed, maximum fluorescence values were exported to calculate the normalized  $\text{Ca}^{2+}$  flux relatively to CAPS activation according to eq. 4:

$$\text{normalized } \text{Ca}^{2+} \text{ flux} = \frac{\text{RFU}_{\text{max}} - \text{Baseline}_{\text{avg}}}{\text{RFU}_{\text{CAPS}} - \text{Baseline}_{\text{avg}}} \quad (4)$$

where  $\text{RFU}_{\text{max}}$  and  $\text{Baseline}_{\text{avg}}$  are the maximal fluorescence signal and the baseline signal measured during the recording session of the tested compound respectively, and  $\text{RFU}_{\text{CAPS}}$  is the maximal fluorescence signal measured with either 4  $\mu\text{M}$  CAPS (activation mode) or 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS (inhibition mode).

In the activation mode, the results are expressed as % of CAPS effect according to eq. 5:

$$\% \text{ of CAPS effect} = \text{normalized } \text{Ca}^{2+} \text{ flux} \times 100 \quad (5)$$

In the inhibition mode, the % of inhibition induced by a compound is given by eq. 6:

$$\% \text{ of inhibition} = 100 - (\text{normalized } \text{Ca}^{2+} \text{ flux} \times 100) \quad (6)$$

**Manual Patch-Clamp.** For whole-cell electrophysiological study, transiently transfected HEK293T cells were bathed in an extracellular medium containing 135 mM NaCl, 5 mM CsCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM glucose, and 10 mM HEPES. The osmolarity (measured with a cryosmometer type 15 Löser) of the external salt solution was adjusted to 300 mOsm with Mannitol and pH adjusted to 7.4 with NaOH. The recording patch-clamp pipette was filled with artificial intracellular saline containing 130 mM CsCl, 5 mM EGTA, 5.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , and 5 mM HEPES (290 mOsm adjusted with Mannitol and pH 7.2 adjusted with NaOH).

Cells were viewed under phase contrast using a Nikon Diaphot inverted microscope. Borosilicate glass micropipettes (GC150F-10, Harvard Apparatus, Phymep, Paris, France) were pulled with a DMZ-Universal puller. The pipettes had a mean resistance of 4 M $\Omega$  when measured under standard recording conditions. An RK-400 patch-clamp amplifier (Biologic, Claix, France) was used for whole-cell recordings. Stimulus control, data acquisition, and processing were carried out on a PC fitted with a Digidata 1200 interface, using the pCLAMP 10.7 software (Molecular Devices, Foster City, CA). Current records were filtered using a Bessel filter at 1 kHz and digitized for storage and analysis. Recordings were performed in voltage-

clamp and whole-cell configurations to measure global currents. After the seal, a resting potential of -60 mV was imposed, and 650 millisecond voltage ramps from -60 to +60 mV were applied every 10 seconds for 3 minutes. After 4 ramps, capsaicin (10  $\mu\text{M}$ ) was applied to the recorded cell by pressure ejection from a glass pipette located close to the cell. Capsaicin-activated currents were determined by the difference between maximal capsaicin-induced and average current before ejection. Currents were then normalized to cell capacitance and expressed as pA/pF.

**Automated Patch-Clamp Assay.** Automated patch-clamp assays were outsourced to SB Drug Discovery (Glasgow, UK). Briefly, automated patch-clamp recordings were performed using the SyncroPatch 384PE (Nanion, Munich, Germany) and HEK293 cell line stably expressing human TRPV1 (SB Drug Discovery) that were plated 24 hours before the experiment and incubated at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . The voltage protocol generation and data collection were performed with the PatchController384 V1.6.6 and Data Controller V1.6.0. Concentration-response curves were obtained by injecting either increasing concentrations of the indicated reference agonist compounds or by injecting increasing concentration of the indicated reference antagonist compound followed 3 minutes later by an injection of 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS. Screening of the Prestwick chemical library was performed with two different protocols to assess the ability of 10  $\mu\text{M}$  concentration of a test compound to either activates TRPV1 (activation mode) or to inhibits CAPS-activated TRPV1 (inhibition mode).

**Activation Mode:** The protocol consisted of two applications (control period) of an external solution containing 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, and 5 mM glucose, at pH 7.4, followed by the addition of 10  $\mu\text{M}$  of the test compound (1 to 2 minutes). Then, a maximum concentration of agonist (3–10  $\mu\text{M}$  capsaicin) was added to confirm the presence of the TRPV1 channel, and lastly, addition of the full block with 10  $\mu\text{M}$  capsazepine (1 minute) was done. Data points that did not fulfill these controls were discarded. Data were normalized according to eq. 7:

$$\% \text{ of CAPS effect} = 100 \times \left( \frac{I_{\text{comp}} - I_{\text{base}}}{I_{\text{max}} - I_{\text{base}}} \right) \quad (7)$$

where  $I_{\text{comp}}$  is the current in the presence of the compound,  $I_{\text{base}}$  is the baseline current, and  $I_{\text{max}}$  is the max current in the presence of the maximum concentration of compound or capsaicin. The concentration-response curves are constrained between 0 (no activation) and 100 (maximum activation).

**Inhibition Mode:** The protocol consisted of two applications of external solution (control period), one application of the agonist capsaicin  $\text{EC}_{50}$  (50 nM) for 1 to 2 minutes, followed by addition of 10  $\mu\text{M}$  of the test compound (1 to 2 minutes) in the presence of capsaicin  $\text{EC}_{50}$ , and lastly, addition of 10  $\mu\text{M}$  capsazepine (1 minute) to control for full inhibition. Data were expressed as % of inhibition according to eq. 8:

$$\text{normalized Current} = 100 - \left( \frac{I_{\text{comp}} - I_{\text{base}}}{I_{\text{ref}} - I_{\text{base}}} \times 100 \right) \quad (8)$$

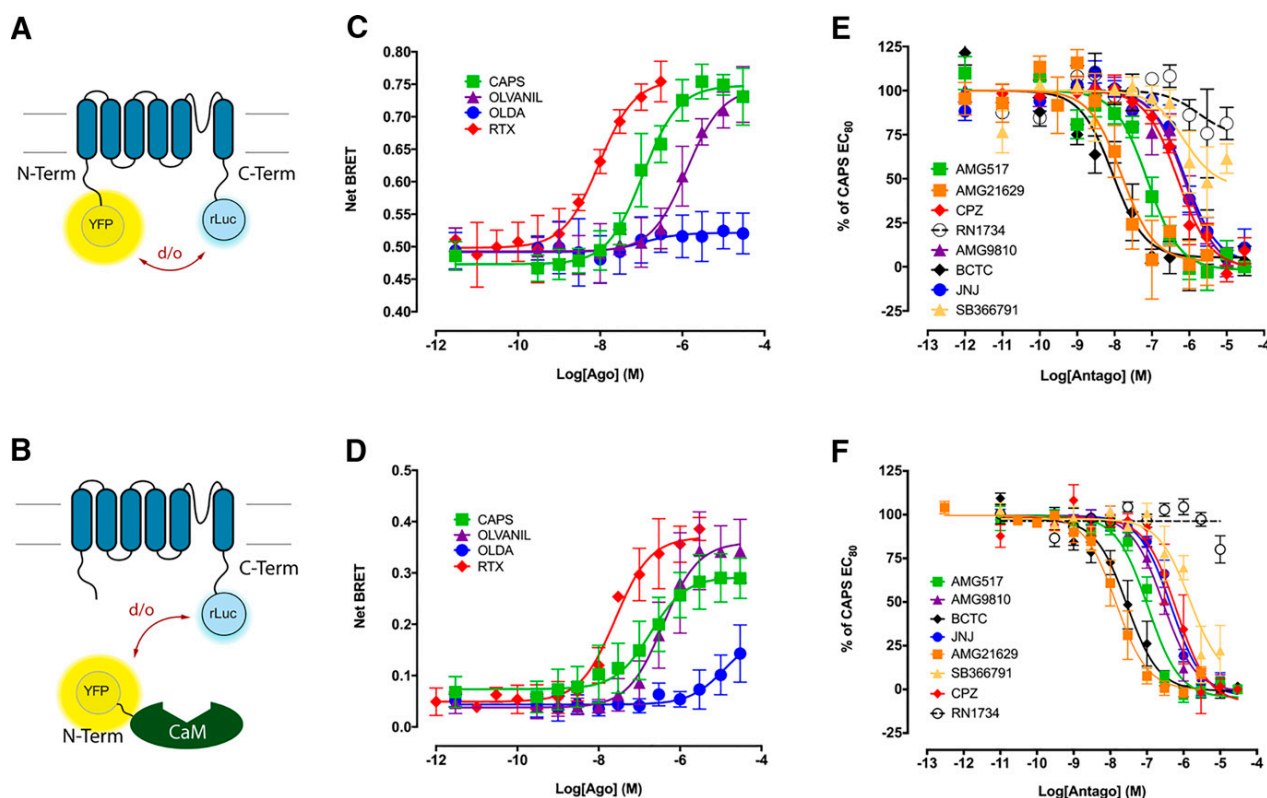
where  $I_{\text{comp}}$  is the current in the presence of the compound,  $I_{\text{base}}$  is the baseline current, and  $I_{\text{ref}}$  is the current in the presence of the capsaicin  $\text{EC}_{50}$ . The concentration-response curves are constrained between 0 (no inhibition) and 100 (maximum inhibition).

In both activation and inhibition mode, the current was monitored using a ramp protocol from -100 mV to +100 mV over 300 milliseconds, from a holding potential of -60 mV, which was repeated every 20 seconds. The maximum outward current at +100 mV was used for analysis. In each condition, the maximum DMSO concentration at the end of the run was 0.3%.

**Data Preparation, Normalization, Analysis, and Statistics.** GraphPad Prism v6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for plotting concentration-response curves. The size of the error bars indicates the S.D. within the data set.







**Fig. 1.** Measuring TRPV1 activity using an intramolecular or an intermolecular BRET. (A) Schematic representation of the sYFP2-TRPV1-rLuc2 intramolecular BRET probe, where sYFP2 was fused to the N-terminal extremity of TRPV1, whereas rLuc2 was fused to the C-terminal extremity of TRPV1. After activation of TRPV1, the distance ( $d$ ) and/or the orientation ( $o$ ) between rLuc2 and sYFP2 are expected to be modified during TRPV1 gating and subsequent conformational changes of TRPV1 subunits (Ruigrok et al., 2017). (B) Schematic representation of the intermolecular BRET assay assessing the coupling of TRPV1 to calmodulin. The sYFP2 fluorescent protein was fused to the N-terminal extremity of Calmodulin and rLuc2 to the C-terminal extremity of TRPV1. After activation of TRPV1, TRPV1 coupling to CaM is expected to be increased, thereby affecting the distance  $d$  between rLuc2 and sYFP2. (C and D) Concentration-response curves of various agonists-induced BRET changes measured in HEK293T cells expressing the sYFP2-TRPV1-rLuc2 BRET probe (C,  $n = 5$  for all compounds) or the TRPV1-rLuc2/sYFP2-CaM constructs (D,  $n = 9$  for CAPS,  $n = 5$  for RTX,  $n = 4$  for Olvanil and OLDA). (E and F) Concentration-response curves of the ability of various antagonists to inhibit CAPS (500 nM) induced BRET changes in HEK293T cells expressing the sYFP2-TRPV1-rLuc2 BRET probe (E,  $n = 4$  for all compounds) or the TRPV1-rLuc2/sYFP2-CaM constructs (F,  $n = 4$  for all compounds).

obtained with the antagonist compounds, we found that the  $pIC_{50}$  measured with both intramolecular and intermolecular BRET probes were again close to the ones measured with the ACA. APC yielded, however, significantly better  $pIC_{50}$  than the ones measured with either BRET probes or ACA for five antagonists out of the seven tested. Knowing that the concentration of compounds tested in a primary high-throughput screening usually lies between 1 and 10  $\mu$ M, our results nonetheless indicate that both TRPV1-based BRET assays are as fit to perform high-throughput screening as the conventional APC and automated  $Ca^{2+}$ -flux methods.

**Assessment of Technical and Biological Reproducibility for Both Intra- and Intermolecular BRET Assays.** We next assessed the suitability of our BRET assays for HTS purposes using transfected cells seeded in 384-well plates. We first assessed the technical and biological reproducibility of both intra- and intermolecular BRET assays by comparing the results of two independent experiments (done on two different days) where CAPS concentration-response curves were obtained on four consecutive 384-well plate assays (Fig. 3). All concentration-response curves fitting into the range of three S.D.s, our results indicated that both TRPV1 intra- and intermolecular assays offered good biologic

and technical reproducibility (Fig. 3, A and B). To determine the  $Z'$ -factor of the assay (Zhang et al., 1999), we measured the efficacy of 500 nM CAPS to trigger TRPV1 conformational change and calmodulin coupling over five independent experiments performed over three different days with 16–24 wells measured per plate (Fig. 3, C and D). All calculated  $Z'$ -factor were above or close to 0.5, indicating that both intra- and intermolecular assays for TRPV1 were of high quality and suitable for HTS [average  $Z'$ -factor were  $0.58 \pm 0.04$  (average  $\pm$  S.E.) and  $0.54 \pm 0.04$  for intra- and intermolecular BRET assays, respectively].

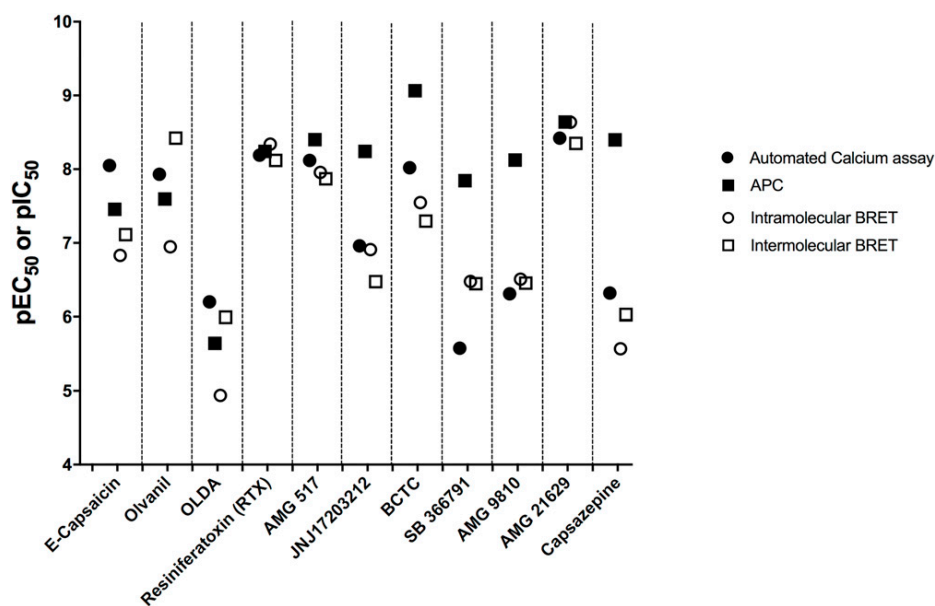
**The Primary Screen of the Prestwick Chemical Library for TRPV1 Activation and Inhibition.** Based on this conclusion, we used HTS experimental conditions with ACA and both intra- and intermolecular BRET probes to screen the Prestwick chemical library for both activation (Fig. 4) and inhibition (Fig. 5) of TRPV1. The final drug concentration was 15  $\mu$ M during the measurement of the compound efficacy to activate TRPV1 and was 10  $\mu$ M during the measurement of the compound efficacy to inhibit TRPV1 activation after the injection of 500 nM CAPS (which is close to CAPS EC<sub>80</sub> in our experimental condition, e.g., the concentration of CAPS inducing 80% of TRPV1 maximal activation).

TABLE 2

pEC<sub>50</sub>/pIC<sub>50</sub> values derived from curve fitting of TRPV1 agonists/antagonists dose-response measured using YFP-TRPV1-Luc intramolecular BRET probe, TRPV1-Luc/YFP-CaM intermolecular BRET probe, ACA, and APCBRET assays were measured both in 96-well plate and 384 well plate's formats. Values represent the mean ± S.E. of 3–9 independent experiments performed in duplicate. Values found in the literature are also indicated along with the method used, cellular model, and reference.

Compound	Intramolecular BRET Probe		Intermolecular BRET Probe		ACA	APC	Potency Found in the Literature	Method	Cellular Model	Reference
	96 wells	384 wells	96 wells	384 wells						
<b>Agonists</b>										
<b>Capsaicin</b>	6.96 ± 0.07	6.83 ± 0.05	6.73 ± 0.10	7.11 ± 0.21	8.05 ± 0.08	7.45 ± 0.03	7.1 - 7.3	Ca <sup>2+</sup> (Fluo3/4)	HEK293	(Ralevic et al., 2001; Bianchi et al., 2006)
<b>Olvamil</b>	5.89 ± 0.10	6.95 ± 0.05	6.42 ± 0.11	8.42 ± 0.16	7.93 ± 0.13	7.59 ± 0.04	6.36 - 7.73	Ca <sup>2+</sup> (Fluo3/4)	HEK293	(Ralevic et al., 2001; Bianchi et al., 2006)
<b>OLDA</b>	6.96 ± 0.74	4.94 ± 0.11	4.90 ± 0.31	5.99 ± 0.30	6.20 ± 0.10	5.64 ± 0.05	5.49 ± 0.06	Ca <sup>2+</sup> (Fluo4)	HEK293	(Bianchi et al., 2006)
<b>RTX</b>	8.02 ± 0.08	8.34 ± 0.06	7.59 ± 0.08	8.12 ± 0.18	8.19 ± 0.08	8.24 ± 0.04	7.92 - 8.69	<sup>45</sup> Ca uptake Ca <sup>2+</sup> (Fluo4)	HEK293 neurons	(Winter et al., 1990; Bianchi et al., 2006)
<b>AMG 517</b>	7.12 ± 0.10	7.85 ± 0.14	6.97 ± 0.07	7.87 ± 0.05	8.12 ± 0.09	8.40 ± 0.05	9.19 ± 0.25	<sup>45</sup> Ca uptake	CHO	(Gavva et al., 2007b)
<b>JNJ17203212</b>	6.12 ± 0.11	6.91 ± 0.07	6.34 ± 0.06	6.47 ± 0.09	6.96 ± 0.02	8.24 ± 0.06	7.20 ± 0.11	Ca <sup>2+</sup> (Fluo3)	HEK293	(Swanson et al., 2005)
<b>BCTC</b>	8.05 ± 0.14	7.55 ± 0.05	7.54 ± 0.10	7.30 ± 0.02	8.02 ± 0.01	9.06 ± 0.02	8.77 ± 0.01	Calcium4	CHO-Trex	(Papakosta et al., 2011)
<b>SB 366791</b>	6.15 ± 0.35	6.47 ± 0.14	5.83 ± 0.21	6.45 ± 0.20	5.58 ± 0.08	7.84 ± 0.06	6.89 ± 0.22	<sup>45</sup> Ca uptake	CHO	(Guenthorpe et al., 2004; Gavva et al., 2005)
<b>AMG 9810</b>	6.12 ± 0.10	6.51 ± 0.32	6.55 ± 0.06	6.45 ± 0.09	6.31 ± 0.05	8.12 ± 0.04	7.72 ± 0.33	<sup>45</sup> Ca uptake	CHO	(Gavva et al., 2005)
<b>AMG 21629</b>	7.8 ± 0.18	8.64 ± 0.06	7.84 ± 0.09	8.35 ± 0.06	8.42 ± 0.04	8.64 ± 0.08	9.28 ± 0.23	<sup>45</sup> Ca uptake	CHO	(Gavva et al., 2007a)
<b>Capsazepine</b>	6.31 ± 0.08	n.d.	6.19 ± 0.14	n.d.	6.32 ± 0.04	8.40 ± 0.06	7.90 - 8.27	<sup>45</sup> Ca uptake Ca <sup>2+</sup> (Fluo4)	CHO HEK	(Gavva et al., 2005; Bianchi et al., 2006)





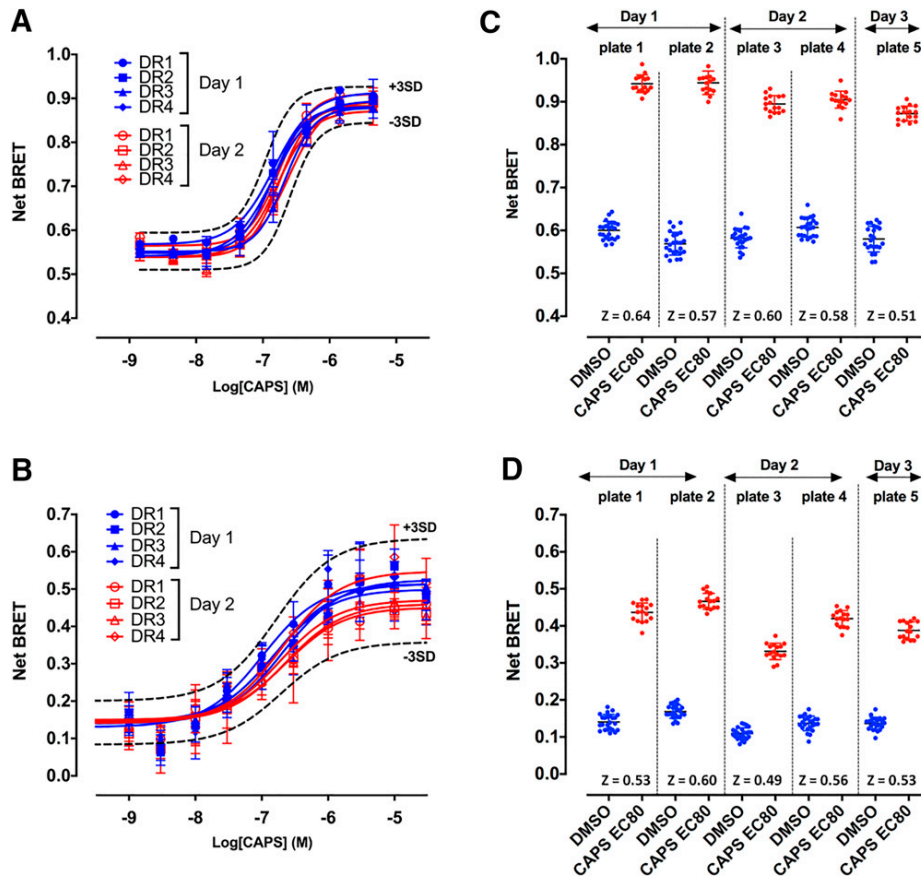
**Fig. 2.** Comparison of the reference agonist and antagonist potencies when measured in HTS conditions using either the intramolecular BRET probe, the intermolecular BRET probe, APC, or ACA.

Two independent runs (n1 and n2) were performed, and an arbitrary percent activation or inhibition cut-off of 30% was chosen to select hit compounds. As expected, most compounds exhibited little to no effect whatever the assay considered, whereas a small percentage of compounds demonstrated positive or negative modulation of TRPV1 activity in either activation or inhibition modes (Fig. 4, A–C, Fig. 5, A–C, and Supplemental Table 2). Interestingly, when plotting the compounds' percent distribution histograms, data from BRET experiments exhibited distribution profiles different than data issued from the  $\text{Ca}^{2+}$  flux method. The latter displayed an asymmetric profile with a significantly broader basis, especially in the inhibition mode (Fig. 4, D–F and Fig. 5, D–F). Reproducibility between the results obtained during the two independent runs was derived from scatter plots analysis (Fig. 4, G–H and Fig. 5, G–H) using different statistical methods. Firstly, the median distance between each experimental dot and a theoretical perfect duplicate assay was computed and compared between the three methods used (intramolecular BRET probe, intermolecular BRET probe, and ACA) for both activation and inhibition modes (Supplemental Fig. 2). We found that data dispersion was significantly lower for the intermolecular BRET probe than for the two other techniques in the activation mode and significantly lower for both intra- and intermolecular BRET assays in comparison with the results obtained with ACA in the inhibition mode. Secondly, the global dispersion of the pooled data (n1 and n2) was estimated using 4 classic dispersion metrics: the median absolute deviation, the difference between the largest and smallest values (range), the quartile coefficient of dispersion, and the interquartile range. For all these four metrics, the radar chart area is proportional to the data dispersion. As shown in Supplemental Fig. 3, the calcium-activated method exhibited a much larger area compared with values obtained from the two BRET assays, pointing toward a higher overall signal values dispersion of ACA. The overall conclusion is that TRPV1 BRET probes provide a statistically better signal reproducibility than ACA in

high-throughput screening conditions. Accordingly, we found a significantly higher percentage of confirmed hits between both replicate assays in the activation mode when using intra- or intermolecular BRET probes (100% and 87.5% of confirmed hits, respectively) in comparison with the calcium assay, for which we found 18.1% of confirmed hits (Table 3). Although the percentage of confirmed hits was lower in the inhibition mode than in the activation mode for all three assays, the percentage of confirmed hits for both intra- and intermolecular BRET probes (42.6% and 58.8%, respectively) was still higher than the one found for the calcium assay (31.2%). This confirms that both BRET assays are sufficiently fit for reliable hit identification.

**Hit Confirmation with APC.** The Venn diagrams in Fig. 6 show the total number of unique hits detected by each assay in the activation mode (Fig. 6A) and the inhibition mode (Fig. 6B). A total of 22 compounds were shown to reproducibly trigger TRPV1 in both replicate screens, whereas 47 compounds were shown to reproducibly inhibit TRPV1(CAPS). Remarkably, only three hits were common to the three methods when regarding the inhibition mode (thioridazine hydrochloride, perphenazine, and benzethonium chloride), whereas no hits were common to the three methods when regarding the activation mode. Two hits were detected by both intermolecular and calcium assay to activate TRPV1. Considering the inhibition mode, one hit was common to both calcium assay and intermolecular BRET probe, two hits were common to both intramolecular BRET probe and calcium assay, and four hits were common to both intra- and intermolecular BRET probes. Since 10 compounds were identified in at least two different tests, all assays combined, this primary screen, therefore, identified a total of 59 hits (4.9% of the bank).

We then reassessed the efficacy of each of these 59 compounds to activate TRPV1 or inhibit TRPV1(CAPS) using APC. In a preliminary step, we first confirmed that TRPV1 behaved as an outwardly rectifying channel when stably

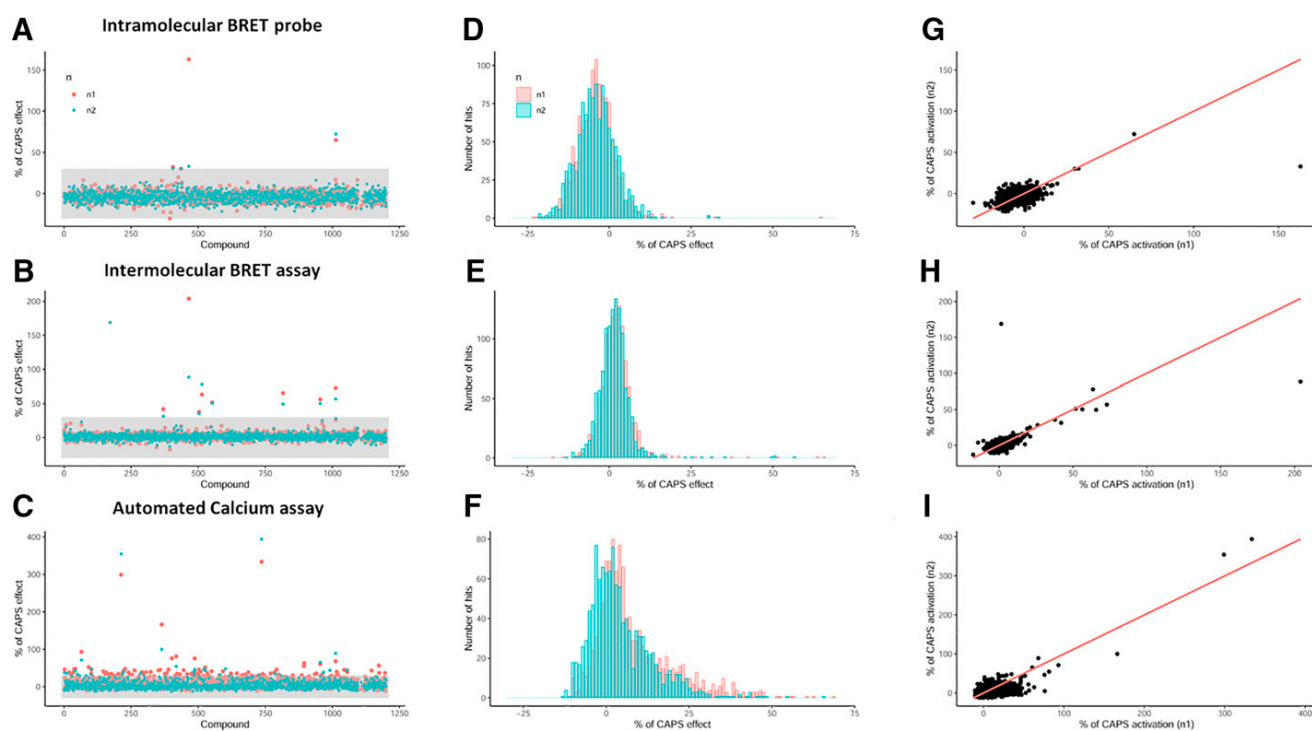


**Fig. 3.** Validation of the suitability of the intramolecular and intermolecular BRET assays targeting TRPV1 for HTS. (A and B) Assessment of the technical and biological reproducibility to measure CAPS-induced dose-dependent increase of the BRET signal measured with intramolecular (A) and intermolecular (B) BRET probes targeting TRPV1. Two sets of four independent dose responses were performed on two different days using each BRET sensor to verify that all concentration-response curves fall within three S.D.s of the mean. (C and D)  $Z'$ -factor: Cells transfected with the sYFP2-TRPV1-rLuc2 intramolecular BRET probe (C) or coexpressing TRPV1-rLuc2 and sYFP2-calmodulin (D) were seeded in white opaque tissue culture 384-well plates (see *Materials and Methods* for details). BRET measurements were performed in the presence or absence of CAPS at a concentration equivalent to the  $EC_{50}$  (500 nM). In total, 5 consecutive 384-well plates were processed over 3 consecutive days with 16–24 wells read per plate and per condition.  $Z'$ -factor were calculated using the following formula (Zhang et al., 1999):  $Z' = 1 - [3 \times \text{S.D.}(\text{BRET}_{\text{agonist}}) + 3 \times \text{S.D.}(\text{BRET}_{\text{basal}})] / [\text{Mean}(\text{BRET}_{\text{agonist}}) - \text{Mean}(\text{BRET}_{\text{basal}})]$ .

expressed in HEK293T cells, as already described by others in several primary cells and cell lines (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Premkumar et al., 2002) (Fig. 7A). Knowing the outward rectifying properties of TRPV1, it is important to emphasize that most electrophysiologists assess TRPV1 activity by measuring the outward potassium current flowing through the TRPV1 ion channel at high positive membrane potential (e.g., between +60 and +100 mV). The reason is that, although this outward current measured at high positive membrane potential is less physiologically relevant, it is of much greater amplitude than the inward current measured at the negative resting membrane potential of cells (Priest et al., 2007). During a drug screening, the implicit assumption for such practice is that any hit displays an equal ability to activate or inhibit TRPV1 gating irrespective of the membrane potential. We, therefore, compared CAPS and CPZ potency to activate or inhibit TRPV1 ion channel when cell membrane potential was clamped at +100 mV, –25 mV [which is the resting membrane potential of HEK293T cells (Kirkton and Bursac, 2011)] and –100 mV. As shown in Fig.

7B, CAPS potency was right-shifted when the membrane potential was shifted from +100 mV to –25 mV and remained identical between –25 mV and –100 mV. CPZ potency to antagonize TRPV1 gating by CAPS was similar between +100 mV and –25 mV but was right-shifted at –100 mV (Fig. 7B, right panel). These results indicated that the membrane potential impacts CAPS and CPZ potency to activate or inhibit TRPV1. By the way, they (i) provided a potential explanation for the difference in the apparent potency of some TRPV1 agonists and antagonists measured with either APC, BRET probes, or ACA (Figs. 1 and 2), and (ii) called for an in-depth analysis of the efficacy of the 59 identified compounds to activate or inhibit TRPV1 gating as a function of the applied membrane potential during APC experiments.

Among the 59 compounds tested, 5 compounds known to be detergent molecules induced a high nonspecific current in untransfected HEK293T cells [chlorhexidine (#10), methyl benzethonium chloride (#38), benzethonium chloride (#39; which one was initially identified by all methods), alexidine dihydrochloride (#42), thonzonium bromide (#49)] and were



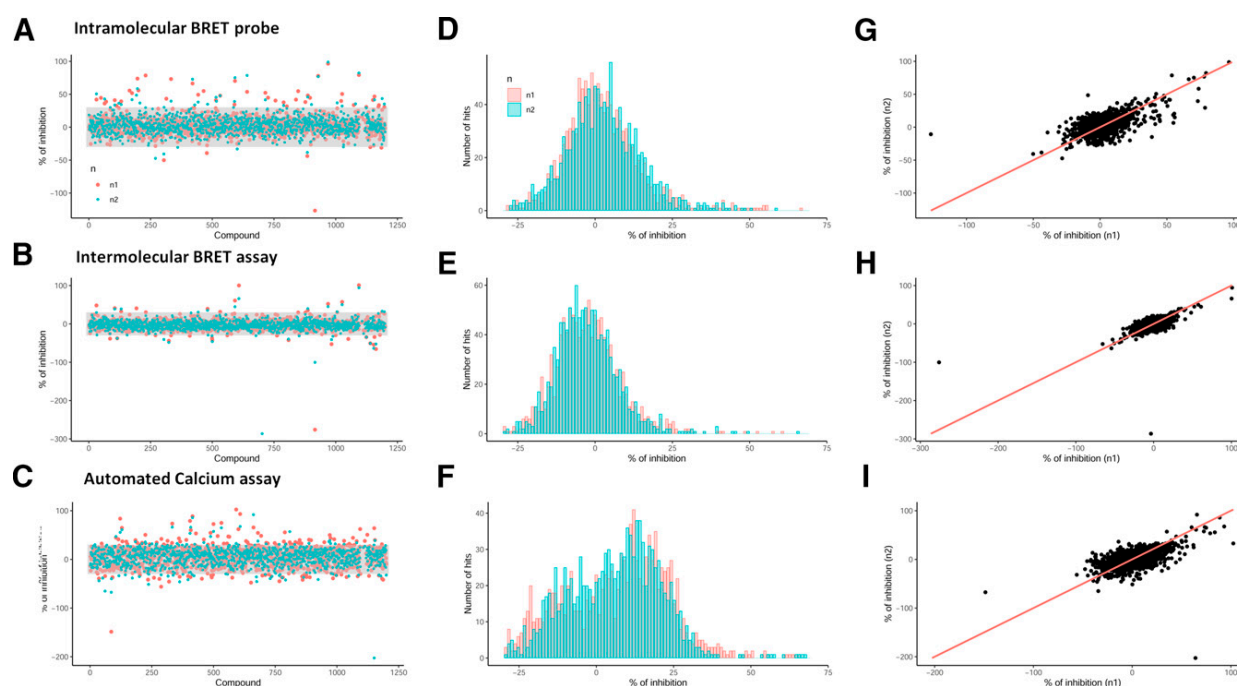
**Fig. 4.** Screening of the Prestwick Chemical Library for identification of TRPV1 activators. “n1” and “n2” stand to the first and second screens. (A, B, C) Identification of candidate compounds activating TRPV1 in the primary screen of the Prestwick chemical library using the intramolecular BRET probe (A), the intermolecular BRET assay (B), and the automated calcium assay (C). The concentration of the compound tested was 15  $\mu\text{M}$  in each test. Values were normalized to the maximal efficacy measured in presence of 4  $\mu\text{M}$  CAPS (ACA) or 15  $\mu\text{M}$  CAPS (BRET assays). Positive candidate compounds were identified by a relative efficacy of at least 30% of maximal CAPS efficacy in the two independent technical replicates of the screen (area in gray). (D, E, F) Histogram of relative compounds efficacies to induce TRPV1 activation when assessed with the intramolecular BRET probe (D), the intermolecular BRET assay (E), and automated calcium assay (F). The x-axes were bounded in the  $[-30, 75]$  interval to align the histograms horizontally. The numbers of nondisplayed values are 7, 1, 7, and 110 for intramolecular BRET, intermolecular BRET, and calcium assays, respectively. (G, H, I) Scatter plot of the Prestwick chemical library screen performed in duplicate with the intramolecular BRET probe (G), the intermolecular BRET assay (H), and the automated calcium assay (I). The red line represents the  $y=x$  equation.

discarded from the rest of the study (Supplemental Table 3). Assessment of the ability of the 54 remaining drugs to either activate TRPV1 or inhibit TRPV1(CAPS) indicated a strong disparity between the results measured at  $-100$  mV,  $-25$  mV, and  $+100$  mV (Fig. 7, C and D). Only six compounds were shown to be confirmed as TRPV1 activator by APC at  $+100$  mV, with a cut-off of 30% of CAPS efficacy (Fig. 7C). Among these six compounds, only two (compounds 40 and 47) were detected whatever the voltage used. Interestingly, compound 27 was found to activate TRPV1 very efficiently at  $+100$  and  $-100$  mV but not at  $-25$  mV. Also, compounds 29 and 58 did not activate TRPV1 at  $+100$  and  $-25$  mV, whereas they did it at  $-100$  mV. Eleven compounds inhibited CAPS-induced TRPV1 activation at  $+100$  mV, but only three of them inhibited TRPV1 activation by CAPS whatever the voltage used (compounds 20, 32, and 58) (Fig. 7D). Compounds 22, 30, and 48 partially blocked TRPV1 activation by CAPS at  $+100$  mV, but displayed no inhibitory activity at either  $-25$  mV or  $-100$  mV. Compound 19 efficiently inhibited TRPV1-CAPS activation at  $+100$  mV but potentiated CAPS activation at  $-25$  mV and had no effect at  $-100$  mV. Compound 60 was as efficient as CPZ to antagonize CAPS activation of TRPV1 at both  $+100$  and  $-25$  mV, but potentiated CAPS activation at  $-100$  mV. Compound 55 behaved as

a partial antagonist of TRPV1 activation by CAPS at  $-25$  and  $-100$  mV, but had no effect at  $+100$  mV. Compound 31 potentiated TRPV1 activation by CAPS at  $-100$  mV but had no effect at either  $-25$  mV or  $+100$  mV. Finally, compound 40 (not represented on Fig. 7C for simplification) strongly potentiated CAPS activation whatever the voltage considered (% of CPZ effect was  $-343.2$ ,  $-52.4$ , and  $-95.75$  respectively for  $+100$  mV,  $-25$  mV, and  $-100$  mV). Altogether, these results indicate that, when using APC, the behavior of a given compound to modulate an ion channel can vary drastically depending on the plasma membrane potential.

**The Correlation between Chemical Structure-Driven and Data-Driven Clustering indicates that Calmodulin Antagonists Act as TRPV1 Inhibitors.** Since no consensus emerged from the comparison of the results obtained with each assay taken independently, we next performed a structure-driven and a data-driven clustering of these 54 drugs to unravel a potential structure-function relation that might, in the light of the bibliography, provide insights into the ability of each drug to either activate or inhibit TRPV1.

We found that all 54 identified drugs could be sorted in only 11 different clusters (Supplemental Table 3). Cluster A contains drugs harboring a trifluoromethyl benzene group.



**Fig. 5.** Screening of the Prestwick chemical library for identification of inhibitors of TRPV1 activation by CAPS. “n1” and “n2” stand to the first and second screens. (A, B, C) Identification of candidate compounds inhibiting TRPV1(CAPS) in the primary screen of the Prestwick chemical library using the intramolecular BRET probe (A), the intermolecular BRET assay (B), and the automated calcium assay (C). The concentration of the compound tested was 10  $\mu$ M in each test. Values were normalized to the maximal efficacy measured in presence of 500 nM CAPS (BRET assays) or 100 nM CAPS (ACA). Candidate compounds were characterized as hits if they induced a decrease of at least 30% of CAPS efficacy in the two technical replicates of the screen (area in gray). (D, E, F) Histogram of relative compounds efficacies to induce TRPV1 activation when assessed with the intramolecular BRET probe (D), the intermolecular BRET assay (E), and automated calcium assay (F). The x-axes were bounded in the [-30, 70] interval to align the histograms horizontally. The numbers of nondisplayed values are 88, 5, 9, and 197 for intramolecular BRET, intermolecular BRET, and calcium assays, respectively. (G, H, I) Scatter plot of the Prestwick chemical library screen performed in duplicate with the intramolecular BRET probe (G), the intermolecular BRET assay (H), and automated calcium assay (I). The red line represents the  $y = x$  equation.

Cluster C contains drugs harboring a bicycle in their structure. Cluster D is composed of detergent molecules. Cluster E is composed of molecules with at least three aromatic moieties joined by at least a carbon-carbon single bond, whereas cluster F contains drugs with only two aromatic rings joined by a linker. Cluster G contains tricyclic compounds such as phenothiazines. Clusters H, I, J, and S contain macrocyclic lactones, statins, dihydropyridines, and sterols-derived compounds respectively. Finally, 5 compounds did not fit in any of the aforementioned clusters and belong therefore to a miscellaneous cluster.

We next performed hierarchical clustering of the data acquired with these 54 hits, taking into account the 12 parameters integrating the results measured with both intra- and intermolecular BRET probes, ACA, and APC at +100 mV, -25 mV, and -100 mV in both activation and inhibition modes. The resulting dendrogram (Fig. 8) indicates the correspondence with the aforementioned

structure-driven clustering and the measured activity of the drug as assessed with each technique in both activation and inhibition mode.

The most important correlation arising from this multi-parametric analysis points to a significant enrichment of drugs belonging to clusters E, G, and J into group 7 of the dendrogram (Supplemental Fig. 4). This prompted us to perform an in-depth analysis of the literature focusing on these clusters. Strikingly, we found that 12 of the 24 hits belonging to cluster E, G, and J are well known calmodulin antagonists [trifluopromazine (#01), chlorpromazine (#03), thioridazine (#04), cyproheptadine (#05); perphenazine (#06), loperamide (#11), clotrimazole (#18), perhexiline maleate (#20), quina-crine (#22), fluphenazine (#23), felodipine (#28), prenylamine lactate (#32)] (Rochette-Egly et al., 1982; Johnson and Witte-nauer, 1983; Hatano et al. 2013; Montero et al., 1991; Caldir-ola et al., 1992; Hegemann et al., 1993; Xin and Zhang, 1993; Oláh et al., 2007; Lübker and Seifert, 2015).

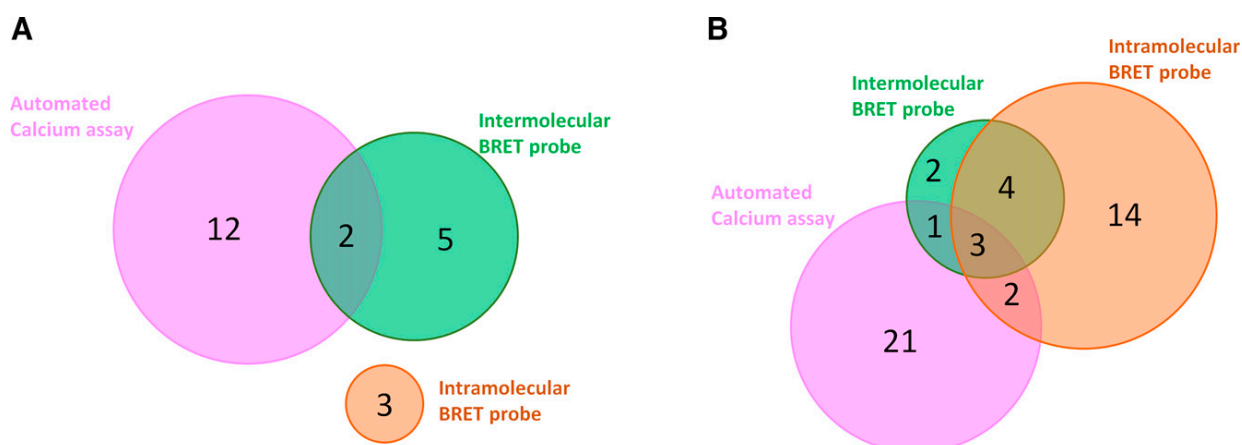
TABLE 3

% of confirmed hit between replicates assays

The number of confirmed hits found for each method is indicated in parentheses.

	Intramolecular BRET Probe	Intermolecular BRET Probe	Calcium Assay
Agonist mode	100% (3)	87.5% (7)	18.1% (16)
Antagonist mode	42.6% (23)	58.8% (10)	31.2% (28)

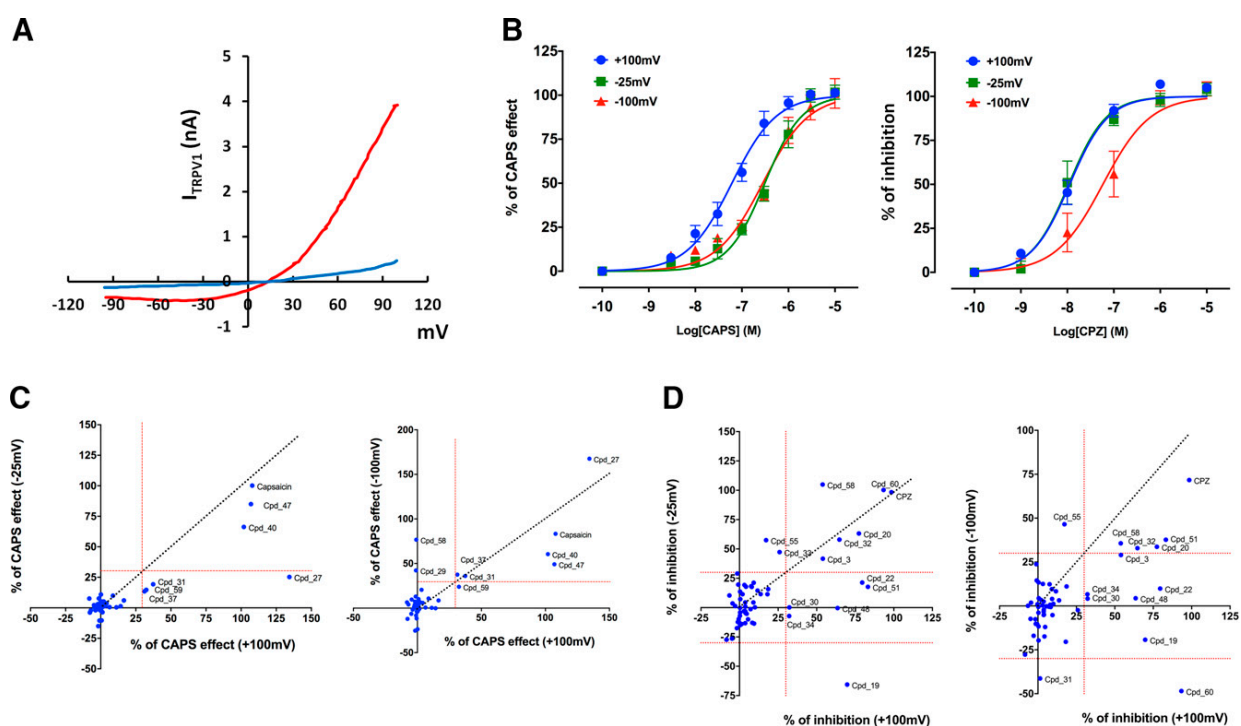




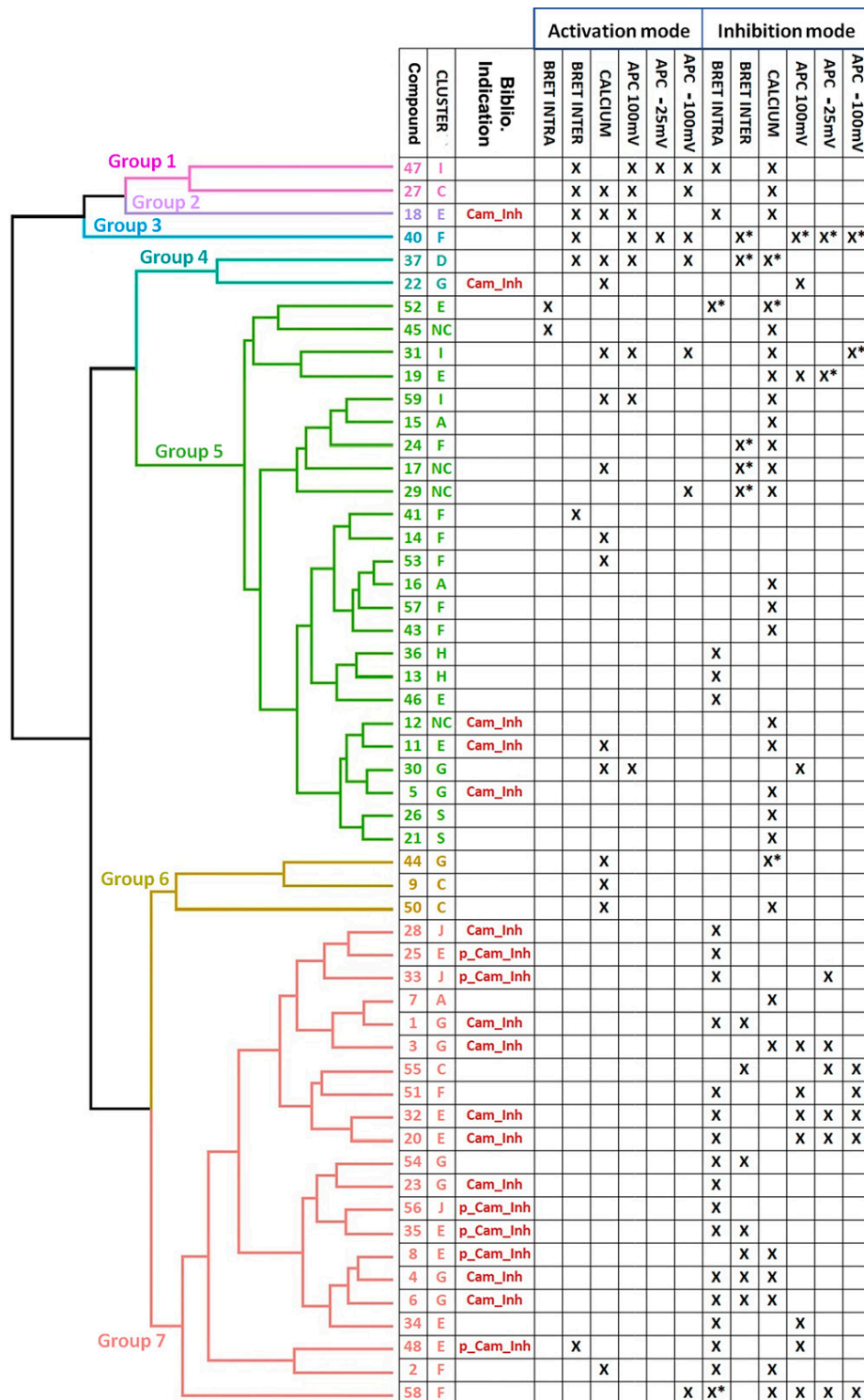
**Fig. 6.** Venn diagram of the hits detected with the TRPV1 intramolecular BRET probe, TRPV1 intermolecular BRET assay, and ACA in the activation mode (A) and in the inhibition mode (B).

Cluster J contains 3 compounds [felodipine (#28), lacidipine (#33), and cilnidipine (#56)] that are all derived from 3,5-diester-4-aryldihydropyridin and differ by structural variations on ester functions and aryl ring. All these three compounds were shown by the intramolecular BRET probe to antagonize the conformational changes occurring in TRPV1 after CAPS activation. No effects were detected using any other technique, except for APC at  $-25$  mV that also

measured an antagonist effect of lacidipine (Fig. 8 and Supplemental Table 3). To the best of our knowledge, among these three compounds, only felodipine has been reported to inhibit CaM (Johnson and Wittenauer, 1983). However, because of their similar chemical structure, it is highly possible that both lacidipine and cilnidipine, two  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (Micheli et al., 1990; Chandra and Ramesh, 2013), also act as CaM antagonists.



**Fig. 7.** Influence of the imposed membrane potential on the ability of hit compounds to activate TRPV1 or inhibit TRPV1 activation by CAPS. (A) I-V curves of vehicle (blue curve) or CAPS (1  $\mu\text{M}$ , red curve)-evoked currents in HEK cells stably expressing hTRPV1. (B) The concentration-response curve of CAPS (left panel,  $n = 44$ ) or CPZ (right panel,  $n = 21$ )-evoked current measured at +100 mV,  $-25$  mV, and  $-100$  mV in HEK cells stably expressing hTRPV1. CPZ concentration-response curves were measured 2 to 3 minutes after the addition of 50 nM CAPS in the assay buffer. (C) Scatter plot of the ability of hit compounds to activate TRPV1 when the membrane potential is clamped to  $-25$  mV versus +100 mV (left panel) or  $-100$  mV versus +100 mV (right panel). (D) Scatter plot of the ability of hit compounds to inhibit CAPS (50 nM)-activated TRPV1 when the membrane potential is clamped to  $-25$  mV versus +100 mV (left panel) or  $-100$  mV versus +100 mV (right panel).



**Fig. 8.** Data-driven hierarchical clustering of the effect of the hit compounds. The NbClust R package automatically sorted the 54 analyzed hits in 7 different groups. A complete linkage method (default method based on farthest neighbors' distance) was then applied to hierarchical clustering of the hits into each group using a maximum (Chebychev) distance metric (Abello et al., 2002). Correspondence with the structure-driven clustering and the measured activity of the drug as assessed with each technique in both activation and inhibition mode is also indicated. "X" indicates that the indicated drug efficacy was equal or above 30% of CAPS efficacy to trigger TRPV1 activation (activation mode) or inhibited TRPV1 activation by CAPS by at least 30% (see material and methods for details). "X\*" indicates that the indicated drug did not inhibit but potentiated TRPV1 activation by CAPS (see Supplemental Table 3 for quantitative analysis). Whether each compound is identified as CaM inhibitor (Cam\_Inh) or putative CaM inhibitor (p\_Cam\_Inh) is also indicated (see results for details).

Nine out of the ten compounds belonging to cluster G are anti-psychotropic drugs derived from phenothiazine [triflupromazine (#01), chlorpromazine (#03), thioridazine (#04), perphenazine (#06), quinacrine (#22), fluphenazine (#23), metixene (#30), methotrimeprazine (#44), and thiethylperazine maleate (#54)]. Phenothiazines are among the most potent calmodulin inhibitors, especially when the phenothiazine derivative is substituted by a halogen (Rochette-Egly et al., 1982; Caldirola et al., 1992). The tenth compound of the cluster G, cyproheptadine (#05), which is not a phenothiazine, has been described as a calmodulin inhibitor in one study (Xin and Zhang, 1993) and is structurally related to amitriptyline, a known calmodulin inhibitor (Reynolds and Claxton, 1982). To the best of our knowledge, among the ten compounds belonging to cluster G, the only compounds for which CaM antagonist activity has not been established are metixene (#30), methotrimeprazine (#44), and thiethylperazine maleate (#54) (Volpi et al., 1981; Prozialek and Weiss, 1982; Rochette-Egly et al., 1982; Oláh et al., 2007; Lübker and Seifert, 2015).

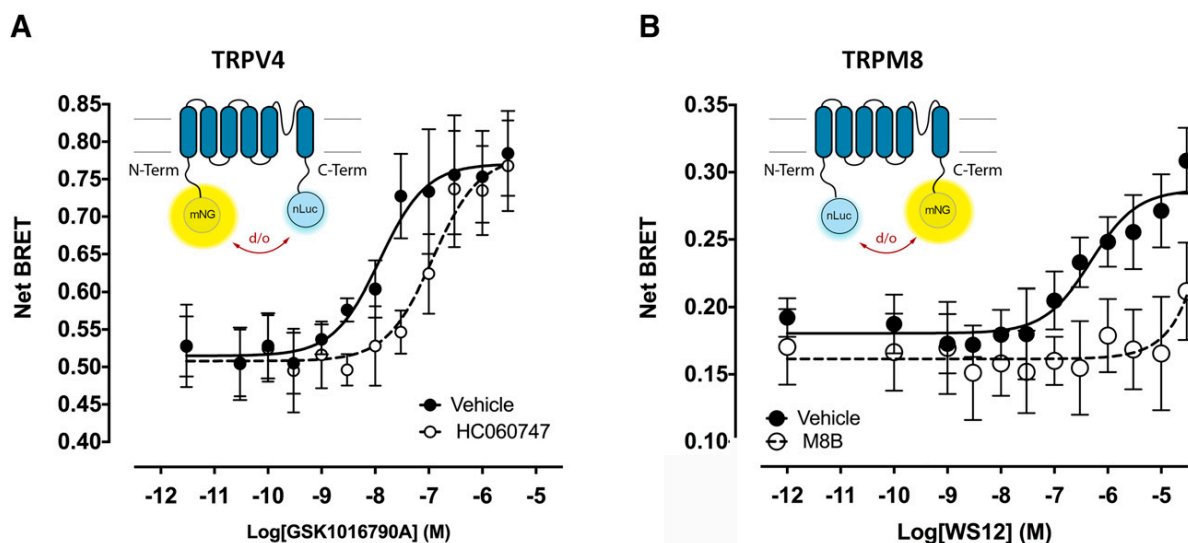
Nine of the twelve compounds belonging to cluster E are composed of poly-cycle rings-containing molecules. Interestingly, perhexilin maleate (#20) and prenylamine Lactate (#32) that had been detected as inhibitors by intramolecular BRET probe in the primary screen are both calmodulin antagonists (Caldirola et al., 1992), and have been confirmed as inhibitors of CAPS-induced TRPV1 activation by APC whatever the voltage used (Fig. 8 and Supplemental Table 3). Fluspirilen (#48), which triggered a conformational change in TRPV1 and was detected as an inhibitor by APC +100 mV, is known to bind CaM (Butts et al., 2013) and is structurally related to penfluridol, a first-generation neuroleptic shown to be a CaM antagonist (Lübker and Seifert, 2015). Butocunazole (#25), which has been detected as an inhibitor of TRPV1(CAPS) by the intramolecular BRET probe is an imidazole-derived compound. Direct interaction of imidazole-derived compounds with calmodulin has been suggested as a possible mechanism for their antifungal activity (Hegemann et al., 1993; Breitholtz et al., 2020), further suggesting a functional link between CaM inhibition and TRPV1 activation. Sertindole (#35), which contains a 4-piperinyl moiety connected in position 3 of an indole ring, and astemizole (#08), which contains a 4-amino-piperinyl moiety connected in position 2 of a benzimidazole ring, share structural features with the calmodulin antagonist CGS 9343B (Norman et al., 1987). Loperamide (#11), a synthetic piperidine derivative, known to inhibit TRPV1 activation by ACA, is a recognized CaM antagonist (Merritt et al., 1982) and can prevent capsaicin-induced thermal allodynia in primates, in the absence of thermal antinociceptive effects (Butelman et al., 2004). Clotrimazole (#18) has a blurred profile since it was detected as an activator of TRPV1 by the intermolecular BRET probe and APC and inhibitor by intramolecular BRET probe and ACA. Nonetheless, clotrimazole (#18) is a potent calmodulin inhibitor (Montero et al., 1991; Hegemann et al., 1993) and has been detected as a TRPV1 activator (Meseguer et al., 2008). Of note, clotrimazole-derived compounds are weak competitive inhibitors of TRPV1(CAPS) (Oláh et al., 2007).

To the best of our knowledge, the only hit compound which has been shown to inhibit purified CaM in vitro (Schaeffer et al., 1987) and which does not belong to clusters E, G, or J is

nicergoline (#12), a nitrogen polyheterocyclic compound filed in the miscellaneous cluster (Supplemental Table 3). In agreement with these considerations, most CaM inhibitors or putative CaM inhibitors belong to group 7 of the data-driven hierarchical clustering (Fig. 8). Interestingly, the cross-correlation between chemical structure-driven and data-driven clustering indicates that group 7 is mainly composed of drugs initially identified by intra- and/or intermolecular BRET probes (Fig. 8). Hierarchical clustering of the data acquired without ACA still yields to the formation of 7 groups with one of them being enriched with compounds belonging to clusters E, G, and J (Supplemental Fig. 4). In sharp contrast, hierarchical clustering of the data acquired without our BRET probes does not allow us to identify compounds belonging to clusters E, G, and J as part of a separate group (Supplemental Fig. 4). This observation points to a predominant detection of CaM inhibitors as inhibitors of TRPV1 activation by CAPS using our BRET probes.

**Analysis of Hit Compounds Not Displaying CaM Inhibitor Activities.** Bibliographic pieces of evidence also support an apparent CaM-independent modulation of TRP ion channels, sometimes including TRPV1 itself, by several compounds identified as hits in our screens.

Four compounds, for which no CaM antagonist activity has been described, were identified by more than one technique to inhibit TRPV1(CAPS): [antimycin A (#17), lovastatin (#31), simvastatin (#47), and sertraline (#51)] (Supplemental Table 3 and Fig. 8). In the cluster F, sertraline (#51), a 1,2,3,4-tetrahydronaphtalen derivative, which is substituted by a methylamino at position 1 and a 3,4-dichlorophenyl at position 4 (the S, S diastereoisomer), has been detected as an inhibitor by the BRET intramolecular probe and APC at +100 mV and -100 mV. Interestingly, tetraline urea derivatives have been shown to display antagonistic properties against TRPV1 activation by CAPS (Messeguer et al., 2006; Jetter et al., 2007). Although sertraline is not a tetraline urea derivative, it would be interesting to assess whether substitution of the methylamino group of sertraline by an urea group improve sertraline potency and/or efficacy to inhibit CAPS-mediated TRPV1 activation. Lovastatin (#31) and simvastatin (#47) belong to cluster I, which also contains mevastatin (#59). All these three compounds displayed a blurred profile when comparing the results obtained using activation and inhibition modes with the different readout assays used. Cluster I is composed of statin molecules, also known as HMG-CoA reductase inhibitors, which are a class of lipid-lowering drugs reducing illness and mortality in persons who are at high risk of cardiovascular disease. They are the most common cholesterol-lowering drugs, and cholesterol binding has been shown to be of importance for TRPV1 gating (Saha et al., 2017), which may point toward an indirect action of these compounds on TRPV1 activity. In our study, simvastatin (#47) was detected as an activator by both the intermolecular BRET probe and APC, and as an inhibitor by calcium and intramolecular BRET probes. Lovastatin (#31) and mevastatin (#59) were both detected as an activator by APC but behaved both as TRPV1 activator and inhibitor using ACA. In the literature, lovastatin (#31) and simvastatin (#47) have been shown to trigger TRPV1-dependent  $Ca^{2+}$  influx in endothelial cells (Su et al., 2014; Negri et al., 2020). However, to the best of our knowledge, an effect of mevastatin on the activity of TRP ion channels has never



**Fig. 9.** Assessment of the functionality of intramolecular BRET probes targeting TRPM8 and TRPV4. (A) Concentration-response curves of the TRPV4 agonist GSK1016790A measured in HEK293T cells expressing the mNeonG-TRPV4-nLuc BRET probe, either in presence of the TRPV4 antagonist HC060747 (10  $\mu$ M,  $n = 3$ ) or an equivalent quantity of solvent (vehicle,  $n = 3$ ). The  $pEC_{50}$  of GSK1016790A was  $7.91 \pm 0.11$ . (B) Concentration-response curves of the TRPM8 agonist WS12 measured in HEK293T cells expressing the nLuc-TRPM8-mNeonG BRET probe, either in presence of the TRPM8 antagonist M8B (10  $\mu$ M,  $n = 6$ ) or an equivalent quantity of solvent (vehicle,  $n = 4$ ). The  $pEC_{50}$  of WS12 was  $6.48 \pm 0.21$ . Insets: schematic representation of mNeonGreen-TRPV4-nLuc and nLuc-TRPM8-mNeonGreen intramolecular BRET probes.

been reported. Finally, two studies suggest that TRPV1 contributes to  $Ca^{2+}$  influx triggered in vagal nociceptive neurons by the well known antibiotic antimycin A (#17), which belongs to the miscellaneous cluster (Nesuashvili et al., 2013; Stanford et al., 2019).

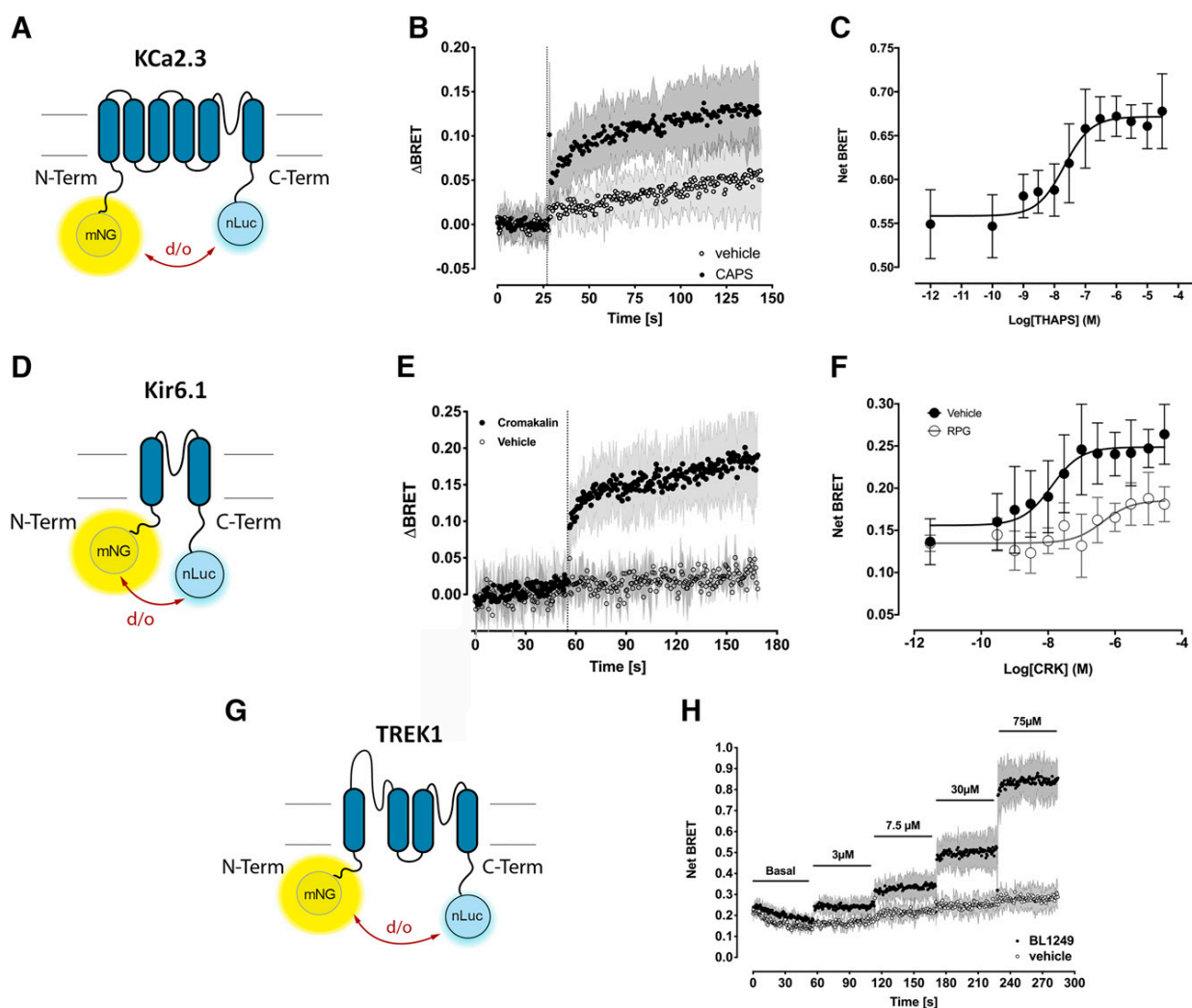
In cluster E, raloxifen (#46), detected as a TRPV1 inhibitor only by the intramolecular BRET probe (Supplemental Table 3 and Fig. 8), has been shown to inhibit TRPV1 activation by CAPS in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats (Yazgan and Nazoroğlu, 2017).

Finally, several compounds not described as CaM antagonists were shown to inhibit CAPS-induced TRPV1 activation by ACA, but not by either of the two BRET probes (Supplemental Table 3 and Fig. 8). Bibliographic evidence exists in support of the inhibitory efficacy against CAPS-induced TRPV1 activation of 6 of these compounds. In cluster A, flufenamic acid (#16), an anthranilic acid derivative carrying an *N*-(trifluoromethyl)phenyl substituent, has been shown to inhibit TRPV1 activation by CAPS (Hu et al., 2010; Guinamard et al., 2013). In cluster C, mefloquine (#7), which is a quinoline derivative and the antagonistic behavior of these compounds against TRPV1, has been recently discussed (Ambatkar and Khedekar, 2019). In cluster E, homochlorcyclizine (#19) shares structural determinants with dexbrompheniramine, which has been shown to inhibit TRPV1 in HEK293 cells (Sadofsky et al., 2008). In cluster F, rosiglitazone (#57), which belongs to the thiazolidinedione class, has been shown to inhibit TRP melastatin 3 ion channel while activating TRP canonical 5 ion channel (Majeed et al., 2011). Interestingly, during the screening of the Prestwick chemical library with the intermolecular BRET probe, the closely related compound Troglitazone enhanced TRPV1 activation by CAPS (Supplemental Table 2). Also, Troglitazone has been recently shown to directly activate TRPV1

(Krishnan et al., 2019). Still in cluster F, hexachlorophene (#58) is a polychloroaromatic compound shown to activate Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1 (KCNQ1) (Zheng et al., 2012), a molecular event known to inhibit TRPV1 (Ambrosino et al., 2019). Whether KCNQ1 ion channels are expressed in HEK293T cells is not known, but outward potassium currents do exist in HEK293T cells (Ponce et al., 2018), leaving room for of an indirect effect of hexachlorophene on TRPV1. In cluster S, epiandrosterone ( $5\alpha$ -androstan- $3\beta$ -ol-17-one) (#26) is a dehydroepiandrosterone metabolite only differing by one  $\pi$ -bond from  $5\alpha$ -androsten- $3\beta$ -ol-17-one, which one has been shown to antagonize CAPS-induced activation of TRPV1 (Chen et al., 2004). Auranofin (#45), an oral chrysotherapeutic agent for the treatment of rheumatoid arthritis, which belongs to the miscellaneous cluster, has been shown to activate TRPA1 but not TRPV1 in transiently transfected HEK cells using calcium assay (Mannhold et al., 1987). Although we also found that no TRPV1 activation was detected using a calcium assay with this compound, Auranofin, nonetheless, triggered a conformational change in TRPV1 that led to an increase of the BRET measured with the intramolecular BRET probe.

Some compounds for which we found no bibliographic evidence linking them to the TRP ion channel, calcium, or calmodulin were also detected as hits by more than one technique and might be considered for further studies. Efavirenz (#27, cluster C), a noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase, and beta-escin (#37, cluster S) has been detected as TRPV1 activator by both intermolecular BRET probes, calcium, and APC but, to the best of our knowledge, no evidence links these compounds to TRP ion channels. Importantly, beta-escin (#37) is known as a patch-clamp perforating agent but triggered only a very small current in nontransfected cells in our experimental conditions





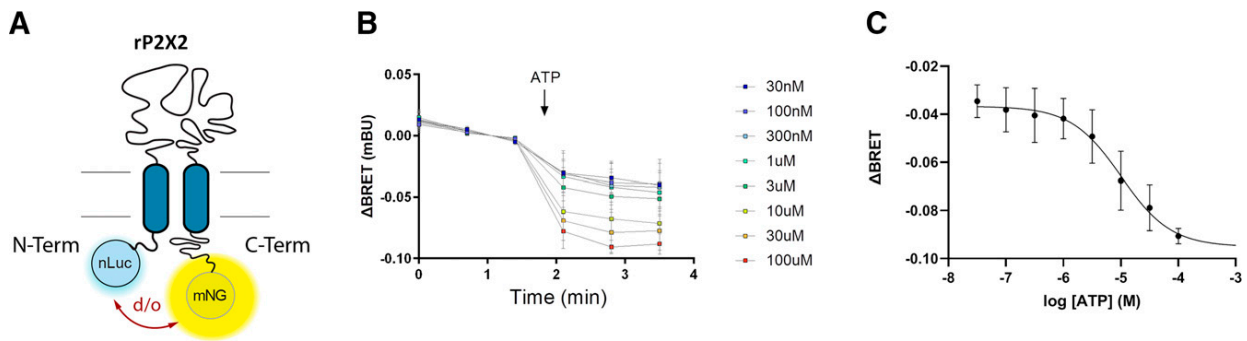
**Fig. 10.** Assessment of the functionality of intramolecular BRET probes targeting KCa2.3, Kir6.1, and TREK1. (A) Schematic representation of mNeonGreen-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe. (B) Kinetic measurement of the effect of CAPS (10  $\mu$ M) or vehicle on the BRET ratio measured from HEK293T cells coexpressing mNeon-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe, untagged TRPV1 ion channel, and CaM ( $n = 5$ ). The dashed line indicates the time of the injection. (C) Dose-response curves of Thapsigargin on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with the mNeonG-KCa2.3-nLuc BRET probe ( $n = 3$ ). The  $pEC_{50}$  of Thapsigargin was  $7.68 \pm 0.17$ . (D) Schematic representation of mNeonGreen-Kir6.1-nLuc intramolecular BRET probe. (E) Kinetic measurement of the effect of cromakalim or vehicle on the BRET ratio measured from HEK293T cells coexpressing the mNeon-Kir6.1-nLuc and SUR1 subunits ( $n = 3$ ). The dashed line indicates the time of the injection. (F) Dose-response curves of the Kir6.1 agonist cromakalim (CRK), injected in the presence or absence of repaglinide (10  $\mu$ M), on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with the mNeonG-Kir6.1-nLuc BRET probe ( $n = 4$  for vehicle and  $n = 3$  for RPG). The  $pEC_{50}$  of CRK was  $7.84 \pm 0.18$ . (G) Schematic representation of mNeonGreen-TREK1-nLuc intramolecular BRET probe. (H) Kinetic measurement of the effect of increasing dose of BL1249 or vehicle on the BRET ratio measured from HEK293T cells coexpressing the mNeon-TREK1-nLuc intramolecular BRET probe ( $n = 3$ ).

(Supplemental Table 3), thus validating it as a potential hit. Oxethazaine (#2, cluster F), a local anesthetic, has been shown to inhibit TRPV1 activation by CAPS using both ACA and intramolecular BRET probes. Finally, we found no bibliographic evidence linking several compounds detected as hits in our primary screen by only one technique. Among these compounds, dipyridamole (#9, cluster C), nitrofurantoin (#14, cluster F), and repaglinide (#53, cluster F) were detected as inhibitors or activators only by ACA. Of note, repaglinide has been shown to target neuronal calcium sensor proteins but not calmodulin (Okada et al., 2003), and its binding to TRP ion channel is not described. Pyrvinium pamoate (#52, cluster F) and ivermectin (#13, cluster H) were respectively detected as TRPV1 activator and inhibitor by the

intramolecular BRET probe. Sulfamer (#41, cluster F) was detected as a TRPV1 activator using the intermolecular BRET probe.

Altogether, the high structural diversity of these hits could be useful for structure-activated relationship studies (Tafesse et al., 2014).

**Exemplification of the Concept of Intramolecular BRET Probe to Other ion Channels.** The results obtained with intramolecular and intermolecular BRET probes prompted us to assess whether BRET-based biosensors could be derived for other ion channels. Since not all ion channels are in interaction with calmodulin, we focused on intramolecular BRET probes targeting ion channels having both N- and C-terminal extremities into the cytoplasm.



**Fig. 11.** (A) Schematic representation of the nLuc-P2X2-mNeonGreen intramolecular BRET probe, where nLuc was fused to the N-terminal extremity of rat P2X2 whereas mNeonGreen was fused to the C-terminal extremity. After activation of P2X2, the distance (*d*) and/or the orientation (*o*) between nLuc and mNeonGreen are expected to be modified during P2X2 gating and subsequent conformational changes of P2X2 subunits. (B) Kinetic measurement of the effect of increasing dose of ATP on the BRET ratio measured from HEK293T cells expressing the nLuc-P2X2-mNeonGreen intramolecular BRET probe ( $n = 3$ ). (C) Concentration-response curves of ATP on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with the nLuc-P2X2-mNeonGreen BRET biosensor ( $n = 3$ ). The pEC50 of ATP was  $4.99 \pm 0.305$ .

We first assessed whether the activity of two other TRPs ion channels, TRPV4 and TRPM8, could also be measured using intramolecular BRET probes. As shown in Fig. 9, the BRET signal measured on HEK293T cells transiently expressing mNeonG-hTRPV4-nLuc (Fig. 9A) and nLuc-hTRPM8-mNeonG (Fig. 9B) intramolecular BRET probes was concentration-dependently increased after addition in the cell culture medium of GSK1016790A and WS12, two specific agonists of TRPV4 and TRPM8 respectively (Bödding et al., 2007; Thorneloe et al., 2008). The measured half-maximal responses were consistent with those reported in the literature using patch-clamp or calcium-flux measurements on cells transiently expressing TRPV4 or TRPM8 (Bödding et al., 2007; Jin et al., 2011). The pharmacological selectivity of the ligand-promoted BRET changes was further demonstrated by the competitive nature of the effects, as both HC060747 and M8B, two well known competitive antagonists of TRPV4 and TRPM8 respectively, right-shifted the corresponding agonist potency to higher values in both intramolecular BRET tests. Altogether, these data strongly suggest that the agonist-promoted BRET changes in TRPV4 and TRPM8 intramolecular BRET probes correspond to activation of these two ion channels in live cells, as previously shown for TRPV1 (Ruigrok et al., 2017).

To go further in the exemplification of ion channel intramolecular BRET probes, we constructed mNeon-KCa2.3-nLuc (Fig. 10A), mNeon-Kir6.1-nLuc (Fig. 10D), and mNeon-TREK1-nLuc BRET (Fig. 10G) intramolecular BRET probes targeting respectively 1) KCa2.3, a small conductance calcium-activated potassium channels sharing the same 6-transmembrane domains (TM) basic architecture with Shaker-like voltage-gated potassium channels and TRP ion channels, 2) Kir6.1, an ATP-sensitive inwardly-rectifying potassium channels, the structure of which contains two-TM domain per monomer, and 3) TREK1, a two-pore-domain background potassium channels containing two pairs of TMs per monomer, each flanking a pore domain. The functionality of KCa2.3 was assessed in two different ways. Firstly, we cotransfected mNeonG-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe with TRPV1 and calmodulin in HEK293T cells, and triggered a  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cell through TRPV1 pore opening using a saturating concentration of CAPS (Fig. 10B).

CAPS injection induced a rapid increase of the basal BRET signal until reaching a plateau. No such effect was detected when the solvent was injected alone (vehicle). Secondly, in HEK293T cells transiently expressing mNeonG-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe alone, we triggered a rise in intracellular calcium by blocking calcium transport into the sarcoplasmic and endoplasmic reticula using an increasing dose of thapsigargin (Lu et al., 2014). This produced a concentration-dependent increase of the basal BRET ratio (Fig. 10C). The Kir6.1 intramolecular BRET probe was activated using cromakalim, a potent and selective ATP-sensitive potassium channel opener (Sanguinetti et al., 1988). As expected, cromakalim induced a rapid increase of the basal BRET signal until reaching a plateau while, again, no effect was detected when the solvent was injected alone (vehicle) (Fig. 10E). Importantly, the measured potency of cromakalim (Fig. 10F) fell in the range already described in the literature (Wilson et al., 1988). Also, repaglinide, a known inhibitor of Kir activation by cromakalim (Gasser et al., 2003), not only right-shifted cromakalim concentration-response curve but also decreased cromakalim efficacy and Kir6.1 basal BRET. These observations indicate that repaglinide is not a competitive antagonist of cromakalim as described by others (Gasser et al., 2003), but rather behaves as a noncompetitive unsurmountable antagonist of cromakalim by stabilizing Kir6.1 in a distinct conformational state. Finally, TREK1 was successfully activated using increasing quantities of the chemical activator BL1249 (Pope et al., 2018) (Fig. 10H). Altogether, these results confirm that intramolecular BRET biosensors can probe the conformational changes occurring during the gating of ion channels belonging to various ion channel families and not just the TRP ion channel family.

This led us to assess whether the intramolecular BRET sensor can also probe ligand-gated ion channels such as P2X purinergic receptors that have both extremities inside the cytoplasm. We therefore constructed the nLuc-P2X2-mNeonG intramolecular BRET probe (Fig. 11A) and transiently transfected it in HEK293T cells. The rat P2X2 ion channel was activated in the presence of increasing quantities of ATP that induced a time-dependent decrease of the basal BRET (Fig. 11B). Dose-response analysis revealed that ATP activated the nLuc-P2X2-mNeonG intramolecular BRET probe with

EC<sub>50</sub> fitting the known potency of ATP to activate native P2X<sub>2</sub> (Fig. 11C), as measured using conventional techniques (North and Surprenant, 2000). These results further suggest the suitability of our intramolecular BRET probe to efficiently measure the conformational changes occurring in various ion channel during their gating.

## Discussion

Taking advantage of our recently published intra- and intermolecular BRET probes targeting TRPV1 ion channels activation in real-time and on live cells (Ruigrok et al., 2017), we have 1) assessed whether such BRET biosensors can effectively be used for high-throughput purposes, 2) performed a comparative screen of the Prestwick chemical library with both our BRET probes and ACA, followed by the analysis of the hits using APC, and 3) exemplified the use of intramolecular BRET probe to measure other ion channel activation.

Both intra- and intermolecular BRET probes made it possible to account for the agonist or antagonist ability of different reference compounds to modulate TRPV1 activity in live HEK293T cells (Fig. 1). Although the measured potencies of each agonist obtained from each of our two BRET probes are in full agreement with the data reported in the literature and with the values measured with ACA, the pIC<sub>50</sub> values measured from most of the antagonists were found to be lower by 0.5–1.5 log units (Fig. 2 and Table 1). Several experimental differences between our study and the ones in the literature may explain this discrepancy, such as the technique used to measure TRPV1 activity, the pH and temperature of the assay, the amount of CAPS needed to trigger TRPV1 activation in the presence of the various antagonists, as well as the cell model used which has been shown to directly impact both efficacy and potency of TRPV1 ligands (Bianchi et al., 2006). Species-specific differences in TRPV1 functionality may also matter (Abbas, 2020). The potencies measured for each reference compound using both intra- and intermolecular BRET probes were however very close to the one measured using ACA, which is often used as the primary screen for calcium ion channels.

Most studies using APC to study TRPV1, if not all, measure the outward current at nonphysiologic membrane potentials (between +60 and +100 mV) and might thus highlight compounds that are not relevant for a therapeutic effect. We have shown that the choice of the membrane potential to measure the chemical activation of TRPV1 not only impacts the potency of several TRPV1 agonists and antagonists, but also drastically affects the ability of many of the tested drugs to activate or inhibit TRPV1. One likely explanation for this observation is that different ternary or quaternary conformational states of TRPV1 are stabilized when the membrane potential is clamped at various values. This observation is in agreement with the allosteric model for gating of thermoTRPs, such as TRPV1, in which voltage, temperature, and ligands are independently coupled, either positively or negatively, to channel gating (Matta and Ahern, 2007). This is of prime importance since ligand binding is expected to be intrinsically dependent on its receptor conformation state (de Boer, 2020), thereby rehabilitating nonelectrophysiological methods such as our novel BRET-based assay for ion channel HTS. Both intra- and intermolecular BRET assays achieved,

moreover, excellent *Z'*-factors, further indicating that both BRET assays are fit enough for high-throughput screening (Fig. 3).

We then aimed at comparing the effectiveness of both intra- and intermolecular BRET assays with that of HTS conventional methods (ACA and APC) to screen the Prestwick small-sized chemical library. Primary screening using ACA, intra- and intermolecular BRET assays indicated that 59 drugs activated TRPV1 or inhibited CAPS-induced TRPV1 activation. The results were heterogeneous, since 82.6% of the hits were found by only one method. No hits were found by all three methods to behave as TRPV1 activator, and only 3 drugs were found by the three assays to behave as an inhibitor of TRPV1(CAPS). Of note, out of the 33 drugs found by ACA to modulate TRPV1 activity, 8 were found to both activate and inhibit TRPV1, indicating that almost a quarter of the hits found with ACA yielded ambiguous results (Supplementary Fig. 6 and Table 3). In sharp contrast, no hits were detected as both activator and inhibitor of TRPV1 using either intra- or intermolecular BRET probe.

The secondary screen of the 59 identified drugs with APC highlighted important facts. Since only 14 drugs were confirmed as TRPV1 activator or inhibitor by APC, our results mean either that both BRET probes and ACA are prone to yield a lot of false positive hits or that APC measurement is prone to yield a lot of false-negative hits. A careful review of the literature highlighted interesting clues pointing to a more balanced conclusion: First, as mentioned in the result section, 13 compounds over the 59 detected hits (~22% of the hits identified) are well known calmodulin antagonists, and 12 of them belongs to only three clusters (E, G, and J). Seven other compounds belonging to clusters E, G, or J, share structural similarities with known CaM antagonists (see result section for details). Over these 20 drugs, 15 were identified as TRPV1(CAPS) inhibitors by either one or both BRET probes while only 7 and 6 were respectively detected by ACA and APC (Fig. 8). Also, to the best of our knowledge, 19 other compounds known to be CaM antagonists were part of the Prestwick chemical library but were not included in the lists of 59 drugs identified during the primary screening (Supplemental Table 4). Reanalysis of the results obtained with these compounds revealed that the average inhibition efficacy of 8 of them was either very close to the drug efficacy cut-off fixed at 30%, or above but with no reproducibility between n1 and n2. These compounds, mostly detected with the intramolecular and intermolecular BRET assay, might be therefore false negatives that could have been included as positive hits using a data-driven analysis of the primary screen results instead of a subjective cut-off of the efficacy magnitude. Such workflow will be included in our further studies. Overall, these results indicate that most of the CaM antagonists included in the Prestwick chemical library were detected as inhibitor of TRPV1 activation by CAPS. Interestingly, although calmodulin is classically viewed as a negative modulator of TRPV1, regulating its desensitization (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004; Lishko et al., 2007; Lau et al., 2012), CaM inhibition using various chemical compounds, including chlorpromazine (#3) and fluphenazine (#23), has already been shown to inhibit CAPS-induced TRPV1 activation with a potency in the  $\mu$ M range (Oláh et al., 2007). Whether CaM antagonists can inhibit TRPV1 through direct interaction with TRPV1 itself, by preventing

the physical interaction between TRPV1 and CaM, or by another means, remains to be determined. In the light of our BRET-based repurposing drug screening results, and in the quest for new TRPV1 inhibitors, considering the CaM-TRPV1 physical and/or functional interaction as druggable is a tempting hypothesis that deserves further attention.

We also found bibliographic evidence indicating that 12 drugs out of the 59 identified during the primary screen activated or inhibited TRPV1 or other TRP ion channels without any known relation with calmodulin. Five of these drugs were detected using either one or both BRET probes, 5 were detected using APC and 9 were detected using ACA, and no drug was detected by all three methods together. In sharp contrast with the drugs targeting CaM, which all but one belonged to only three clusters, these 12 drugs belong to various clusters without any clear relationship with their structure (see results for details and Supplemental Table 3). Except for rosiglitazone (#57) and mefloquine (#07), no clear relationship between the chemical structure of these drugs and the prototypical structure of TRPV1 antagonists was found (Szallasi et al., 2007; Ambatkar and Khedekar, 2019), suggesting an indirect role of these drugs. Interestingly, although most CaM antagonists belong to the data-driven group 7 that is mainly detected using the BRET assays, 8 of the 12 aforementioned drugs belong to group 5, which is mainly identified based on ACA data (Fig. 8). No single technique detected all hits in a single HTS run. Our study, therefore, highlights the need for benefiting from the output of different HTS platforms coupled to a multiparametric analysis to optimize future ion-channel drug screening processes. In conclusion, based on a thorough bibliographic analysis of our results, both BRET probes 1) have proven to be as reliable as ACA or APC in identifying potential hits, 2) provide a very specific readout of ion channel activity, and 3) brought back to light the CaM-TRPV1 protein-protein interaction as a druggable target for TRPV1 inhibition. Since BRET biosensors are easy to use with a low cost of implementation and have shown their adaptability to various TRPs and non-TRPs ion channels (Figs. 9–11), they may advantageously be included in ion channel drug screening campaigns.

#### Acknowledgments

The authors thank Bernard Veyret for his wise advice and proof-reading of the manuscript.

#### Authorship Contributions

*Participated in research design:* Franchet, Percherancier.

*Conducted experiments:* Chappe, Michel, Joushomme, Barbeau, Pierredon, Baron, Garenne, Poullétier de Gannes, Hurtier.

*Performed data analysis:* Chappe, Michel, Barbeau, Pierredon, Garenne, Mayer, Lagroye, Quignard, Ducret, Compan, Franchet, Percherancier.

*Wrote or contributed to the writing of the manuscript:* Chappe, Michel, Lagroye, Quignard, Ducret, Compan, Franchet, Percherancier.

#### References

- Abbas MA (2020) Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chem Biol Interact* **330**:109178.
- Abello JM, Pardalos PM, and Resende MGC, eds (2002) *Handbook of massive data sets*, Kluwer Academic, Dordrecht, London.
- Ambatkar MP and Khedekar PB (2019) Quinoline as TRPV1 antagonists: A new approach against inflammation. *J Drug Deliv Ther* **9**:782–788.
- Ambrosino P, Soldovieri MV, Di Zazzo E, Paventi G, Iannotti FA, Mosca I, Miceli F, Franco C, Canzoniero LMT, and Tagliatala M (2019) Activation of Kv7 potassium channels inhibits intracellular Ca<sup>2+</sup> increases triggered by TRPV1-mediated pain-inducing stimuli in F11 immortalized sensory neurons. *Int J Mol Sci* **20**:4322.
- Ayoub MA (2016) Resonance energy transfer-based approaches to study GPCRs. *Methods Cell Biol* **132**:255–292.
- Bacart J, Corbel C, Jockers R, Bach S, and Couturier C (2008) The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* **3**:311–324.
- Bagal SK, Marron BE, Owen RM, Storer RI, and Swain NA (2015) Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels (Austin)* **9**:360–366.
- Bianchi BR, Lee C-H, Jarvis MF, El Kouhen R, Moreland RB, Faltynek CR, and Puttfarcken PS (2006) Modulation of human TRPV1 receptor activity by extracellular protons and host cell expression system. *Eur J Pharmacol* **537**:20–30.
- Bödding M, Wissenbach U, and Flockerzi V (2007) Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell Calcium* **42**:618–28.
- Breitholtz M, Ivanov P, Ek K, and Gorokhova E (2020) Calmodulin inhibition as a mode of action of antifungal imidazole pharmaceuticals in non-target organisms. *Toxicol Res (Camb)* **9**:425–430.
- Butelman ER, Harris TJ, and Kreek MJ (2004) Antiallodynic effects of loperamide and fentanyl against topical capsaicin-induced allodynia in unanesthetized primates. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:155–163.
- Butts A, DiDone L, Koselny K, Baxter BK, Chabrier-Rosello Y, Wellington M, and Krysan DJ (2013) A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. *Eukaryot Cell* **12**:278–287.
- Caldirola P, Mannhold R, and Timmerman H (1992) Overview: calmodulin and calmodulin-antagonists. *Current Opinion on Therapeutic Patents* **2**:1889–1917.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816–824.
- Chandra KS and Ramesh G (2013) The fourth-generation calcium channel blocker: cilindipine. *Indian Heart J* **65**:691–695.
- Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, and Niknafs A (2014) NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *J Stat Softw* **61**:1–36.
- Chen S-C, Chang T-J, and Wu F-S (2004) Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:529–536.
- Clare JJ (2010) Targeting ion channels for drug discovery. *Discov Med* **9**:253–260.
- de Boer M (2020) The relation between intrinsic protein conformational changes and ligand binding. *Biophysics (Oxf)*.
- De-la-Rosa V, Rangel-Yescas GE, Ladrón-de-Guevara E, Rosenbaum T, and Islas LD (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.
- Gasser R, Köppel H, Moosbrugger B, Esche G, Salzer M, Gasser S, and Holzmann S (2003) Indiscriminative effects of repaglinide and other specific modulators of transmembrane KATP-channel gating properties upon ischaemic/hypoxic bovine coronary artery smooth muscle relaxation. *Journal of Clinical and Basic Cardiology* **6**:81–85.
- Gavva NR, Bannon AW, Hovland Jr DN, Lehto SG, Klionsky L, Surapaneni S, Immke DC, Henley C, Arik L, Bak A, et al. (2007a) Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol Exp Ther* **323**:128–137.
- Gavva NR, Bannon AW, Surapaneni S, Hovland Jr DN, Lehto SG, Gore A, Juan T, Deng H, Han B, Klionsky L, et al. (2007b) The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* **27**:3366–3374.
- Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, et al. (2005) AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:474–484.
- Global data (2020) GlobalData's Pharma Intelligence Center Drug Sales and Forecast Database.
- Guinamard R, Simard C, and Del Negro C (2013) Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol Ther* **138**:272–284.
- Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, Luis Hannan S, Lappin SC, Egerton J, Smith GD, et al. (2004) Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology* **46**:133–149.
- Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, and Bouvier M (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci Chapter* **5**:5–23.
- Hasan R, Leeson-Payne ATS, Jaggar JH, and Zhang X (2017) Calmodulin is responsible for Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of TRPA1 channels. *Sci Rep* **7**:45098.
- Hatano N, Suzuki H, Muraki Y, and Muraki K (2013) Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the antirheumatic drug auranofin. *Am J Physiol Cell Physiol* **304**:C354–C361.
- Hegemann L, Toso SM, Lahijani KI, Webster GF, and Uitto J (1993) Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity. *J Invest Dermatol* **100**:343–346.
- Hu H, Tian J, Zhu Y, Wang C, Xiao R, Herz JM, Wood JD, and Zhu MX (2010) Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Arch* **459**:579–592.
- Jetter MC, Youngman MA, McNally JJ, McDonnell ME, Zhang S-P, Dubin AE, Nasser N, Codd EE, Flores CM, and Dax SL (2007) Heteroaryl beta-tetralin ureas as novel antagonists of human TRPV1. *Bioorg Med Chem Lett* **17**:6160–6163.
- Jin M, Wu Z, Chen L, Jaimes J, Collins D, Walters ET, and O'Neil RG (2011) Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One* **6**:e16713.

- Johnson JD and Wittenauer LA (1983) A fluorescent calmodulin that reports the binding of hydrophobic inhibitory ligands. *Biochem J* **211**:473–479.
- Kaczorowski GJ, McManus OB, Priest BT, and Garcia ML (2008) Ion channels as drug targets: the next GPCRs. *J Gen Physiol* **131**:399–405.
- Kassambara A, and Mundt F (2020) *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*.
- Kirkton RD and Bursac N (2011) Engineering biosynthetic excitable tissues from unexcitable cells for electrophysiological and cell therapy studies. *Nat Commun* **2**:300.
- Kocan M and Pfeleger KDG (2011) Study of GPCR-protein interactions by BRET. *Methods Mol Biol* **746**:357–371 United States.
- Krishnan V, Baskaran P, and Thyagarajan B (2019) Troglitazone activates TRPV1 and causes deacetylation of PPAR $\gamma$  in 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**:445–453.
- Lau S-YY, Procko E, and Gaudet R (2012) Distinct properties of Ca $^{2+}$ -calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *J Gen Physiol* **140**:541–555.
- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, and Gaudet R (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**:905–918.
- Lu Y-C, Yang J, Ding G-L, Shi S, Zhang D, Jin L, Pan J-X, Lin X-H, Zhu Y-M, Sheng J-Z, et al. (2014) Small-conductance, calcium-activated potassium channel 3 (SK3) is a modulator of endometrial remodeling during endometrial growth. *J Clin Endocrinol Metab* **99**:3800–3810.
- Lübker C and Seifert R (2015) Effects of 39 compounds on calmodulin-regulated adenylyl cyclases AC1 and Bacillus anthracis edema factor. *PLoS One* **10**:e0124017.
- Majeed Y, Bahnsi Y, Seymour VAL, Wilson LA, Milligan CJ, Agarwal AK, Sukumar P, Naylor J, and Beech DJ (2011) Rapid and contrasting effects of rosiglitazone on transient receptor potential TRPM3 and TRPC5 channels. *Mol Pharmacol* **79**:1023–1030.
- Mannhold R, Kramer A, Schäfer W, and Schramm P (1987) CaM-inhibitory actions of Ca antagonists. *Arch Pharm (Weinheim)* **320**:683–692.
- Matta JA and Ahern GP (2007) Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* **585**:469–482.
- McGivern JG and Ding M (2020) Ion channels and relevant drug screening approaches. *SLAS Discov* **25**:413–419.
- Merritt JE, Brown BL, and Tomlinson S (1982) Loperamide and calmodulin. *Lancet* **1**:283.
- Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodríguez T, Viana F, Nilius B, and Voets T (2008) Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci* **28**:576–586.
- Messeguer A, Planells-Cases R, and Ferrer-Montiel A (2006) *Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor*. CN 4:1–15.
- Micheli D, Collodel A, Semeraro C, Gaviraghi G, and Carpi C (1990) Lacidipine: a calcium antagonist with potent and long-lasting antihypertensive effects in animal studies. *J Cardiovasc Pharmacol* **15**:666–675.
- Miyawaki A, and Niino Y (2015) Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based probes. *Molecular cell* **58**:632–43.
- Montero M, Alvarez J, and Garcia-Sancho J (1991) Agonist-induced Ca $^{2+}$  influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. *Biochem J* **277**:73–79.
- Negri S, Faris P, Rosti V, Antognazza MR, Lodola F, and Moccia F (2020) Endothelial TRPV1 as an emerging molecular target to promote therapeutic angiogenesis. *Cells* **9**:1341.
- Nesuashvili L, Hadley SH, Bahia PK, and Taylor-Clark TE (2013) Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. *Mol Pharmacol* **83**:1007–1019.
- Norman JA, Ansell J, Stone GA, Wennogle LP, and Wasley JW (1987) CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity. *Mol Pharmacol* **31**:535–540.
- North RA and Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:563–580.
- 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 USA* **100**:8002–8006.
- Obergrussberger A, Goetze TA, Brinkwirth N, Becker N, Friis S, Rapedius M, Haarmann C, Rinke-Weiß I, Stölzle-Feix S, Brüggemann A, et al. (2018) An update on the advancing high-throughput screening techniques for patch clamp-based ion channel screens: implications for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **13**:269–277.
- Okada M, Takezawa D, Tachibana S, Kawamura S, Tokumitsu H, and Kobayashi R (2003) Neuronal calcium sensor proteins are direct targets of the insulinotropic agent repaglinide. *Biochem J* **375**:87–97.
- Oláh Z, Jósavay K, Pece L, Letoha T, Babai N, Budai D, Ötvös F, Szalma S, and Vizler C (2007) Anti-calmodulins and tricyclic adjuvants in pain therapy block the TRPV1 channel. *PLoS One* **2**:e545.
- Papakosta M, Dalle C, Haythornthwaite A, Cao L, Stevens EB, Burgess G, Russell R, Cox PJ, Phillips SC, and Grimm C (2011) The chimeric approach reveals that differences in the TRPV1 pore domain determine species-specific sensitivity to block of heat activation. *J Biol Chem* **286**:39663–39672.
- Percherancier Y, Germain-Desprez D, Galisson F, Mascle XH, Dianoux L, Estéphan P, Chelbi-Alix MK, and Aubry M (2009) Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem* **284**:16595–16608.
- Pfeleger KDG, Seeber RM, and Eidne KA (2006) Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc* **1**:337–345.
- Ponce A, Castillo A, Hinojosa L, Martínez-Rendon J, and Cerejido M (2018) The expression of endogenous voltage-gated potassium channels in HEK293 cells is affected by culture conditions. *Physiol Rep* **6**:e13663.
- Pope L, Arrigoni C, Lou H, Bryant C, Gallardo-Godoy A, Renslo AR, and Minor Jr DL (2018) Protein and chemical determinants of BL-1249 action and selectivity for K $_{2P}$  channels. *ACS Chem Neurosci* **9**:3153–3165.
- Premkumar LS, Agarwal S, and Steffen D (2002) Single-channel properties of native and cloned rat vanilloid receptors. *J Physiol* **545**:107–117.
- Priest BT, Swensen AM, and McManus OB (2007) Automated electrophysiology in drug discovery. *Curr Pharm Des* **13**:2325–2337.
- Prozialek WC and Weiss B (1982) Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* **222**:509–516.
- R Core Team (2020) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ralevic V, Kendall DA, Jerman JC, Middlemiss DN, and Smart D (2001) Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* **424**:211–219.
- Rani N, Sharma A, Gupta GK, and Singh R (2013) Imidazoles as potential antifungal agents: a review. *Mini Rev Med Chem* **13**:1626–1655.
- Reynolds CH and Claxton PTJ (1982) Inhibition of calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase: multiple binding-sites for tricyclic drugs on calmodulin. *Biochem Pharmacol* **31**:419–421.
- Robertson DN, Sleno R, Nagi K, Pétrin D, Hébert TE, and Pineyro G (2016) Design and construction of conformational biosensors to monitor ion channel activation: A prototype FAsH/BRET-approach to Kir3 channels. *Methods* **92**:19–35.
- Rochette-Egly C, Boschetti E, Basset P, and Egly JM (1982) Interactions between calmodulin and immobilized phenothiazines. *J Chromatogr A* **241**:333–344.
- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, and Gordon SE (2004) Ca $^{2+}$ /calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* **123**:53–62.
- Ruigrok HJ, Shahid G, Goudeau B, Poulliet de Gannes F, Poque-Haro E, Hurtier A, Lagroye I, Vacher P, Arbault S, Sojic N, et al. (2017) Full-spectral multiplexing of bioluminescence resonance energy transfer in three TRPV channels. *Biophys J* **112**:87–98.
- Sadofsky LR, Campi B, Trevisani M, Compton SJ, and Morice AH (2008) Transient receptor potential vanilloid-1-mediated calcium responses are inhibited by the alkylamine antihistamines dexbrompheniramine and chlorpheniramine. *Exp Lung Res* **34**:681–693.
- Saha S, Ghosh A, Tiwari N, Kumar A, Kumar A, and Goswami C (2017) Preferential selection of arginine at the lipid-water-interface of TRPV1 during vertebrate evolution correlates with its snorkeling behaviour and cholesterol interaction. *Sci Rep* **7**:16808.
- Sanguinetti MC, Scott AL, Zingaro GJ, and Siegl PK (1988) BRL 34915 (cromakalim) activates ATP-sensitive K $^{+}$  current in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:8360–8364.
- Schaeffer P, Lugnier C, Follenius-Wund A, Gerard D, and Stoclet J-C (1987) Comparative effects of calmodulin inhibitors on calmodulin's hydrophobic sites and on the activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin. *Biochem Pharmacol* **36**:1989–1996.
- Schann S, Bouvier M, and Neuville P (2013) Technology combination to address GPCR allosteric modulator drug-discovery pitfalls. *Drug Discov Today Technol* **10**:e261–e267.
- Stanford DM, Hadley SH, Barannikov I, Ajmo JM, Bahia PK, and Taylor-Clark TE (2019) Antimycin A-induced mitochondrial dysfunction activates vagal sensory neurons via ROS-dependent activation of TRPA1 and ROS-independent activation of TRPV1. *Brain Res* **1715**:94–105.
- Su K-H, Lin S-J, Wei J, Lee K-I, Zhao J-F, Shyue S-K, and Lee T-S (2014) The essential role of transient receptor potential vanilloid 1 in simvastatin-induced activation of endothelial nitric oxide synthase and angiogenesis. *Acta Physiol (Oxf)* **212**:191–204.
- Swanson DM, Dubin AE, Shah C, Nasser N, Chang L, Dax SL, Jetter M, Breitenbucher JG, Liu C, Mazur C, et al. (2005) Identification and biological evaluation of 4-(3-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylic acid (5-trifluoromethylpyridin-2-yl)amide, a high affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist. *J Med Chem* **48**:1857–1872.
- Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, and Eid SR (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* **6**:357–372.
- Tafesse L, Kanemasa T, Kurose N, Yu J, Asaki T, Wu G, Iwamoto Y, Yamaguchi Y, Ni C, Engel J, et al. (2014) Structure-activity relationship studies and discovery of a potent transient receptor potential vanilloid (TRPV1) antagonist 4-[3-chloro-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-2-pyridyl]-N-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyl]-3,6-dihydro-2H-pyridine-1-carboxamide (V116517) as a clinical candidate for pain management. *J Med Chem* **57**:6781–6794.
- Terstappen GC, Roncarati R, Dunlop J, and Peri R (2010) Screening technologies for ion channel drug discovery. *Future Med Chem* **2**:715–730.
- Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, McCafferty GP, Chendrimada TP, Lashinger ES, Gordon E, and Evans L (2008) N-((1S)-1-[4-(2S)-2-((2,4-dichlorophenyl) sulfonyl) amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl) carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther* **326**:432–442.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, and Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**:531–543.
- Volpi M, Sha'afi RI, Epstein PM, Andrenyak DM, and Feinstein MB (1981) Local anesthetics, mepacrine, and propranolol are antagonists of calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:795–799.
- Wickenden A, Priest B, and Erdemli G (2012) Ion channel drug discovery: challenges and future directions. *Future Med Chem* **4**:661–679.
- Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York.
- Wickham H, François R, Henry L, and Müller K (2020) *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*.

- Wilson C, Coldwell MC, Howlett DR, Cooper SM, and Hamilton TC (1988) Comparative effects of K<sup>+</sup> channel blockade on the vasorelaxant activity of cromakalim, pinacidil and nicorandil. *Eur J Pharmacol* **152**:331–339.
- Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC, and Bevan S (1990) Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res* **520**:131–140.
- Xin HB and Zhang BH (1993) Inhibitory effects of cyproheptadine on calmodulin activated Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of rabbit erythrocyte membranes. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **14** (Suppl):S5–S7.
- Yazgan Y and Naziroglu M (2017) Ovariectomy-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and calcium ion influx through TRPA1, TRPM2, and TRPV1 are prevented by 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, and raloxifene in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Mol Neurobiol* **54**:7620–7638.
- Yu HB, Li M, Wang WP, and Wang XL (2016) High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol Sin* **37**:34–43.
- Zhang JH, Chung TD, and Oldenburg KR (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high-throughput screening assays. *J Biomol Screen* **4**:67–73.

---

**Address correspondence to:** Yann Percherancier, Laboratoire IMS/UMR5218, Université de Bordeaux I – Bat. A31, 351 av de la liberation, F-33400 Talence, France. E-mail: [yann.percherancier@ims-bordeaux.fr](mailto:yann.percherancier@ims-bordeaux.fr)

---



# Article 3

**Genetically-encoded BRET probes shed light  
on ligand bias-induced variable ion selectivity  
in TRPV1 and P2X5/7**







# Genetically-encoded BRET probes shed light on ligand bias-induced variable ion selectivity in TRPV1 and P2X5/7

Yann Loïck Chappe<sup>a</sup>, Sandra Pierredon<sup>b</sup>, Alexandre Joushomme<sup>a</sup>, Pablo Molle<sup>a</sup>, André Garenne<sup>a</sup>, Anne Canovi<sup>a</sup>, Solène Barbeau<sup>c</sup>, Florence Poulletier De Gannes<sup>a</sup>, Annabelle Hurtier<sup>a</sup>, Isabelle Lagroye<sup>a</sup>, Thomas Ducret<sup>c</sup>, Jean-François Quignard<sup>c</sup>, Vincent Compan<sup>b</sup>, and Yann Percherancier<sup>a,1</sup>

Edited by David Julius, University of California, San Francisco, CA; received March 25, 2022; accepted September 19, 2022

Whether ion channels experience ligand-dependent dynamic ion selectivity remains of critical importance since this could support ion channel functional bias. Tracking selective ion permeability through ion channels, however, remains challenging even with patch-clamp electrophysiology. In this study, we have developed highly sensitive bioluminescence resonance energy transfer (BRET) probes providing dynamic measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  concentrations and ionic strength in the nanoenvironment of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel (TRPV1) and P2X channel pores in real time and in live cells during drug challenges. Our results indicate that AMG517, BCTC, and AMG21629, three well-known TRPV1 inhibitors, more potently inhibit the capsaicin (CAPS)-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx than the CAPS-induced  $\text{K}^{+}$  efflux through TRPV1. Even more strikingly, we found that AMG517, when injected alone, is a partial agonist of the  $\text{K}^{+}$  efflux through TRPV1 and triggers TRPV1-dependent cell membrane hyperpolarization. In a further effort to exemplify ligand bias in other families of cationic channels, using the same BRET-based strategy, we also detected concentration- and time-dependent ligand biases in P2X7 and P2X5 cationic selectivity when activated by benzoyl-adenosine triphosphate (Bz-ATP). These custom-engineered BRET-based probes now open up avenues for adding value to ion-channel drug discovery platforms by taking ligand bias into account.

ion channels | molecular pharmacology | BRET | ion selectivity | ligand bias

Ion channels respond to various physical and chemical stimuli by regulating the flow of ions across the cell membranes. The resultant ion fluxes cause changes in cell membrane potential or alter intracellular ion concentrations, ultimately controlling cell responses. Ion flux regulation is, therefore, the main event by which ion channels trigger cell signaling. Anion/cation selectivity is a critical property of ion channels, underpinning their physiological function. Historically, ion selectivity was considered an immutable characteristic of an open ion channel, intrinsically determined by the structural organization of its constituent subunits. However, this uncompromising vision was challenged when dynamic changes in ion selectivity were measured during C-type inactivation of Kv channels, with an increase in channel permeability to sodium (1, 2). More recent studies demonstrated that, under acidic conditions or in low extracellular  $\text{K}^{+}$  concentrations, the two-pore domain  $\text{K}^{+}$  channel (K2P) TWIK1 exhibited dynamic changes in selectivity, becoming permeable to  $\text{Na}^{+}$  and shifting from an inhibitory to an excitatory role (3–5). This phenomenon is responsible for the paradoxical depolarization of human cardiomyocytes in pathological hypokalemia, possibly contributing to cardiac arrhythmias. Dynamic ion selectivity may occur in other K2P channels, establishing a new regulatory mechanism for cell excitability (6).

Additionally, various studies have reported that the ion selectivity of P2X receptor channels and TRP ion channels, such as Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel (TRPV1), may change dynamically in response to sustained agonist activation (7, 8) (reviewed in ref. 9). In the case of ligand-activated P2X and TRPV1 channels, it was even postulated that, if the pore initially opened rapidly to a conducting state that was relatively selective for small cations such as  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$ , the pore then gradually dilated over time to become more permeable to larger cations, such as fluorescent dyes or nonorganic ions (9–11). This phenomenon, known as “pore dilation,” may elicit essential physiological functions and form the basis for therapeutic applications. Nonetheless, the study by Li et al. (12) seriously challenged the pore dilation theory based on the time-dependent ion selectivity change in P2X channels but did not question the permeability of gated P2X channels to large cations. These authors elegantly demonstrated that the time-dependent shift in the reversal potential ( $E_{\text{rev}}$ ) measured in bi-ionic solutions was an artifact, warning about the results obtained when

## Significance

Thanks to innovative BRET-based probes, we shed light on ligand-biased ion selectivity, a difficult-to-study ion channel-related pharmacological concept, by performing the dynamic measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  concentrations and ionic strength in the nanoenvironment of the TRPV1 channel during drug challenge in real-time live-cell experiments. Our results indicate that some TRPV1 antagonists display differential potencies in inhibiting CAPS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  fluxes. We also detect concentration- and time-dependent ligand biases in P2X7 and P2X5 cationic selectivity. These new BRET-based probes now open up avenues for adding value to ion-channel drug discovery platforms by taking ligand bias into account, thus addressing molecular events related to ion channel activation that are intractable using either conventional fluorescent-based probes or patch-clamp techniques.

Competing interest statement: Y.L.C., V.C., and Y.P. are co-inventors on a patent application related to the technology described in this article. All other authors declare no competing interests.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2022 the Author(s). Published by PNAS. This article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: yann.percherancier@ims-bordeaux.fr.

This article contains supporting information online at <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2205207119/-/DCSupplemental>.

Published November 7, 2022.

measuring permeability changes during whole-cell patch-clamp recordings. Concomitantly, the study by Samways et al. (13) also presented convincing results casting doubts on time-dependent changes in the  $P_{Ca}/P_{Na}$  ratio during sustained activation of TRPV1 with capsaicin (CAPS) under voltage-clamp conditions (7, 8).

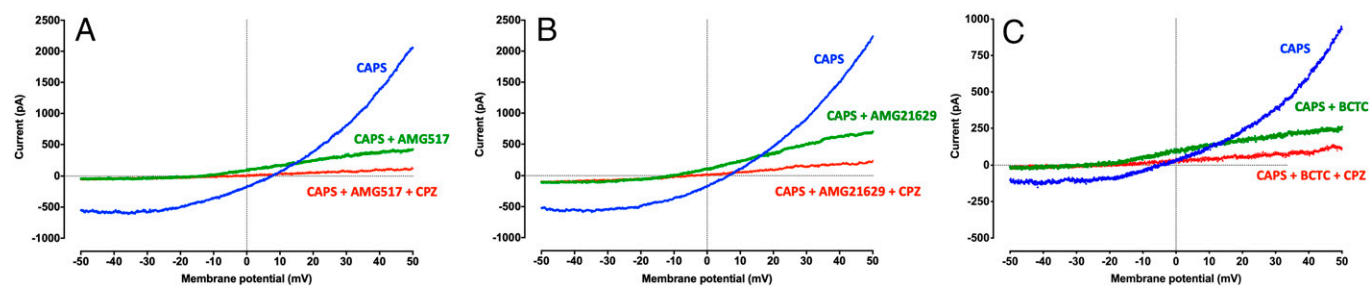
In the quest for compounds inducing a variation in ion selectivity in TRPV1, we found that AMG517, AMG21629, and BCTC, three well-known inhibitors of all TRPV1 activation modes (14), inhibited the CAPS-induced inward rather than the outward current but also induced a shift in  $E_{rev}$  in whole-cell patch-clamp experiments. To further characterize this effect, we took advantage of recently described resonance energy transfer (RET) sensors to measure the quantity of intracellular  $Ca^{2+}$  (15),  $K^+$  (16), and ionic strength (17) in the vicinity of the TRPV1 pore in real time on live cells. These sensors were turned into bioluminescent resonance energy transfer (BRET) probes and fused to one extremity of the TRPV1 channel. The resulting BRET-based probes provided dynamic measurements of  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  concentrations and ionic strength in the nanoenvironment of the TRPV1 channel in real time and in live cells during drug challenges. Our results indicated that some TRPV1 antagonists displayed a differential potency in inhibiting CAPS-induced  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  fluxes. Even more strikingly, we found that AMG517 was a partial agonist of the  $K^+$  efflux through TRPV1. In a further effort to exemplify ligand bias in other families of cationic channels, using the same BRET-based strategy, we also detected concentration- and time-dependent ligand biases in P2X7 and P2X5 cationic selectivity when activated by benzoylbenzoyl-adenosine triphosphate (Bz-ATP).

## Results

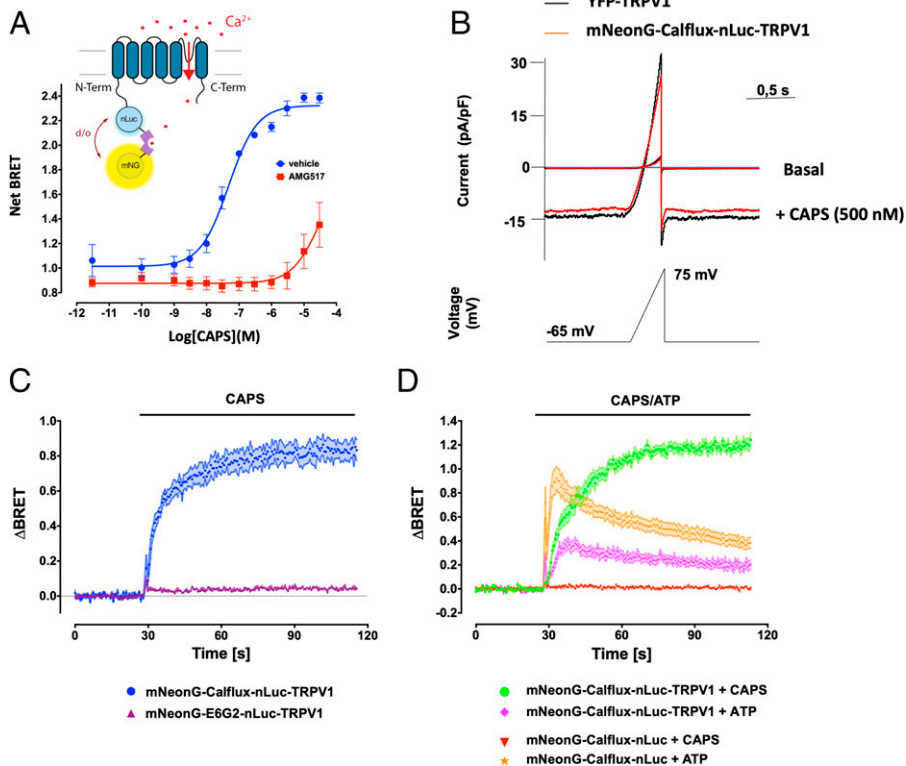
**Antagonist-Evoked Ionic Selectivity Changes in Capsaicin-Activated TRPV1 Measured Using Whole-Cell Automated Patch Clamp.** We performed automated whole-cell patch-clamp experiments in HEK293T cells stably expressing TRPV1. As shown in Fig. 1, in the presence of 100 nM CAPS, the prototypic TRPV1 agonist, the TRPV1 current–voltage relationship ( $I/V$  curve) was outwardly rectifying. As expected, the subsequent application of a saturating concentration of either AMG517, BCTC, or AMG21629, three well-known TRPV1 antagonists (18, 19), decreased the magnitude of the current flow at both positive and negative voltages. Interestingly, in both conditions, the inward current was almost totally inhibited but not the outward current. In addition, both antagonists induced a leftward shift of the  $E_{rev}$ . The antagonist-induced variation in  $E_{rev}$  ( $\Delta E_{rev}$ ) was  $-21.2 \pm 0.2$ ,  $-20.8 \pm 0.2$ , and  $-16.1 \pm 0.3$  mV, respectively, for AMG517, BCTC, and AMG21629. A further injection of a 10-fold more concentrated dose of the prototypic TRPV1 competitive antagonist capsazepine (CPZ) (20) partly reverted the AMG517/AMG21629 or BCTC-induced leftward

shift in  $E_{rev}$  to a less negative value ( $\Delta E_{rev} = +5 \pm 0.2$ ,  $+4 \pm 0.2$ , and  $+4.2 \pm 0.3$  mV, respectively, for AMG517, BCTC, and AMG21629 (see *SI Appendix, Fig. 1* for an enlarged view in the vicinity of the reversal potentials), and almost totally inhibited the remaining outward current, while the inward current stood close to the background level. These data suggested that AMG517, AMG21629, and BCTC, but not CPZ, preferentially inhibits the  $Ca^{2+}/Na^+$  inward ion flux rather than the outward  $K^+$  flux flowing through the gated TRPV1. These data inferred antagonist-dependent ion selectivity but required confirmation with an alternative technique. We, therefore, sought to develop TRPV1-based BRET probes capable of nanoscale measurement of cation concentration variations in the vicinity of the TRPV1 pore during gating.

**Validation of the Fusion between TRPV1- and BRET-Based Calcium Biosensor for Measuring Calcium Influx in the Pore Nanoenvironment during Agonist-Promoted Gating.** Since TRPV1 is known to be more selective for divalent than monovalent ion species, we started by measuring the intracellular  $Ca^{2+}$  rise in the TRPV1 pore nanoenvironment during gating. The human TRPV1 ion channel was thus fused to a slightly modified version of a recently described BRET sensor with a high affinity for calcium (Calflux-VTN) (15). We first sandwiched the troponin C domain (TnC) of the Calflux-VTN BRET sensor between the mNeonGreen (mNeonG) fluorescent and nano Luciferase (nanoLuc) (nLuc) bioluminescent proteins in both orientations, yielding two differently oriented BRET-based calcium sensors (mNeonG-Calflux-nanoLuc and nanoLuc-Calflux-mNeonG). Each BRET-based calcium sensor was then genetically fused to either the N- or C-terminal extremity of the human TRPV1 ion channel, yielding four different fusion proteins (Fig. 2A and *SI Appendix, Fig. 2*). Their functionality was assessed in the presence of increasing concentrations of CAPS following their transient expression in HEK293T cells. While a significant basal BRET signal was measured for each differently oriented construct, we observed that CAPS induced a concentration-dependent change in the basal BRET value for only three of them. There was no CAPS-induced BRET change when HEK293T cells were transfected with the nLuc-Calflux-mNeonG-TRPV1 BRET probe (*SI Appendix, Fig. 2B*). The greatest CAPS-induced BRET increase was measured using the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 fusion protein ( $\Delta BRET_{max} = 1.32 \pm 0.03$ , Fig. 2A). A very significant but less marked BRET change was also measured with both TRPV1-based BRET probes C-terminally fused to the Calflux sensor (*SI Appendix, Fig. 2C and D*). This indicated that both the respective positions of the energy donor and acceptor in the Calflux BRET sensor, and the extremity of TRPV1 to which the sensor was fused, impacted the magnitude of the BRET change



**Fig. 1.** Effect of AMG517, AMG21629, BCTC, and CPZ on CAPS-induced current in HEK cells stably expressing hTRPV1.  $I/V$  curves were obtained using automated patch-clamp assays in cells successively treated with 100 nM CAPS (blue curve), 1  $\mu$ M AMG517 (A), 1  $\mu$ M AMG21629 (B), or 1  $\mu$ M BCTC (C) (green curve), and 10  $\mu$ M CPZ (red curve). Data represent the average  $I/V$  curve of one out of three independent patched cells, with six to nine ramps performed per assay.



**Fig. 2.** Characterization of the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 probe. (A) Concentration–response curves of CAPS-induced BRET changes measured in HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 ( $n = 3$ ). (B) Whole-cell current responses of HEK293T cells expressing YFP-TRPV1 (black line) and mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 channels (red line) to a ramp voltage protocol from  $-65$  mV to  $+75$  mV (holding potential:  $-65$  mV), in the presence or absence of CAPS (500 nM). (C) Kinetics of the CAPS (500 nM)-induced rise in the BRET signal in HEK293T cells transiently expressing either the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 ( $n = 8$ ) or mNeonG-E6G2-nLuc-TRPV1 BRET probe ( $n = 8$ ). (D) Kinetics of the CAPS (10  $\mu$ M) or ATP (100  $\mu$ M)-induced rise in the BRET signal in HEK293T cells transiently expressing either the unfused mNeonG-Calflex-nLuc BRET or the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe ( $n = 6$  to 10 depending on the condition).

measured during TRPV1 gating. The pharmacological selectivity of the ligand-promoted BRET changes measured was further demonstrated by the right shift of the half-maximal response of each TRPV1-based BRET probe in the presence of AMG517 (Fig. 2 and *SI Appendix, Fig. 2*).

Since the largest CAPS-induced BRET variation was obtained using the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe, this configuration was chosen for the rest of the study. Similar to our findings with earlier intra- and intermolecular TRPV1-based BRET probes sensing TRPV1 conformational changes and calmodulin (CaM) coupling during gating (21, 22), we showed that CAPS increased the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 basal BRET with first-order kinetics (Fig. 2 C and D) and potency ( $pEC_{50} = 7.32 \pm 0.08$ , Fig. 2A) matching the values reported in the literature (23, 24). However, the magnitude of the largest BRET variation measured with the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe was at least fivefold higher than those measured with the intra- and intermolecular TRPV1-based BRET probes (*SI Appendix, Fig. 2E*), thus highlighting the potential of these BRET probes. Several verifications were nonetheless required before accepting the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe as a tool for TRPV1 ion channel studies.

Firstly, we verified that the CAPS-induced whole-cell current was of similar magnitude in HEK293T cells expressing either YFP-TRPV1 or mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 (Fig. 2B), knowing that N-terminal YFP fusion does not alter TRPV1 permeability to  $Ca^{2+}$  (21, 25). These results indicated, therefore, that the N-terminal fusion of the mNeonG-Calflex-nLuc BRET sensor to TRPV1 did not alter its electrophysiological properties.

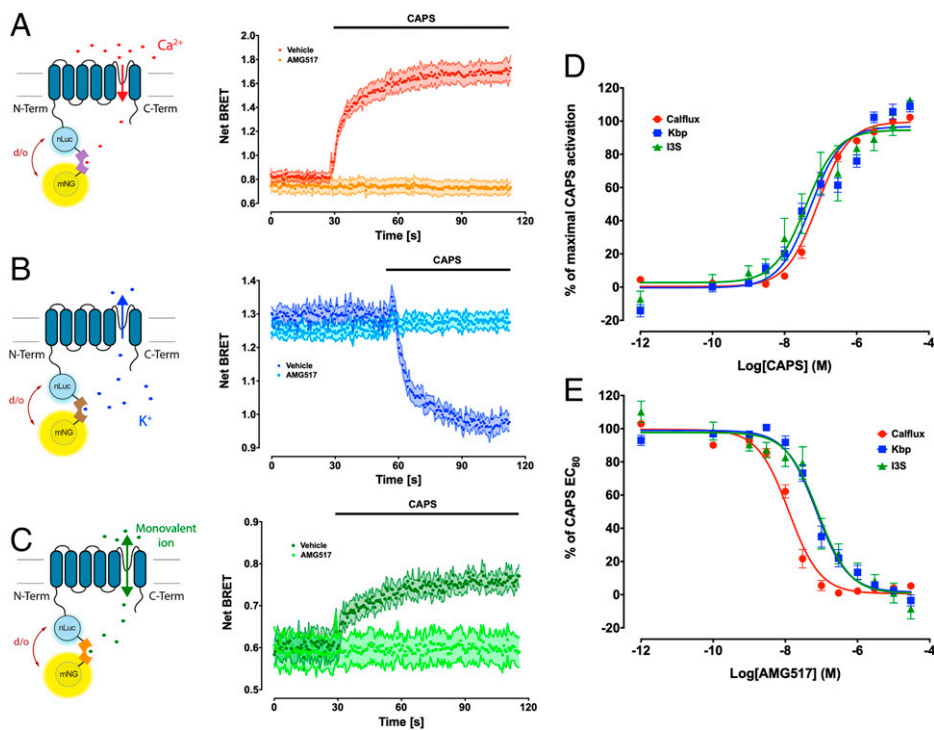
Secondly, it was necessary to determine that the BRET variation measured with this probe during TRPV1 gating was not caused by changes in the various modes of energy transfer between nLuc and mNeonG inside the tetrameric organization of TRPV1 during channel opening (21, 25). To verify this hypothesis, we replaced the calcium-sensitive Calflex sequence in our TRPV1-based BRET probe with the E6G2 sequence, which

senses macromolecular crowding (26), yielding the mNeonG-E6G2-nLuc-TRPV1 BRET probe. As shown in Fig. 2C, following CAPS activation, no BRET increase was measured in HEK293T cells transfected with this probe. This indicated that the BRET variation measured using the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe was caused by the increase in  $Ca^{2+}$  concentration in the intracellular vicinity of the TRPV1 pore rather than conformational changes in the quaternary structure of the TRPV1 ion channel during gating.

Finally, it was essential to verify that the BRET variation measured using the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 probe did not result in  $Ca^{2+}$  influx through an off target. To control for this experimental bias, we took advantage of the endogenous expression of P2Y purinergic receptors in HEK293T cells (27). HEK293T cells transiently transfected with the unfused mNeonG-Calflex-nLuc or mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probes were challenged with either CAPS or ATP. As expected, CAPS did not trigger any BRET increase in the HEK293T cells transfected with the mNeonG-Calflex-nLuc BRET probe alone, but induced a rapid, sustained BRET increase in HEK293T cells transiently transfected with the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe (Fig. 2D). In contrast, ATP caused an immediate, robust increase in the soluble mNeonG-Calflex-nLuc BRET ratio that decreased rapidly over time (Fig. 2D), as expected for the P2Y response to ATP (28). Finally, ATP only induced a low-magnitude, transient increase in the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe signal. Knowing that extracellular ATP is a well-known TRPV1 sensitizer, part of this signal could be due to TRPV1 direct activation at  $37^\circ C$  (27). Altogether, these results indicate that, if any other sources of intracellular calcium increase contributed to the BRET signal, their impact was minimal.

**Measuring Intracellular Variations in Potassium and Monovalent Ionic Strength in the TRPV1 Pore Nanoenvironment during Agonist-Promoted Gating.** Knowing that TRPV1 is a nonselective cation channel, the next step was to use the same molecular





**Fig. 3.** (A–C) Schematic representations (*Left*) and kinetic of the CAPS (500 nM)-induced change in the BRET signal (*Right*) measured with mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (A,  $n = 10$ ), mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (B,  $n = 11$ ), or mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 (C,  $n = 6$ ) BRET probes. AMG517 (10  $\mu$ M) or vehicle was preincubated for 5 min before adding CAPS to the culture medium. (D) Concentration–response curves of CAPS-induced BRET changes measured in HEK293T cells transiently expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 ( $n = 13$ ), mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 ( $n = 13$ ), or mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 ( $n = 6$ ) BRET probes. (E) Concentration–response curves of the ability of AMG517 to inhibit CAPS (500 nM)-induced BRET changes in HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 ( $n = 13$ ), mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 ( $n = 13$ ), or mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 ( $n = 6$ ) BRET probes.

strategy to measure dynamic variations in TRPV1 permeability to other cations during gating. To measure TRPV1 permeability to  $K^+$  during gating, we used the recently described  $K^+$ -sensitive genetically encoded Förster resonance energy transfer (FRET)-based probe, developed to measure  $K^+$  dynamics in real time ( $K^+$ -binding protein [Kbp] sensor) (16). However, designing a  $Na^+$ -sensitive BRET probe was problematic since, to our knowledge, no sodium-binding protein with an affinity in the nanomolar range has yet been described. We were, however, able to build on a recently described ionic-strength FRET biosensor that relies on a positively and a negatively charged  $\alpha$ -helix, with electrostatic attraction dependent on local ionic strength of monovalent ions (17). Following the same strategy used with the Calflux-VTN BRET probe (Fig. 3 A, *Left*), we sandwiched both the  $K^+$ -binding protein (Kbp) described by Bischof et al. (16), and the ionic strength sensitive sequence (hereafter called I3S), described by Liu et al. (17), between the mNeonG fluorescent acceptor at their N-terminal extremities and the nanoLuc bioluminescent donor at their C-terminal extremities. The resulting mNeonG-Kbp-nLuc and mNeonG-I3S-nanoLuc BRET sensors were then N-terminally fused to TRPV1, yielding the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (Fig. 3 B, *Left*) and mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 BRET probes (Fig. 3 C, *Left*).

HEK293T cells expressing each of these BRET probes were then processed separately for BRET analysis. In both cases, the basal BRET, measured under resting conditions, varied with first-order kinetics after exposure to CAPS (Fig. 3), as already shown for the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 probe (Figs. 2 C and 3 A, *Right*) and our former TRPV1-based intra- and intermolecular BRET probes (21). However, the addition of CAPS induced a decrease in basal BRET with the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 probe and an increase in basal BRET with mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 (Fig. 3 B and C, *Right*). Knowing that the efficiency of resonant energy transfer between the donor and acceptor groups encompassing the Kbp sensor increased with the concentration of  $K^+$  ions (16), while the resonant energy transfer efficiency between the donor and

acceptor groups encompassing the I3S sensor decreased as the environmental ionic strength increased (17), our results indicated that both intracellular  $K^+$  and ionic strength of monovalent ions decreased when  $Ca^{2+}$  increased in the nanoenvironment of the TRPV1 pore following CAPS-induced TRPV1 gating. These effects were completely abolished in cells preincubated with AMG517, thereby highlighting the specificity of the assays.

Remarkably, a dose–response analysis revealed that, while CAPS potency to activate TRPV1 was almost identical for all BRET probes (Fig. 3 D), the AMG517 potency to inhibit CAPS-induced TRPV1 activation was right shifted by almost one log for both the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 and mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 probes in comparison with mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (Fig. 3 E, see also Table 1).

Since the I3S probe is mainly insensitive to  $Ca^{2+}$  (17), our data thus suggested that, under physiological conditions, 1) the  $K^+$  efflux may overcome the  $Na^+$  influx in response to CAPS-induced TRPV1 gating, and 2) AMG517 may differentially inhibit both  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  fluxes through the open TRPV1 pore.

#### Assessment of the Cross-Talk between the $K^+$ Efflux and the $Na^+/Ca^{2+}$ Extracellular Ions.

As stated in a very comprehensive review by Cao (29): “Ion selectivity of TRP channels is perhaps defined by interaction energy of competing permeable cations with dynamic selectivity filters, which is beyond what can be gleaned from only inspecting the existing static snapshots of TRP channel structures.” The advent of BRET probes suited for assessing the dynamics of various cytoplasmic cations in the TRPV1 pore nanoenvironment thus offered the opportunity to study the dynamic interplay among cations to access the TRPV1 pore.

TRPV1 being more specific for  $Ca^{2+}$  than for  $K^+$  or  $Na^+$  (7, 23), we challenged HEK293T cells expressing either mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (Fig. 4 A) or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 4 B) with increasing concentrations of CAPS in the presence or absence of extracellular  $Ca^{2+}$ . The basal

**Table 1. pEC<sub>50</sub>/pIC<sub>50</sub> values derived from curve fitting TRPV1 agonist/antagonist dose-responses, measured using either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probes**

		mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1	mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1	P value
Agonists	Capsaicin	7.08 ± 0.03 (13)	7.13 ± 0.04 (13)	n.s.
	Olvanil	6.53 ± 0.06 (8)	6.96 ± 0.09 (8)	*
	RTX	8.30 ± 0.05 (9)	8.11 ± 0.06 (9)	n.s.
Antagonists	AMG517	7.90 ± 0.04 (13)	7.14 ± 0.06 (13)	****
	BCTC	8.10 ± 0.12 (5)	7.35 ± 0.10 (5)	**
	AMG21629	8.46 ± 0.07 (7)	7.85 ± 0.07 (7)	***
	CPZ	5.76 ± 0.08 (7)	5.71 ± 0.08 (7)	n.s.
	JNJ17203212	6.84 ± 0.09 (6)	6.65 ± 0.12 (6)	n.s.
	AMG9810	6.39 ± 0.13 (6)	5.74 ± 0.11 (6)	*

Values represent the mean ± SE of (*n*) independent experiments performed in duplicate. n.s., not significant; \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; \*\*\*\**P* < 0.0001.

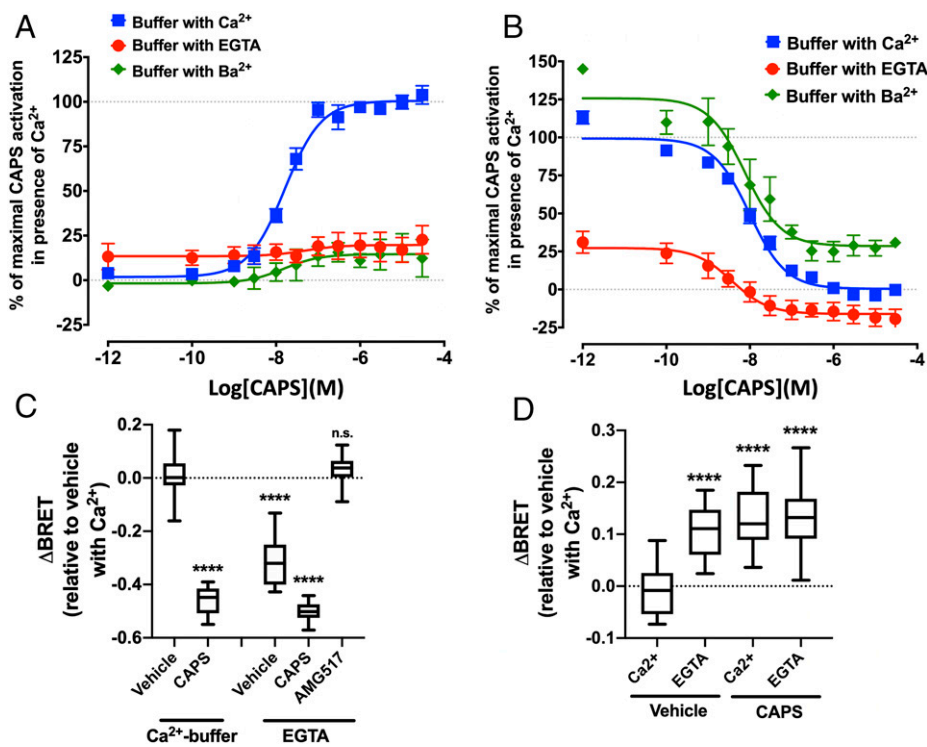
BRET ratio of the calcium-sensing TRPV1-based BRET probe increased slightly in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. The reason for this is not clear, but it may indicate that, in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, more Ca<sup>2+</sup> may be released from internal stores in the cytosol. However, as expected, removal of extracellular Ca<sup>2+</sup> almost completely abolished CAPS-induced calcium influx. In parallel, chelation of extracellular Ca<sup>2+</sup> induced a ~75% decrease in the basal BRET ratio measured in HEK293T cells transfected with the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 4 B and C). Intriguingly, in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, CAPS still induced a dose-dependent decrease in K<sup>+</sup> in the nanoenvironment of the TRPV1 pore (Fig. 4 B and C), which was characterized by a small leftward shift of the CAPS potency (pEC<sub>50</sub> = 8.01 ± 0.3 in the presence of Ca<sup>2+</sup> vs. 8.54 ± 0.37 in the presence of aminopolycarboxylic acid (EGTA), *n* = 8, *P* < 0.05), and a slightly lower plateau at high CAPS concentrations (Fig. 4B). Such results suggested either that there is a competitive cation interaction between K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> or that removing Ca<sup>2+</sup> lifts Ca<sup>2+</sup>-dependent TRPV1 desensitization under the experimental conditions studied (i.e., 37°C). Since Ba<sup>2+</sup> does not support TRPV1 desensitization (30), we therefore substituted Ba<sup>2+</sup> for Ca<sup>2+</sup>. As expected, in the presence of extracellular Ba<sup>2+</sup>, CAPS only slightly increased the BRET signal measured in cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (Fig. 4A). However, Ca<sup>2+</sup> replacement by Ba<sup>2+</sup> did not trigger any K<sup>+</sup> efflux (Fig. 4B), and the basal concentration of K<sup>+</sup> was even slightly increased. As a result, there was an offset in the concentration–response curve for CAPS to higher BRET values, but with no change in CAPS potency to trigger the K<sup>+</sup> efflux. Importantly, AMG517 completely abolished the K<sup>+</sup> efflux measured in the presence of EGTA (Fig. 4C). Taken together, these data argue much more in favor of a competition between K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> for accessing the TRPV1 pore than a desensitization lift leading to K<sup>+</sup> efflux, which should also have occurred in the presence of Ba<sup>2+</sup>.

Interestingly, the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> decreased the intracellular monomeric ionic strength near the TRPV1 pore similarly to CAPS, as measured by the increase in BRET signal with the mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 BRET probe (Fig. 4D). However, no additive effect of CAPS and EGTA was observed. Finally, in agreement with the studies by Ohta et al. and Jara-Oseguera et al. (31, 32) showing that Na<sup>+</sup> negatively regulates the gating and polymodal sensitization of the TRPV1 channel, we found that replacement of extracellular Na<sup>+</sup> by the large monovalent cation *N*-methyl-D-glucamine (NMDG<sup>+</sup>) both increased the basal intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in the vicinity of the TRPV1 pore and left shifted the CAPS potency to trigger a Ca<sup>2+</sup> influx (SI Appendix, Fig. 3). This effect was accompanied

by a concomitant slight increase in the K<sup>+</sup> basal level in the pore nanoenvironment without any shift in CAPS potency to trigger a K<sup>+</sup> efflux through TRPV1. Whether this reflects a balance between lifting of the Na<sup>+</sup> negative effect on K<sup>+</sup> efflux and increased competition with Ca<sup>2+</sup> influx remains to be determined.

In order to confirm these results, we assessed the effect of Ca<sup>2+</sup> removal on K<sup>+</sup> efflux through TRPV1 using whole-cell voltage clamp. Using physiological concentrations of external Na<sup>+</sup> ([Na<sup>+</sup>]<sub>out</sub>) and Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>), and K<sup>+</sup> as the main internal cation ([K<sup>+</sup>]<sub>int</sub>), removing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> (by introduction of EGTA [500 μM] into the bath) repeatedly increased the outward K<sup>+</sup> flux at positive potential (SI Appendix, Fig. 4A) but also at negative potential close to the HEK293T plasma membrane resting potential (E<sub>m</sub>) (SI Appendix, Fig. 4B, see also SI Appendix, Table 2). EGTA was unable to produce such an effect on untransfected HEK293T cells (SI Appendix, Fig. 4C). Moreover, using a current-clamp technique with NMDG<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> as the external cations, and K<sup>+</sup> as the only internal cation, EGTA clearly hyperpolarized the cell membrane (SI Appendix, Fig. 4D), indicating that in our experimental conditions, the removal of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> effectively triggered an outflow of [K<sup>+</sup>]<sub>int</sub>. In this last experiment, [Na<sup>+</sup>]<sub>out</sub> was substituted by [NMDG<sup>+</sup>]<sub>out</sub> to lift the TRPV1 inhibition by Na<sup>+</sup> (31, 32) and to better assess the potassic current, as this is the only one measured with the mNeon-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probe. In addition, the current–voltage relation obtained in the presence of CAPS showed outward rectification whether [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> was present or not (SI Appendix, Fig. 4E). However, while the K<sup>+</sup> outward current measured at positive potential was almost unchanged by [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> removal, the Na<sup>+</sup> inward current measured at negative potential was of very low intensity. Importantly, the E<sub>rev</sub>, which was measured at −0.51 ± 1.01 mV (*n* = 7) in the presence of CAPS and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> was shifted to −19.3 ± 1.19 mV (*n* = 3) when CAPS and EGTA were introduced together into the bath (SI Appendix, Fig. 4E). These data confirmed that, as shown with our BRET probes (Fig. 4), in the absence of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>, the K<sup>+</sup> efflux is effectively much more increased through the CAPS-gated TRPV1 than the residual Na<sup>+</sup> influx.

**Comparison of the Selective Triggering or Inhibition of Ca<sup>2+</sup> or K<sup>+</sup> Fluxes through TRPV1 by Reference Compounds.** We then aimed at assessing whether other ligands also differentially modulated TRPV1 permeability to Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. Concentration–response curves in HEK293T cells expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probes revealed that, as observed with CAPS, resiniferatoxin (RTX) displayed similar potencies to trigger Ca<sup>2+</sup> influx and K<sup>+</sup> efflux (Fig. 5A and Table 1). Olvanil was however slightly more potent to trigger the K<sup>+</sup> efflux than the Ca<sup>2+</sup> influx (Fig. 5B and Table 1).



**Fig. 4.** (A and B) Concentration–response curves of CAPS-induced BRET changes in HEK293T cells expressing either the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 (A) or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 probe (B), in the presence or absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or following the substitution of  $\text{Ba}^{2+}$  for  $\text{Ca}^{2+}$ . (C and D) Box and whisker plots representing the mixed impact of calcium deprivation (EGTA), CAPS (500 nM), and AMG517 (10  $\mu\text{M}$ ) on the basal BRET measured in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in untreated HEK293T cells that were either transfected with the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (C,  $n = 16$ ) or mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 (D,  $n = 18$ ) BRET probes. When present, the external concentration of  $\text{Ba}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  was 1 mM. For assays performed in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , cells were washed once with a buffer without  $\text{Ca}^{2+}$  and EGTA 2 mM (w/o  $\text{Ca}^{2+}$ /with EGTA) before the assay was performed in the same fresh buffer. Results represent the variation in basal BRET between the control condition and the various treatments. Statistical significance of the derivation from the null hypothesis (no difference between control condition [vehicle in presence of  $\text{Ca}^{2+}$ ] and one treated condition) was assessed using the one-sample Wilcoxon signed-rank test. n.s., not significant; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Of note, the rank order of  $\text{EC}_{50}$  and maximal efficacy values for each agonist was the same for the two BRET biosensors with  $\text{RTX} > \text{CAPS} > \text{olvanil}$  (SI Appendix, Fig. 5). While these results are in full agreement with the literature concerning the agonist-induced TRPV1 permeability to  $\text{Ca}^{2+}$  (33–35), our study extends this observation to the agonist-induced TRPV1 permeability to  $\text{K}^{+}$  and suggests that the balance of ion fluxes through TRPV1 is intrinsically dependent upon the agonist used.

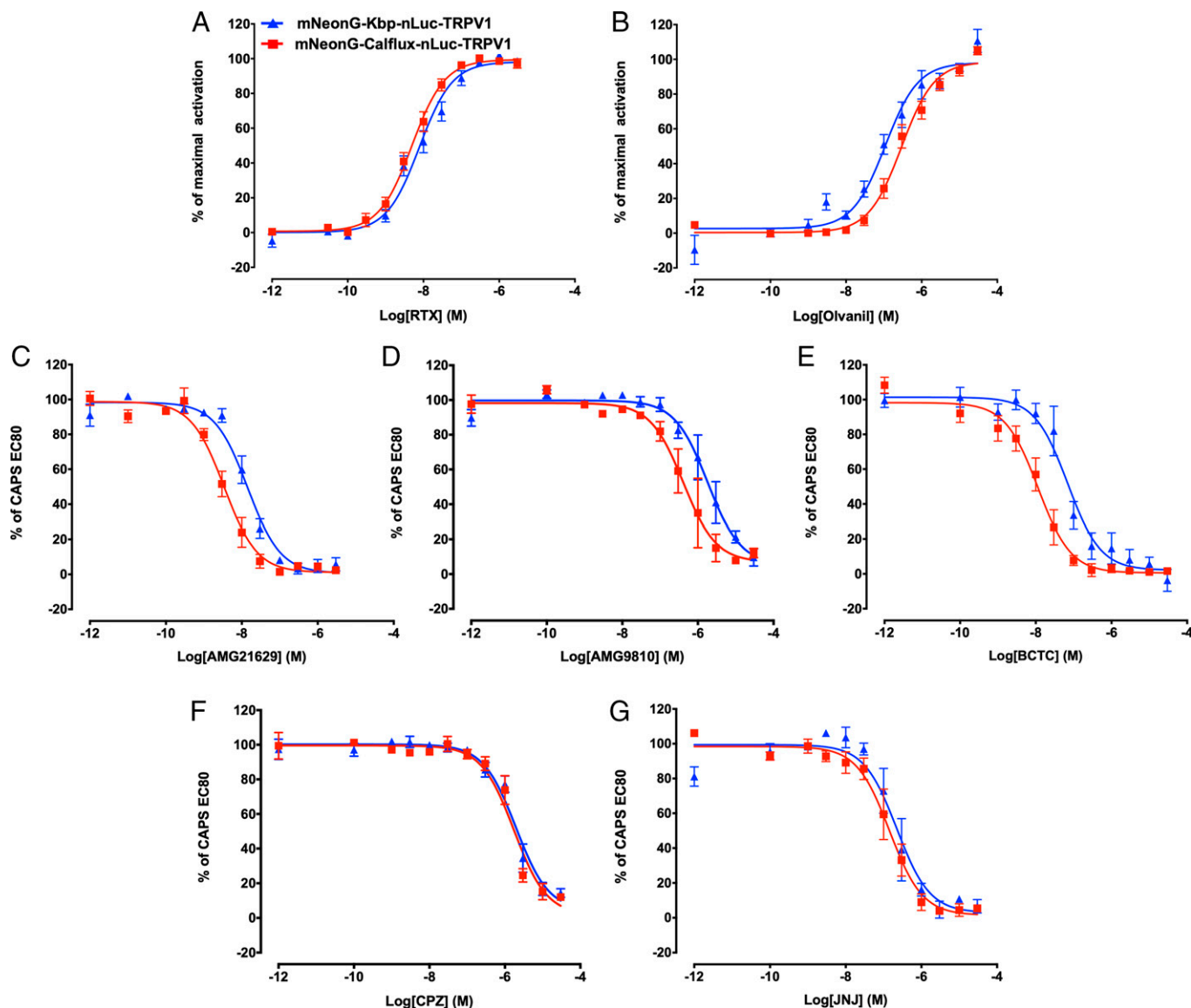
Considering the TRPV1 antagonists, in addition to AMG517, the compounds AMG21629, AMG9810, and BCTC, also displayed a higher potency to inhibit the  $\text{Ca}^{2+}$  influx than the  $\text{K}^{+}$  efflux, both triggered by an  $\text{EC}_{80}$  of CAPS (Fig. 5 C–E and Table 1). Neither of the two other antagonists tested (CPZ and JNJ17203212) caused such a ligand bias (Fig. 5 F and G and Table 1). These findings indicated that some known TRPV1 antagonists exert ion-specific inhibition of the CAPS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  fluxes through TRPV1.

Knowing that a partial agonist partly antagonizes the activity of a full agonist, these compounds, therefore, behave either as pure antagonists or as partial agonists of each flux but with different potencies. To distinguish between these possibilities, kinetic experiments were performed in HEK293T cells expressing either the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probes in the presence of AMG517, BCTC, CPZ, and AMG21629. As shown in Fig. 6A, while an  $\text{EC}_{80}$  of CAPS induced a robust, sustained increase in the BRET ratio in cells expressing the mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV1 BRET probe, BCTC and AMG517 induced only a very transient, slight amplitude increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the vicinity of the TRPV1 channel pore. The reason for this intracellular calcium puff is not clear. It may be related to the complete expulsion of  $\text{Ca}^{2+}$  trapped in either the outer pore entrance or central pore vestibule during antagonist-driven conformational changes leading to a less  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable TRPV1 conformation. Such transient calcium increase was almost undetectable when CPZ or AMG21629 was used. All antagonists efficiently blocked the CAPS-induced BRET increase.

Strikingly, AMG517 triggered a sustained  $\text{K}^{+}$  decrease,  $\sim 30\%$  of the one triggered by CAPS (Fig. 6B). BCTC only triggered a transient and less marked  $\text{K}^{+}$  decrease. No similar effect was measured using CPZ and AMG21629, as injection did not modify the BRET signal baseline measured with the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probe. Altogether, these results are in agreement with the notion that AMG517, BCTC, and AMG21629 are authentic, potent antagonists of the  $\text{Ca}^{2+}$  flux (36, 37). At the same time, AMG517, but not AMG21629, behaves as a weak partial agonist of the  $\text{K}^{+}$  flux. BCTC only induced a very transient, slight amplitude efflux of  $\text{K}^{+}$  paralleling the kinetic of the calcium puff, making it difficult to categorize. As expected, CPZ behaved as a pure antagonist of both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  fluxes.

Knowing that potassium is the dominant ion controlling resting membrane potential (38), potassium efflux through the biased opening of the TRPV1 channel, even at low levels, may induce hyperpolarization. As this event depends on the potassium ion's driving force, and since the Nernst potential for the potassium ion is about  $-90$  mV, it only occurs in relatively depolarized cells. Knowing that the membrane potential of HEK293T cells is around  $-25$  mV (39), we tested whether AMG517 differentially modulated the membrane potential of these cells when transiently expressing TRPV1. As expected, CAPS induced membrane depolarization of HEK293T cells transfected with TRPV1, as indicated by a net increase in the signal measured using a fluorometric membrane potential dye (Fig. 6C). In sharp contrast, among all the antagonists tested, only AMG517 induced a time-dependent signal decrease with a time constant similar to that measured in the presence of CAPS in TRPV1-expressing HEK293T cells (Fig. 6C) but not in untransfected HEK293T cells (SI Appendix, Fig. 6 A and B). We confirmed the effect of AMG517 on ramp depolarization and membrane potential measured in HEK293T cells transiently expressing YFP-TRPV1, and using the  $[\text{NMDG}^{+}]_{\text{out}}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  and  $[\text{K}^{+}]_{\text{int}}$  experimental condition. As shown in SI Appendix, Fig. 6C, AMG517 increased the potassic outward current at positive potential and at  $-30$  mV, close to the resting





**Fig. 5.** (A and B) Variations in the BRET signal measured in HEK293T cells expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (red curves) or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probes (blue curves) in response to increasing quantities of RTX (A) or olvanil (B). (C-G) Concentration-response curves of the ability of AMG21629 (C), AMG9810 (D), BCTC (E), CPZ (F), and JNJ17203212 (G), to inhibit CAPS (500 nM)-induced BRET changes in HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (red curves) or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (blue curve) BRET probes. The calculated  $EC_{50}/IC_{50}$  and number of replicates are indicated in Table 1.

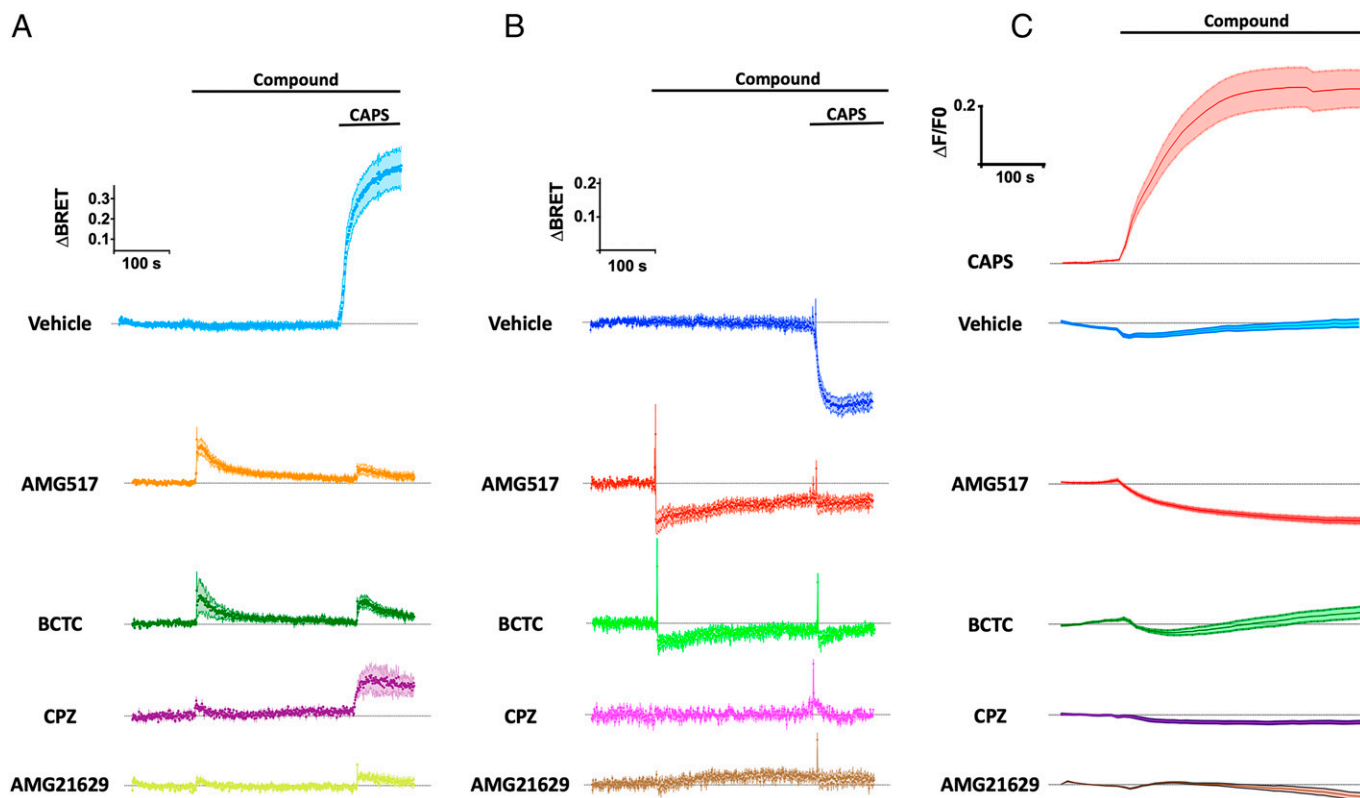
membrane potential of the HEK293T cells (*SI Appendix, Table 2*). Finally, the impact of AMG517 on TRPV1 was further confirmed by current-clamp experiment showing that AMG517 reversibly hyperpolarized the cells' membrane potential (*SI Appendix, Fig. 6D*).

**Measuring Intracellular Calcium and Potassium Concentrations in the Vicinity of the P2X Ligand-Gated Ion Channel Pore.** We next tested whether our ionic BRET sensors could also monitor ion flux through ligand-gated ion channels, such as P2X purinergic receptors. We, therefore, fused the mNeonG-Calflux-nLuc sensor to the C-terminal tails of the seven human P2X subunits (Fig. 7A). Among the seven probes, time- and concentration-dependent ATP increases in BRET signals were observed for P2X2 (Fig. 7B, *Left*) and P2X4 (Fig. 7B, *Right* and Fig. 7C). Similar observations were made for P2X5 (Fig. 7C). In the case of P2X4, slow desensitization of the receptor was observed following prolonged ATP application, as already described (40). Because of the rapid desensitization of P2X1

and P2X3 receptors and the inability of P2X6 subunits to generate functional homomeric receptors, we did not characterize in detail the BRET probes for these three subunits. The apparent potencies ( $pEC_{50}$ ) of ATP to trigger an influx of  $Ca^{2+}$  for the others P2X subunits are given in *SI Appendix, Table 1*.

In the next experiment,  $K^+$  permeability through the P2X receptor pores was monitored by fusing the mNeonG-Kbp-nLuc sensor to the C-terminal tail of the human P2X subunits (Fig. 7D). We aimed at comparing over time  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  permeability changes of hP2X7, a receptor that undergoes a facilitation phenomenon (41) and which is associated with an apparent pore dilation. Benzoyl ester of ATP (Bz-ATP), which is by far the most potent P2X7 agonist, was used to activate the receptor. A similar analysis was performed on hP2X5, another P2X receptor activated by Bz-ATP. Time- and dose-dependent Bz-ATP decreases in BRET were observed in these two receptors (Fig. 7E and G, *Right*), confirming that hP2X-mNeonG-Kbp-nLuc probes were able to track the potassium permeability of these two receptors. The BRET variation in  $Ca^{2+}$ - and  $K^+$ -sensitive probes during the





**Fig. 6.** Kinetics of the effect of vehicle ( $n = 14$ ), AMG517 ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 12$ ), BCTC ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 7$ ), CPZ ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ), and AMG21629 ( $1 \mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ) on the basal BRET measured in HEK293T cells transiently expressing either mNeonG-Caflux-nLuc-TRPV1 (A) or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (B). CAPS ( $500 \text{ nM}$ ) was injected when indicated. (C) Kinetics of the effect of CAPS ( $500 \text{ nM}$ ,  $n = 6$ ), vehicle ( $n = 6$ ), AMG517 ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ), BCTC ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ), CPZ ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ), or AMG21629 ( $1 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ) on the membrane potential of HEK293T cells transiently transfected with TRPV1.

first 3 min after Bz-ATP injection indicated that Bz-ATP had a similar potency to induce  $\text{Ca}^{2+}$  influx and  $\text{K}^{+}$  efflux through P2X5 (Fig. 7 F and G, and *SI Appendix*, Table 1). The potency of Bz-ATP to trigger  $\text{Ca}^{2+}$  influx through P2X7 during the same period, however, was slightly higher than its potency to induce  $\text{K}^{+}$  efflux through P2X7 (Fig. 7 E and F and *SI Appendix*, Table 1).

Moreover, the time-dependent relative permeability of P2X5 and P2X7 to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  changed over time following the Bz-ATP challenge (Fig. 7H). In both P2X5 and P2X7, Bz-ATP triggered an immediate  $\text{Ca}^{2+}$  rise that decreased slightly after peaking. In sharp contrast,  $\text{K}^{+}$  never peaked but increased slowly over time following Bz-ATP addition to the cell culture medium (Fig. 7 E and G). This phenomenon was exacerbated at the highest Bz-ATP concentration tested ( $1 \text{ mM}$ ) on P2X5. While the permeability of P2X5 to calcium was highest 1 min after Bz-ATP injection, it then dropped dramatically to a level close to the background. At the same time, permeability to  $\text{K}^{+}$  increased gradually and was maintained over time. Taken together, these results confirmed that our ionic BRET biosensors were effective at monitoring ligand-gated ion-channel activation and represent valuable tools for tracking specific ion permeability during receptor gating.

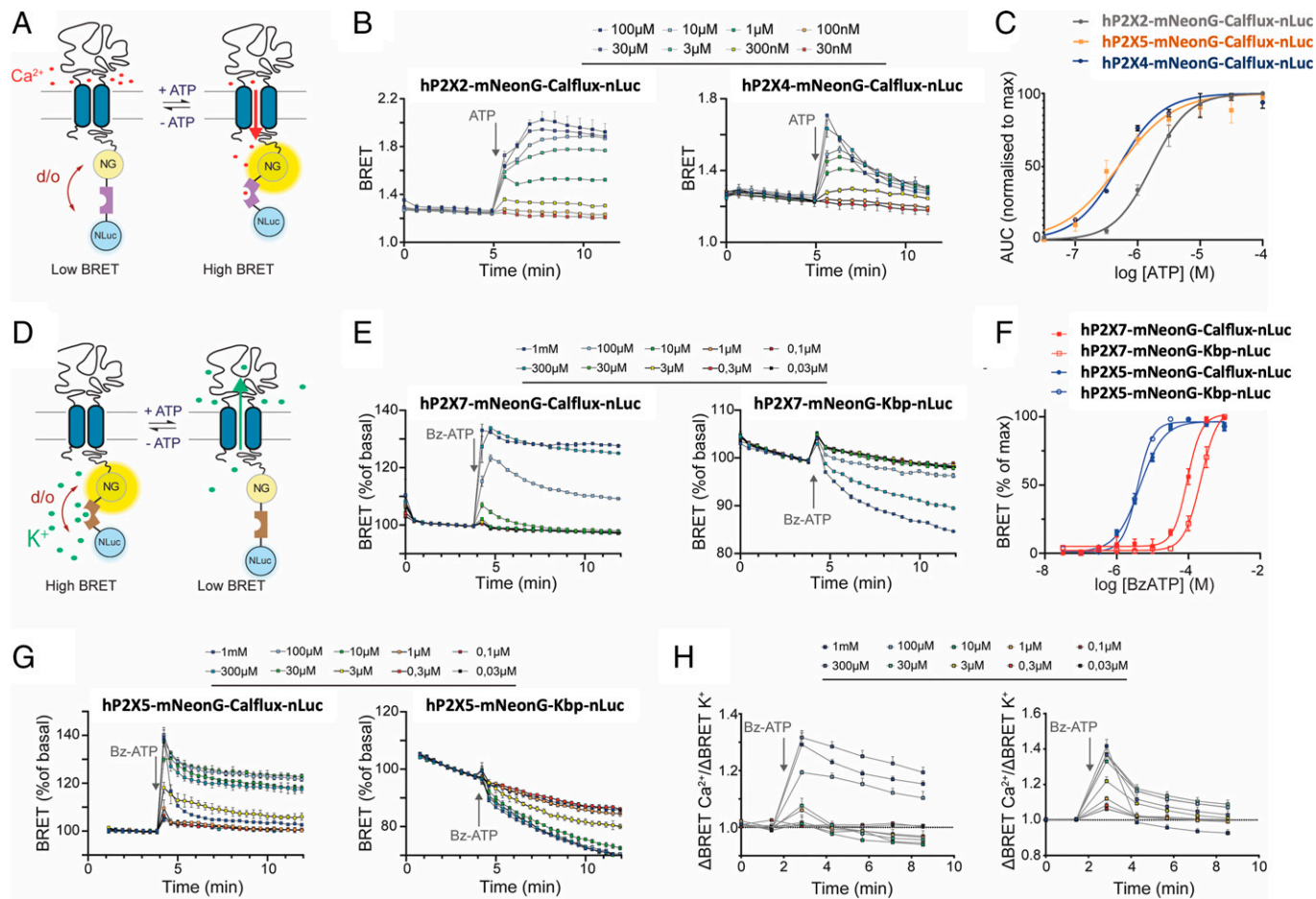
## Discussion

Tracking selective ion permeability through ion channels is challenging. To date, the only way to study specific ionic flux during ion channel gating has been electrophysiological recording. Using this technique, intra- or extracellular media must be constrained during electrophysiological recording, therefore precluding the monitoring of ion flux under physiological conditions and leading to technical bias such as the phenomenon of “ion accumulation” (12, 13). In this work, we generated

highly sensitive BRET probes for real-time, noninvasive measurement of specific ion concentration changes in the vicinity of TRPV1 and P2X pores in live cells.

Our BRET study on TRPV1 produced three significant results. Firstly, while all tested agonists, except olvanil, displayed equivalent potency to gate the TRPV1 channel for both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$ , among the antagonists tested, AMG517, AMG21629, and BCTC were more potent in inhibiting CAPS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx than CAPS-induced  $\text{K}^{+}$  efflux. Secondly, we found that AMG517, but not BCTC or AMG21629, was a long-lasting partial agonist of  $\text{K}^{+}$  efflux through TRPV1. Thirdly, AMG517 induced TRPV1-dependent hyperpolarization of HEK293T cells. These results indicate that antagonists display biased activity when interacting with a given ion channel by selectively and differentially modulating the flux of different ions through the gated channel.

Which hypotheses may explain ligand bias on TRPV1 on a structural level? It is known that the pore regions of TRPV1/2/3/4 exhibit significant sequence homology with the selectivity filter of the bacterial  $\text{K}^{+}$  ion channel (KcsA). This includes the signature sequence motif TXGYGD—TXGMGD in TRPV1 channels—that suggests a similar pore organization (42). Furthermore, at the outermost site of their selectivity filter facing the extracellular vestibule, most TRP channels contain a negatively charged residue, predominantly aspartic acid. The mutation of this amino acid has been shown to affect ion selectivity (reviewed in ref. 29). Interestingly, point mutation of the human TRPV1 selectivity filter at position D646 and the corresponding mutation of murine TRPV4 at position D682 have been shown to reduce permeability to  $\text{Ca}^{2+}$  (43, 44), thus rendering both ion channels selective for monovalent ions. While the amino acid at this position may not account for all the pore properties, suggesting the existence of additional structural



**Fig. 7.** (A) Schematic of the P2X-mNeonG-Calflex-nLuc BRET probe, where the mNeonG-Calflex-nLuc calcium biosensor was fused to the C-terminal extremity of P2X subunits. The opening of P2X receptor pores by ATP was expected to modify the distance (d) and/or orientation (o) between mNeonG and nLuc following calcium binding and conformational changes in Calflex. (B) Representative kinetics of the effect of increasing doses of ATP on the BRET ratio measured in HEK293T cells expressing the hP2X2-mNeonG-Calflex-nLuc (Left) or hP2X4-mNeonG-Calflex-nLuc (Right) BRET probes. (C) Concentration-response curves of ATP on the BRET ratio measured in HEK293T cells transfected with different human (h) P2X-mNeonG-Calflex-nLuc BRET probes ( $n = 3$ , except for hP2X4,  $n = 2$ ). (D) Schematic of the P2X-mNeonG-Kbp-nLuc BRET probe, where the potassium biosensor mNeonG-Kbp-nLuc was fused to the C-terminal extremity of P2X subunits. The opening of P2X receptor pores by ATP was expected to modify the distance (d) and/or orientation (o) between mNeonG and nLuc following potassium efflux and conformational changes in Kbp. (E and G) Representative kinetics of the effect of increasing doses of Bz-ATP on the BRET ratio measured in HEK293T cells expressing the hP2X7 (E) or hP2X5 (G) subunits fused to either mNeonG-Calflex-nLuc (Left) or mNeonG-Kbp-nLuc (Right) BRET probes. (F) Concentration-response curves of Bz-ATP on the BRET ratio measured in HEK293T cells transfected with hP2X5 or hP2X7 and fused to either the calcium or the potassium BRET probes ( $n \geq 3$ ). (H) Relative variation of the intracellular quantity of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  in the vicinity of the P2X7 pore (Left) or P2X5 pore (Right).

determinants (43), these experiments nevertheless demonstrate that the sequence motif and charge distribution in the putative pore region determine the permeation properties of these TRP channels. It is also known that the TRPV1 pore is subjected to high plasticity during pore opening with proton and ligands, involving allosteric coupling between upper and lower gates and large conformational changes (45, 46). Given the similarity between the TRPV1 and KscA selectivity filters, and setting aside pore dilation, ligand-induced allosteric stabilization of distinct conformational states with subtle changes in charge distribution along the selectivity filter potentially may cause selective ion dehydration at the entrance barrier and/or more-or-less tortuous trajectories of different ions through the filter (47). It follows that TRPV1 ion channels should not be modeled as two-state biophysical entities, shuttling between open and closed states, but rather as allosteric, flexible entities, generating a variety of conformations in response to different ligands and activation modes. This model is closely related to the concept of “allosteric microprocessors” described by Smith et al. (48), where G protein-coupled receptor (GPCR)-biased ligands transmit distinct structural information that is processed into distinct biological outputs.

We moreover postulate that the TRPV1-dependent hyperpolarization measured when AMG517 was injected alone resulted from its activity as a partial agonist of the  $\text{K}^{+}$  efflux. However, we acknowledge that our study was performed in HEK293T cells, with a resting membrane potential around  $-25$  mV. At this value, the  $\text{K}^{+}$  driving force is far from negligible since the electrochemical equilibrium potential of  $\text{K}^{+}$  is around  $-90$  mV. Knowing that most quiescent primary cells have a hyperpolarized resting membrane potential lower than  $-50$  mV (such as neurons or pancreatic  $\beta$ -cells) (49), it may, therefore, be inferred that ligand bias on TRP ion channels will rarely have a physiological impact, as the  $\text{K}^{+}$  driving force will not be strong enough in these cells. Nonetheless, since excitable cell depolarization during spontaneous spiking will induce a  $\text{K}^{+}$ -driving force, biased-enhanced  $\text{K}^{+}$  permeability should reduce cellular input resistance and create a shunt that may powerfully hinder spontaneous spiking or bursting. Also, given the role that TRPV1 may play in the regulation of cancerous and healthy cell proliferation (50–52), and knowing that membrane depolarization is a prerequisite for cell division and proliferation (53), biased cationic selectivity in TRP ion channels may therefore occur in TRPV1 depending on the cell proliferation

state. Finally, it is well known that hyperthermia occurs in a variety of mammalian organisms, including human, mouse, and rat, following systemic administration of many of the TRPV1 antagonists, including BCTC and AMG517. In contrast, TRPV1 agonists (such as CAPS) and other antagonists (e.g., A-1165901, A-425619, AMG7905, and AMG8562) trigger hypothermia (reviewed in ref. 54). Whether ligand-biased cationic selectivity is a key factor in TRPV1-dependent body-temperature regulation remains to be determined.

Another intriguing issue arising from our results is that when extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is absent,  $\text{K}^+$  apparently leaks freely from the nonactivated TRPV1 channel (Fig. 6). Reciprocally, in CAPS-activated HEK293T cells expressing rat TRPV1, Ahern et al. reported an  $E_{\text{rev}}$  shift to more positive values when the I/V curves were measured in the presence of a high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (100 mM) (55). Altogether, these observations suggest that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and intracellular  $\text{K}^+$  compete to flow through the TRPV1 pore or that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stabilizes a TRPV1 conformation less permeable to potassium.

In this study, we also generated biosensors to monitor the dynamic change of  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration in the vicinity of the P2X ligand-gated ion-channel pore during activation. Although a comparison of selective calcium permeability between P2X receptors has been reported (56), selective permeability to various cations following activation of a given P2X receptor has never been demonstrated. Using our BRET biosensors, we found that, during the first few minutes after injection into the cell culture medium, Bz-ATP displayed similar potency to induce both  $\text{K}^+$  efflux and  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the hP2X5 receptor pore. However, Bz-ATP had higher potency to induce  $\text{Ca}^{2+}$  influx rather than  $\text{K}^+$  efflux through the hP2X7 pore. This pointed to ligand bias-induced ion selectivity in hP2X7 channel. Interestingly, we also measured a time-dependent variation in hP2X5 and hP2X7 selectivity for potassium while Bz-ATP remained in the cell culture medium. Further research will focus on extending this concept to other P2X ion channels, such as the P2X4 receptor that displays the highest  $\text{Ca}^{2+}$  permeability among that family.

Finally, the demonstration that some compounds more potently inhibit or activate one specific ion flux may directly impact our TRP channel molecular pharmacology and drug screening approach. The gold standard for studying ion channel activity, including TRP and P2X, remains patch-clamp electrophysiology. While manual patch clamp is time consuming and requires expert handling, the advent of automated patch clamp (APC) increases throughput for screening ion channel targets (57). However, since APC remains expensive, the combination of fluorescence-based technologies, as a primary screen, followed by APC hit confirmation screen, has become the most commonly used method for ion channel-targeted drug discovery (58). In addition, TRP ion channel permeability to  $\text{Ca}^{2+}$  is remarkably high, which has favored the use of  $\text{Ca}^{2+}$ -based fluorescence assays to measure channel function using conventional plate readers or microscopes (59). Furthermore, whether APC is used as a primary or secondary screen, given the outward rectifying properties of many TRP channels, such as TRPV1/3/4, TRPA1, or TRPM8, most high-throughput screening studies only take into account their outward current measured at high positive membrane potential (60). While the amplitude of this current is much greater than the inward current measured at negative resting  $E_m$ , it nonetheless corresponds to an outward potassium current under nonphysiological membrane voltage conditions. We recently demonstrated the fallacy of the assumption that any hit displays an equal ability to activate or inhibit TRPV1 gating, irrespective of membrane potential (22). In this earlier study, we hypothesized that different ternary or quaternary

conformational states of TRPV1 were stabilized when the  $E_m$  was clamped at selected values. The results presented here show that some compounds, such as AMG517, may behave as biased ligands, positively or negatively discriminating between ions flowing through a gated channel, thus adding a new layer of complexity. This highlights the risk of considering that all hits display an equal ability to activate or inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  fluxes (and probably the  $\text{Na}^+$  flux as well). Ligand-dependent differential selectivity may, therefore, be a major source of experimental bias in many ion-channel drug screening campaigns. For example, if the workflow of a TRP ion-channel drug screening campaign includes APC confirmation of hits previously identified using a fluorescent calcium assay, there is a risk of false-negative hits if only the outward current is taken into account during the secondary screen. Similarly, it is perfectly conceivable that biased ligands may be overlooked during a primary screen for a specific nonselective cationic TRP ion channel if we consider only the calcium fluorescent assay results or APC results measured at only one membrane potential. Finally, there is also a risk of false-negative hits if ligand bias is not taken into account during a counterscreen to detect potential cross-reactivity of a third-party receptor/channel ligand on a cation channel such as TRP or P2X.

Therefore, in addition to our recently reported intra- and intermolecular BRET probes, these custom-engineered BRET-based probes now open up avenues for adding value to ion-channel drug discovery platforms by taking ligand bias into account, thus addressing molecular events related to ion channel activation (ligand bias, conformational changes, and protein-protein interaction dynamics) that are intractable using either conventional fluorescent-based probes or patch-clamp techniques (21, 22).

## Materials and Methods

**Plasmids.** To generate the BRET constructs, mNeonGreen and nanoluciferase were used to improve the brightness of the assay and are referred to as mNeonG and nLuc for short in the rest of this paper. The mammalian expression vectors encoding mNeonG-TRPV1-nLuc, TRPV1-nLuc, and mNeonG-CaM were described in ref. 22.

Mammalian expression vectors for the expression of the nLuc-ion\_sensor-mNeonG or mNeonG-ion\_sensor-nLuc fusion proteins were constructed using cDNA bricks, obtained by gene synthesis (Genescript), that encode, respectively, nLuc or mNeonG (bricks 1.1, 1.3, 4.1, and 4.3), any ion sensor described in the text (Calflux, Kbp, or I3S, brick 1.2/4.2), and TRPV1 ion channel (bricks 2 and 3) as indicated in *SI Appendix, Fig. 7*. All bricks sequences are given in *Dataset S1*. hP2X DNA sequences were produced by gene synthesis and subcloned in pWPT EF1a. A *PmeI* site located at the C terminus of the P2X subunit was used to insert mNeonG-Calflux-nLuc or mNeonG-Kbp-nLuc in frame of the plasmids mentioned above.

Using the BsmB1 type IIS enzyme and T4 DNA ligase, the cDNA bricks were assembled in frame and in the right order into the pcDNA3.1(+)-Lac Z vector, which allowed direct visualization of the assembly efficiency using a colorimetric test based on alpha complementation (22). Briefly, a ligation mix containing 2  $\mu\text{L}$  of T4 DNA ligase buffer 10 $\times$ , 1 U of BsmBI enzyme, 1 U of T4 DNA ligase, 0.4 mM ATP, 4 mM dithiothreitol, 200 ng of the pcDNA3.1(+)-Lac Z vector, and 100 ng of bricks 1 through 4 was subjected to 35 cycles alternating two steps (step 1: 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min, step 2: 16  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min) before the enzymes were inactivated for 5 min at 55  $^{\circ}\text{C}$ . The ligation mix was then used to transform competent *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  by thermal shock.

**Reagents.** EGTA, olvanil, RTX, AMG517, AMG9810, BCTC, JNJ-17203212, and AMG21629 were all from Tocris. CAPS, CPZ, ATP, and Bz-ATP were from Sigma-Aldrich. Coelenterazine H (Nanolight Technology) was added to a final concentration of 5  $\mu\text{M}$ .

**Cell Culture and Transfections for BRET Assays.** HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Cat. No. D6429; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units  $\text{mL}^{-1}$  penicillin, and streptomycin.



All BRET assays were performed in 96-well plates. 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, *M*<sub>w</sub> 25,000; Cat. No. 23966 Polysciences) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as explained in Percherancier et al. (61). When BRET assays were performed using any ion BRET sensor N-terminally or C-terminally fused to either TRPV1 or P2X 2/4/5/7 (SI Appendix, Fig. 2), HEK293T cells were transfected with 0.025 μg of the corresponding expression vector and 2 μg of the empty pcDNA3.1(+)-vector. Alternatively, HEK293T cells were transfected with 0.1 μg of mNeonG-TRPV1-nLuc and 1.9 μg of empty pcDNA3.1(+)-vector, or 0.1 μg of TRPV1-nLuc expression vector and 1.9 μg of mNeonG-CaM expression vectors for intramolecular and intermolecular BRET assays, respectively, as described in ref. 22. Following overnight incubation, transfected cells were detached and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) w/o Red-phenol (Cat. No. 21063-029; Thermo Fisher Scientific) containing 10% fetal bovine serum and 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin and streptomycin before being seeded at 10<sup>5</sup> cells per well in 96-well white plates (Cat. No. 655083, Greiner Bio-One). Cells were left in culture for an additional 24 h before being processed for BRET assay.

**BRET Measurement in 96-Well Plates.** All BRET measurements were performed in Red-phenol-free cell culture medium, except for experiments described in Fig. 4, performed using an isotonic solution ("buffer with Ca<sup>2+</sup>"): 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, pH 7.4). When indicated, CaCl<sub>2</sub> was either replaced by 2 mM EGTA ("buffer with EGTA") or by 1 mM BaCl<sub>2</sub> ("buffer with Ba<sup>2+</sup>"), or NaCl was replaced by 145 mM NMDG. Following the addition of 5 μM coelenterazine H into the extracellular medium, bioluminescent signals were measured using a multidetector TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies) and emission filters centered at 515 ± 20 nm for mNeonG and 460 ± 20 nm for nLuc.

The BRET signal was determined by calculating the ratio of the emission intensity measured in the acceptor window (*I*<sub>mNeonG</sub>) over the emission intensity measured in the donor window (*I*<sub>nLuc</sub>), according to Eq. 1:

$$\text{BRET} = \frac{I_{m\text{NeonG}}}{I_{n\text{Luc}}} \quad [1]$$

Due to the overlapping emission spectra of nLuc and mNeonG, a fraction of the light detected in the mNeonG filter originates from the nLuc emission, resulting in a contaminating signal (62). In that configuration, the net BRET was therefore defined as the BRET ratio of cells coexpressing nLuc and mNeonG constructs minus the BRET ratio of cells expressing only the nLuc construct in the same experiment.

To assess the functionality of any ion channel BRET-based probes, coelenterazine H was added at the concentration of 5 μM and incubated 10 min before agonists and antagonists were injected. BRET signals were measured 5 min after the addition of the last compound. All experiments were performed at 37 °C and pH 7.4 unless otherwise indicated. In all experiments, dimethylsulfoxide (DMSO) alone was used as negative control (vehicle).

**BRET data processing and statistical analysis.** Concentration–response curves, kinetics, and statistics were analyzed using the software Prism 8.01 (GraphPad Software). Sigmoidal dose–response curves were fitted using Eq. 2:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{\log EC_{50} - X}} \quad [2]$$

where *X* is the logarithm of agonist concentration and *Y* is the response; bottom is the *Y* value at the bottom plateau; top is the *Y* value at the top plateau; and Log EC<sub>50</sub> is the *X* value when the response is halfway between bottom and top.

A *t* test corrected for multiple comparisons using the Holm–Sídák method was used to assess the statistical significance of the difference calculated between two sets of EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> values.

**Membrane Potential Assay Kits in Confocal Microscopy.** Transfected HEK293T cells plated in 96 well black plates with clear bottom (Cat. No. 655090, Greiner Bio-One) were used for real-time fluorescence imaging of the membrane potential. To prepare the membrane potential assay, the FLIPR Red Assay explorer-kit reagents were prepared according to the manufacturer's instructions (Molecular Device). On the day of the experiment, the culture medium was replaced with 50 μL of fresh DMEM (Sigma-Aldrich). Then, 50 μL

of red dye-loading buffer was added directly to each well and left for 30 min at 37 °C. Image acquisition was acquired using a Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope (image acquisition frequency 0.25 Hz, excitation wavelengths: 561 nm emission wavelengths: 605 nm). For each independent experiment, 20 fields were acquired.

**Manual Patch Clamp.** For whole-cell electrophysiological experiments assessing that the CAPS-induced whole-cell current was of similar magnitude in HEK293T cells expressing either YFP-TRPV1 or mNeonG-Caflux-nLuc-TRPV1 (Fig. 2B), the transiently transfected HEK293T cells were bathed in an extracellular medium containing 135 mM NaCl, 5 mM CsCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, and 10 mM Hepes, pH 7.4 adjusted with NaOH. The recording patch-clamp pipette was filled with artificial intracellular saline containing: 130 mM CsCl, 5 mM EGTA, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>ATP, and 5 mM Hepes (290 mOsm adjusted with mannitol and pH 7.2 adjusted with KOH).

For all other whole-cell electrophysiological experiments (SI Appendix, Figs. 4 and 6), the following extracellular media were used as indicated in the text:

- Buffer with Ca<sup>2+</sup>: 130 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM Hepes, 11 mM glucose and pH 7.4 adjusted with NaOH.
- Buffer with EGTA: 130 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM Hepes, 11 mM glucose and pH 7.4 adjusted with NaOH.
- Buffer with NMDG: 130 mM NMDG, 5.6 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM Hepes, 11 mM glucose and pH 7.4 adjusted with NaOH.
- Buffer with NMDG and EGTA: 130 mM NMDG, 5.6 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM Hepes, 11 mM glucose and pH 7.4 adjusted with NaOH.

In all these experiments, the intracellular medium was composed of 145 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM Hepes (pH 7.3 adjusted with KOH).

For all experiments, the osmolarity (measured with a cryo-osmometer type 15 Löser) of the external salt solution was adjusted to 300 mOsm with mannitol and pH adjusted as indicated.

Cells were viewed under phase contrast using a Nikon Diaphot inverted microscope. Borosilicate glass micropipettes (GC150F-10, Harvard Apparatus, Phymep) were pulled with a DMZ-Universal puller. The pipettes had a mean resistance of 4 MΩ when measured under standard recording conditions. An RK-400 patch-clamp amplifier (Biologic) was used for whole-cell recordings. Stimulus control, data acquisition, and processing were carried out on a PC fitted with a Digidata 1200 interface, using the pCLAMP 10.7 software (Molecular Devices). Current records were filtered using a Bessel filter at 1 kHz and digitized for storage and analysis. Recordings were performed in voltage-clamp and whole-cell configurations to measure global currents. After the seal, a resting potential of –65 mV was imposed, and 650-ms voltage ramps were applied every 10 s for 3 min. When indicated, after four ramps, capsaicin (10 μM) or EGTA (500 μM) was applied to the recorded cell by pressure ejection from a glass pipette located close to the cell. CAPS/EGTA-activated currents were determined by the difference between maximal induced current and average current before ejection.

**Automated Patch-Clamp Assay.** Automated patch-clamp assays were outsourced to SB Drug Discovery. Briefly, automated patch-clamp recordings were performed using the SyncroPatch 384PE (Nanion) and HEK293T cell line stably expressing human TRPV1 (SB Drug Discovery) that were plated 24 h before the experiment and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The voltage protocol generation and data collection were performed with the PatchController384 V1.6.6 and Data Controller V1.6.0.

The protocol consisted of two applications of external solution (control period) containing 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, and 5 mM glucose, at pH 7.4, followed by the addition of one application of the agonist capsaicin EC<sub>50</sub> (100 nM) for 1 to 2 min, followed by the addition of 10 μM of the test compound (1 to 2 min), in the presence of capsaicin EC<sub>50</sub>, and lastly the addition of the full block 10 μM capsazepine (1 min). The current was monitored using a ramp protocol from –100 mV to +100 mV over 300 ms, from a holding potential of –60 mV, which was repeated every 20 s. In each condition, the maximum DMSO concentration at the end of the run was 0.3%.

**Data, Materials, and Software Availability.** All study data are included in the article and/or supporting information.

**ACKNOWLEDGMENTS.** The research leading to these results received funding from 1) Aquitaine Science Transfert, the Technology Transfer Accelerator Office of New Aquitaine (France), 2) the French National Research Agency (ANR) under grant agreement ANR-19-CE44-0010-02 (the CANALBRET project), and 3) the New Aquitaine regional council under grant agreement AAPR2020I-2019-8140410 (The PHYSTRIG project). We thank Bernard Veyret for his wise advice and proof-reading of the manuscript.

1. L. Kiss, J. LoTurco, S. J. Korn, Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys. J.* **76**, 253-263 (1999).
2. J. G. Starkus, L. Kuschel, M. D. Rayner, S. H. Heinemann, Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J. Gen. Physiol.* **110**, 539-550 (1997).
3. F. C. Chatelain *et al.*, TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 5499-5504 (2012).
4. L. Ma, X. Zhang, H. Chen, TWIK-1 two-pore domain potassium channels change ion selectivity and conduct inward leak sodium currents in hypokalemia. *Sci. Signal.* **4**, ra37 (2011).
5. L. Ma, X. Zhang, M. Zhou, H. Chen, Acid-sensitive TWIK and TASK two-pore domain potassium channels change ion selectivity and become permeable to sodium in extracellular acidification. *J. Biol. Chem.* **287**, 37145-37153 (2012).
6. H. Chen, F. C. Chatelain, F. Lesage, Altered and dynamic ion selectivity of K<sup>+</sup> channels in cell development and excitability. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 461-469 (2014).
7. M.-K. Chung, A. D. Güler, M. J. Caterina, TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat. Neurosci.* **11**, 555-564 (2008).
8. C. H. Munns, M.-K. Chung, Y. E. Sanchez, L. M. Amzel, M. J. Caterina, Role of the outer pore domain in transient receptor potential vanilloid 1 dynamic permeability to large cations. *J. Biol. Chem.* **290**, 5707-5724 (2015).
9. L. Peverini, J. Beudez, K. Dunning, T. Chataigneau, T. Grutter, New insights into permeation of large cations through ATP-gated P2X receptors. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 265 (2018).
10. L. G. B. Ferreira, R. X. Faria, TRPV1 on the pore phenomenon: What do we know about transient receptor potential ion channel-related pore dilation up to now? *J. Bioenerg. Biomembr.* **48**, 1-12 (2016).
11. A. E. López-Romero *et al.*, TRP ion channels: Proteins with conformational flexibility. *Channels (Austin)* **13**, 207-226 (2019).
12. M. Li, G. E. S. Toombes, S. D. Silberberg, K. J. Swartz, Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **18**, 1577-1583 (2015).
13. D. S. K. Samways, E. Tomkiewicz, O. M. Langevin, M. Bukhari, Measurement of relative Ca<sup>2+</sup> permeability during sustained activation of TRPV1 receptors. *Phloggers Arch.* **468**, 201-211 (2016).
14. A. Garami *et al.*, Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J. Neurosci.* **30**, 1435-1440 (2010).
15. J. Yang *et al.*, Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca<sup>2+</sup> sensing. *Nat. Commun.* **7**, 13268 (2016).
16. H. Bischof *et al.*, Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in vivo. *Nat. Commun.* **8**, 1422 (2017).
17. B. Liu, B. Poolman, A. J. Boersma, Ionic strength sensing in living cells. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2510-2514 (2017).
18. N. R. Gavva *et al.*, Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**, 128-137 (2007).
19. N. R. Gavva *et al.*, Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* **136**, 202-210 (2008).
20. S. Bevan *et al.*, Capsazepine: A competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 544-552 (1992).
21. H. J. Ruigrok *et al.*, Full-spectral multiplexing of bioluminescence resonance energy transfer in three TRPV channels. *Biophys. J.* **112**, 87-98 (2017).
22. Y. Chappé *et al.*, High-throughput screening of TRPV1 ligands in the light of the bioluminescence resonance energy transfer technique. *Mol. Pharmacol.* **100**, 237-257 (2021).
23. M. J. Caterina *et al.*, The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824 (1997).
24. Y. Cui *et al.*, Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J. Gen. Physiol.* **139**, 273-283 (2012).
25. V. De-la-Rosa, G. E. Rangel-Yescas, E. Ladrón-de-Guevara, T. Rosenbaum, L. D. Islas, Coarse architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel determined by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **288**, 29506-29517 (2013).
26. B. Liu *et al.*, Design and properties of genetically encoded probes for sensing macromolecular crowding. *Biophys. J.* **112**, 1929-1939 (2017).
27. M. Tominaga, M. Wada, M. Masu, Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6951-6956 (2001).
28. W. Fischer, H. Franke, H. Gröger-Arndt, P. Illes, Evidence for the existence of P2Y<sub>1,2,4</sub> receptor subtypes in HEK-293 cells: Reactivation of P2Y<sub>1</sub> receptors after repetitive agonist application. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **371**, 466-472 (2005).
29. E. Cao, Structural mechanisms of transient receptor potential ion channels. *J. Gen. Physiol.* **152**, e201811998 (2020).
30. L. Vyklický, *et al.*, Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: A mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol. Res.* **57**, 10 (2008).
31. A. Jara-Oseguera, C. Bae, K. J. Swartz, An external sodium ion binding site controls allosteric gating in TRPV1 channels. *eLife* **5**, e13356 (2016).

Author affiliations: <sup>a</sup>Laboratory of Integration from Materials to System, CNRS UMR 5218, University of Bordeaux, Talence, F-33400 France; <sup>b</sup>Institute of Functional Genomics, CNRS, INSERM UMR 5203, University of Montpellier, Montpellier, F-34094 France; and <sup>c</sup>Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, University of Bordeaux, Pessac, F-33600 France

Author contributions: Y.L.C., T.D., J.-F.Q., V.C., and Y.P. designed research; Y.L.C., S.P., A.J., P.M., A.G., A.C., S.B., F.P.D.G., A.H., I.L., T.D., J.-F.Q., V.C., and Y.P. performed research; Y.L.C., S.P., A.J., P.M., A.G., T.D., J.-F.Q., V.C., and Y.P. contributed new reagents/analytic tools; Y.L.C., S.P., A.J., P.M., A.G., T.D., J.-F.Q., V.C., and Y.P. analyzed data; and Y.L.C., A.G., T.D., J.-F.Q., V.C., and Y.P. wrote the paper.




32. T. Ohta, T. Imagawa, S. Ito, Novel gating and sensitizing mechanism of capsaicin receptor (TRPV1): Tonic inhibitory regulation of extracellular sodium through the external protonation sites on TRPV1. *J. Biol. Chem.* **283**, 9377-9387 (2008).
33. J. Winter, A. Dray, J. N. Wood, J. C. Yeats, S. Bevan, Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: A potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* **520**, 131-140 (1990).
34. V. Ralevic, D. A. Kendall, J. C. Jerman, D. N. Middlemiss, D. Smart, Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **424**, 211-219 (2001).
35. B. R. Bianchi *et al.*, Modulation of human TRPV1 receptor activity by extracellular protons and host cell expression system. *Eur. J. Pharmacol.* **537**, 20-30 (2006).
36. N. R. Gavva *et al.*, The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci.* **27**, 3366-3374 (2007).
37. N. R. Gavva *et al.*, Gava 2005 J Pharmacol Exp Ther -AMG 9810 [(iE-i)-3-(4- it-i-Butylphenyl)-iN-i-(2,3-dihydrobenzo [ib-i] [1,4].pdf. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 474-484 (2005).
38. A. A. Ramahi and R. L. Ruff, in *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, ed. M. J. Aminoff and R. B. Daroff, Academic Press, Oxford, 2nd edn, 2014, pp. 1034-1035.
39. R. D. Kirkton, N. Bursac, Engineering biosynthetic excitable tissues from unexcitable cells for electrophysiological and cell therapy studies. *Nat. Commun.* **2**, 300 (2011).
40. S. J. Fountain, R. A. North, A C-terminal lysine that controls human P2X<sub>4</sub> receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **281**, 15044-15049 (2006).
41. L. E. Browne, V. Compan, L. Bragg, R. A. North, P2X<sub>7</sub> receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J. Neurosci.* **33**, 3557-3566 (2013).
42. G. Owsianik, K. Talavera, T. Voets, B. Nilius, Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 685-717 (2006).
43. C. García-Martínez, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J. M. Merino, A. Ferrer-Montiel, Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 32552-32558 (2000).
44. T. Voets *et al.*, Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J. Biol. Chem.* **277**, 33704-33710 (2002).
45. K. Zhang, D. Julius, Y. Cheng, Structural snapshots of TRPV1 reveal mechanism of polymodal functionality. *Cell* **184**, 5138-5150.e12 (2021).
46. E. Cao, M. Liao, Y. Cheng, D. Julius, TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* **504**, 113-118 (2013).
47. K. Mita *et al.*, Conductance selectivity of Na<sup>+</sup> across the K<sup>+</sup> channel via Na<sup>+</sup> trapped in a tortuous trajectory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2017168118 (2021).
48. J. S. Smith, R. J. Lefkowitz, S. Rajagopal, Biased signalling: From simple switches to allosteric microprocessors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 243-260 (2018).
49. L. Abdul Kadir, M. Stacey, R. Barrett-Jolley, Emerging roles of the membrane potential: Action beyond the action potential. *Front. Physiol.* **9**, 1661 (2018).
50. J. K. Bujak, D. Kosmala, I. M. Szopa, K. Majchrzak, P. Bednarczyk, Inflammation, cancer and immunity-implication of TRPV1 channel. *Front. Oncol.* **9**, 1087 (2019).
51. K. Zhai, A. Liskova, P. Kubatka, D. Büsselberg, Calcium entry through TRPV1: A potential target for the regulation of proliferation and apoptosis in cancerous and healthy cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4177 (2020).
52. K. S. Vrenken, K. Jalink, F. N. van Leeuwen, J. Middelbeek, Beyond ion-conduction: Channel-dependent and -independent roles of TRP channels during development and tissue homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1863** (6 Pt B), 1436-1446 (2016).
53. J. Carvalho, A bioelectric model of carcinogenesis, including propagation of cell membrane depolarization and reversal therapies. *Sci. Rep.* **11**, 13607 (2021).
54. A. Garami *et al.*, Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacol. Ther.* **208**, 107474 (2020).
55. G. P. Ahern, I. M. Brooks, R. L. Miyares, X. B. Wang, Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J. Neurosci.* **25**, 5109-5116 (2005).
56. T. M. Egan, B. S. Khakh, Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J. Neurosci.* **24**, 3413-3420 (2004).
57. A. Obergussberger, S. Friis, A. Brüggemann, N. Fertig, Automated patch clamp in drug discovery: Major breakthroughs and innovation in the last decade. *Expert Opin. Drug Discov.* **16**, 1-5 (2021).
58. H. B. Yu, M. Li, W. P. Wang, X. L. Wang, High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol. Sin.* **37**, 34-43 (2016).
59. C. Cordero-Sánchez, I. Mudarra-Fraguas, A. Fernández-Carvajal, "Fluorescence-based functional assays for Ca<sup>2+</sup>-permeable thermoTRP channels" in *TRP Channels, Methods in Molecular Biology*, A. Ferrer-Montiel, T. Hucho, Eds. (Springer New York, 2019), pp. 99-110.
60. J.-M. M. Chambard, E. Tagat, P. Boudeau, M. Partiseti, Transforming TRP channel drug discovery using medium-throughput electrophysiological assays. *J. Biomol. Screen.* **19**, 468-477 (2014).
61. Y. Percherancier *et al.*, Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* **280**, 9895-9903 (2005).
62. F. F. Hamdan, Y. Percherancier, B. Breton, M. Bouvier, Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr. Protoc. Neurosci.* **Chapter 5**, Unit 5.23 (2006).

# Article 4

**A Novel Reverberation Chamber for In Vitro  
Bioelectromagnetic Experiments at 3.5 GHz**



# A Novel Reverberation Chamber for In Vitro Bioelectromagnetic Experiments at 3.5 GHz

Rosa Orlacchio , Guillaume Andrieu , Senior Member, IEEE, Alexandre Joushomme, Lorenza Patrignoni, Annabelle Hurtier, Florence Poullétier De Gannes, Isabelle Lagroye, Yann Percherancier, Delia Arnaud-Cormos , and Philippe Leveque, Member, IEEE

**Abstract**—In this article, a mode-stirred reverberation chamber (RC) was designed and proposed for the first time as a cell culture incubator for in vitro electromagnetic waves exposure of adherent cells in tissue culture plates (TCPs). Typical cell incubators require specific conditions, such as temperature of 37 °C and humidity rate of 95%, which are challenging conditions for an RC. The chamber was characterized as an RC through an innovative experimental methodology based on the measurements of the  $S_{11}$  parameter of the emitting antenna. The proposed RC is adapted for in vitro bioelectromagnetic experiments for simultaneous exposure of up to 10 TCPs under highly homogeneous exposure conditions at 3.5 GHz, i.e., the mid-frequency band of the 5G telecommunication networks. Experimental results showed that the specific absorption rate (SAR) in the exposed samples extracted from temperature measurements was similar (an acceptable maximum variation lower than 30% was observed) in reason of the homogeneity and the uniformity of the field within the chamber. Specifically, measured SAR values were around 1.5 and 1 W/kg per 1 W incident, in 6-well or 96-well plates used for biological exposure, respectively. To validate our system, numerical simulations were performed. Overall, we showed that experimental and numerical SARs are in good agreement with differences <30% considering the standard deviation.

**Index Terms**—5G, cell culture incubator, in vitro exposure, mode stirrer, reverberation chamber (RC), specific absorption rate (SAR), well-stirred (WS) condition.

Manuscript received 22 March 2022; revised 27 July 2022; accepted 1 October 2022. This work was supported in part by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses under Grant 2019/2 RF/18 and Grant 2021/RF/024, in part by the Region Nouvelle-Aquitaine under Grant AAPR2020A-2019-8140010, and in part by the Institut Universitaire de France. (Corresponding author: Rosa Orlacchio.)

Rosa Orlacchio, Guillaume Andrieu, and Philippe Leveque are with the CNRS, XLIM, UMR, University of Limoges, 87000 Limoges, France (e-mail: rosa.orlacchio@unilim.fr; guillaume.andrieu@unilim.fr; philippe.leveque@unilim.fr).

Alexandre Joushomme, Annabelle Hurtier, Florence Poullétier De Gannes, and Yann Percherancier are with the CNRS, IMS, UMR, University of Bordeaux I, 33400 Talence, France (e-mail: alexandre.joushomme@u-bordeaux.fr; annabelle.hurtier@ims-bordeaux.fr; florence.poullétier@ims-bordeaux.fr; yann.percherancier@ims-bordeaux.fr).

Lorenza Patrignoni and Isabelle Lagroye are with the École Pratique des Hautes Études, PSL University, Paris, France, and also with the IMS Laboratory, UMR 5218, 33405 Talence, France (e-mail: lorenza.patrignoni@u-bordeaux.fr; isabelle.lagroye@ephe.psl.eu).

Delia Arnaud-Cormos is with the CNRS, XLIM, UMR, University of Limoges, 87000 Limoges, France, and also with the Institut Universitaire de France, 75005 Paris, France (e-mail: delia.arnaud-cormos@unilim.fr).

Color versions of one or more figures in this article are available at <https://doi.org/10.1109/TEMC.2022.3216045>.

Digital Object Identifier 10.1109/TEMC.2022.3216045

## I. INTRODUCTION

THE fifth generation of telecommunication technologies, i.e., the 5G, has been recently deployed to face the tremendous increase of mobile data traffic [1]. Numerous advantages are related to the use of 5G including faster data rates beyond several Gbit/s, low latency, more compact size of radiating structures, and lower interferences between devices [2]. The roll-out of 5G communication systems aims to improve the current mobile phone telecommunications in order to reach the ambitious project of an all-digital and hyper-connected society. The 5G technology will be indeed associated with the exponential growth of the Internet of Things including, for instance, virtual reality, driverless cars, smart homes and cities, and telemedicine [3], [4], [5].

In addition to the frequencies already used by existing generations of mobile telephony, three novel frequency bands will be exploited: the 700 MHz (694–790 MHz) and 3.5 GHz (3.4–3.8 GHz) bands and later on the 26 GHz band (24.25–27.5 GHz) [6]. Overall, such technological developments will impact general public exposure arising new questions about the safety and specific health effects of 5G. The majority of the already published studies, periodically reviewed over the last 30 years by international expert committees [7], [8], [9], [10], concern the potential effects induced by 0.8–2.3 GHz and Wi-Fi signals at 2.45 GHz or higher frequencies around the 26, 40, and 60 GHz bands [11], [12]. However, existing scientific literature concerning the 3.5 GHz frequency band is rather limited (a complete review can be found in [6]). Thus, reported data is not sufficient to assess any established health effect deriving from these exposure levels [6], [13].

From a physical point of view, the electromagnetic (EM) characteristics of biological tissues absorption at 3.5 GHz are similar to those at frequencies between 1 and 2.5 GHz. To determine possible differences in terms of induced effects between the abovementioned frequency bands, specific dosimetry studies and experimental evidence are required. To this end, new exposure setups able to precisely reproduce exposure conditions at 3.5 GHz must be designed.

Numerous exposure systems were developed over the years for bioelectromagnetic studies to assure reliable and reproducible exposure conditions for both *in vivo* and *in vitro* studies [14]. Reverberation chambers (RCs) emerged, among others, as



excellent instruments to enable long time samples exposures to a homogeneous EM field [15], [16], [17], [18].

RCs are electrically large enclosures with highly conductive walls, where a statistically homogeneous, randomly polarized, and isotropic field distribution is achieved by mechanical or frequency stirring [19]. RCs were first proposed by the pioneer works of A. Mendez [20], P. Corona [21], and the National Institute of Standards and Technology [22] to perform EM compatibility measurements. Nowadays, RCs are exploited by many applications for military activities [23], automobile industry [24], aeronautics [25], or the study of EM waves biological effects [26]. The possibility to use RCs for bioelectromagnetic applications was explored under the National Toxicology Program for the simultaneous exposure of more than 100 unrestrained rodents individually housed in plastic cages up to 24 h per day to Global System for Mobile Communications and Code-Division Multiple Access at 0.9 and 1.9 GHz [16], [26], [27]. Compared to other exposure systems, RCs allow performing long time exposure with unrestrained animals while maintaining a high level of overall exposure efficiency. Therefore, RCs found increasing interest among the bioelectromagnetic society for the development of *in vivo* exposure systems operating within the 0.9–2.45 GHz band [16], [17], [26], [28], [29], [30]. In addition, RCs feasibility was also proved at frequencies as high as 10 GHz [31] or 60 GHz [32], [33]. To the best of our knowledge, *in vitro* exposures in an RC were only explored in [17]. Authors exposed up to eight petri dishes to 0.9 GHz frequency signal in a customized chamber able to provide the desired cellular conditions. A heating device and an air fan (located above and below the exposed samples, respectively) were used to maintain the chamber at 37 °C while each dish was enclosed in a plexiglass box to control the desired level of CO<sub>2</sub> (5%). A low level of specific absorption rate (SAR) of the order of only few mW/kg was locally measured in the exposed dishes.

In this article, we propose a cell culture incubator converted into an RC adapted for the *in vitro* simultaneous exposure at 3.5 GHz of numerous tissue culture plates (TCPs) that is extremely convenient for biological investigations and allows high statistical power. 5G technology exposures can be achieved with this RC setup under a controlled atmosphere (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). The proposed chamber was validated through both EM and thermal measurements. The chamber was characterized in the 1–6 GHz frequency band using an innovative technique based on the measurements of the reflection coefficient of the emitting antenna. Then, SAR was experimentally and numerically quantified at 3.5 GHz in the exposed cell culture medium.

The article is organized as follows. The exposure system is presented in Section II and experimentally characterized in Section III. In Section IV, the numerical modeling of the exposure system is described, while in Section V experimental and numerical results in terms of SAR are presented and discussed in detail. Conclusions are drawn in Section VI.

## II. PRESENTATION OF THE EXPOSURE SYSTEM

The exposure system designed and characterized in this article is presented in Fig. 1. A BINDER CB 150 biological incubator (BINDER GmbH, Tullingen, Germany), with stainless steel walls

and inner dimensions of 0.5 × 0.5 × 0.6 m, was used as an RC to guarantee a controlled atmosphere (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) during exposure of cells.

As illustrated in the inset of Fig. 1, a homemade patch antenna matched ( $S_{11} < -10$  dB, input impedance oscillating around 50 Ω) over the 1–6 GHz frequency range was used to deliver a continuous (CW) signal at 3.5 GHz into the RC. The antenna is a printed patch antenna without ground on the opposite substrate plane whose behavior is assimilated to a wideband dipole. This patch-dipole antenna is fed through a microstrip transmission line. Note that, in our final configuration, the radiation pattern of the antenna is not directly oriented toward the exposed TCPs containing the biological medium. The antenna input was connected through an SMA cable to the signal generation unit located outside the incubator. The generation unit was composed of a radiofrequency (RF) signal generator (SMBV100A, Rohde & Schwarz, Munich) connected to a 45-dB gain, amplifier (mini-circuits, ZHL-16W-43+, NY, USA) followed by a high-power circulator (Pasternack, PE83CR1005, CA, USA), and a bidirectional coupler (mini-circuits, ZGBDC30-372HP+, NY, USA) connected to the antenna. Incident and reflected powers at the input of the antenna measured with two power sensors (Agilent N1921A, USA) were monitored with a power meter (Agilent N1912A, USA, accuracy ± 0.2 dB) connected to the bidirectional coupler.

As explained later, during SAR measurements, mechanical mode stirring process was used to continuously modify the boundary conditions of the whole system and therefore obtain an averaged homogeneous and isotropic EM field within the chamber [34]. A metallic stirrer composed of eight rectangular blades of 8 × 10 × 1 cm<sup>3</sup> was used (inset of Fig. 1). To allow continuous rotation of the stirrer during the exposure, a motorized precision rotation stage (PRM1/MZ8, Thorlabs Inc., Newton, NJ) driven via a K-Cube dc servo controller (KDC101, Thorlabs) was employed. Five plastic racks (209 × 172 × 62 mm<sup>3</sup>, Dutscher, France) were piled up to obtain a compact structure accommodating up to ten TCPs (two per level). A 3-cm diameter hole on the incubator side allows connecting the antenna to the bidirectional coupler and the motor stage to the motor controller located outside the incubator. To ensure statistical field uniformity and isotropy, the antenna, the stirrer, and the plastic support were set in the chamber at a distance from each other greater than  $\lambda/4$  and greater than  $\lambda/2$  from the incubator walls, with  $\lambda$  being the wavelength at 3.5 GHz (e.g., 8.5 cm) [35].

A water reservoir, filled with 300 ml of water, located at the bottom of the chamber allowed maintaining the desired level of humidity (95%). A metallic grid located above the reservoir sustained the patch antenna, the metallic stirrer with its rotation stage, and the plastic support hosting the TCPs during the exposure. A homemade software allowed to monitor different parameters including the input power, the duration of the exposure, and the stirrer rotation.

## III. CHARACTERIZATION OF THE EXPOSURE SYSTEM AS AN RC

The performances of the exposure system as an RC must be characterized before application for *in vitro* bioelectromagnetic

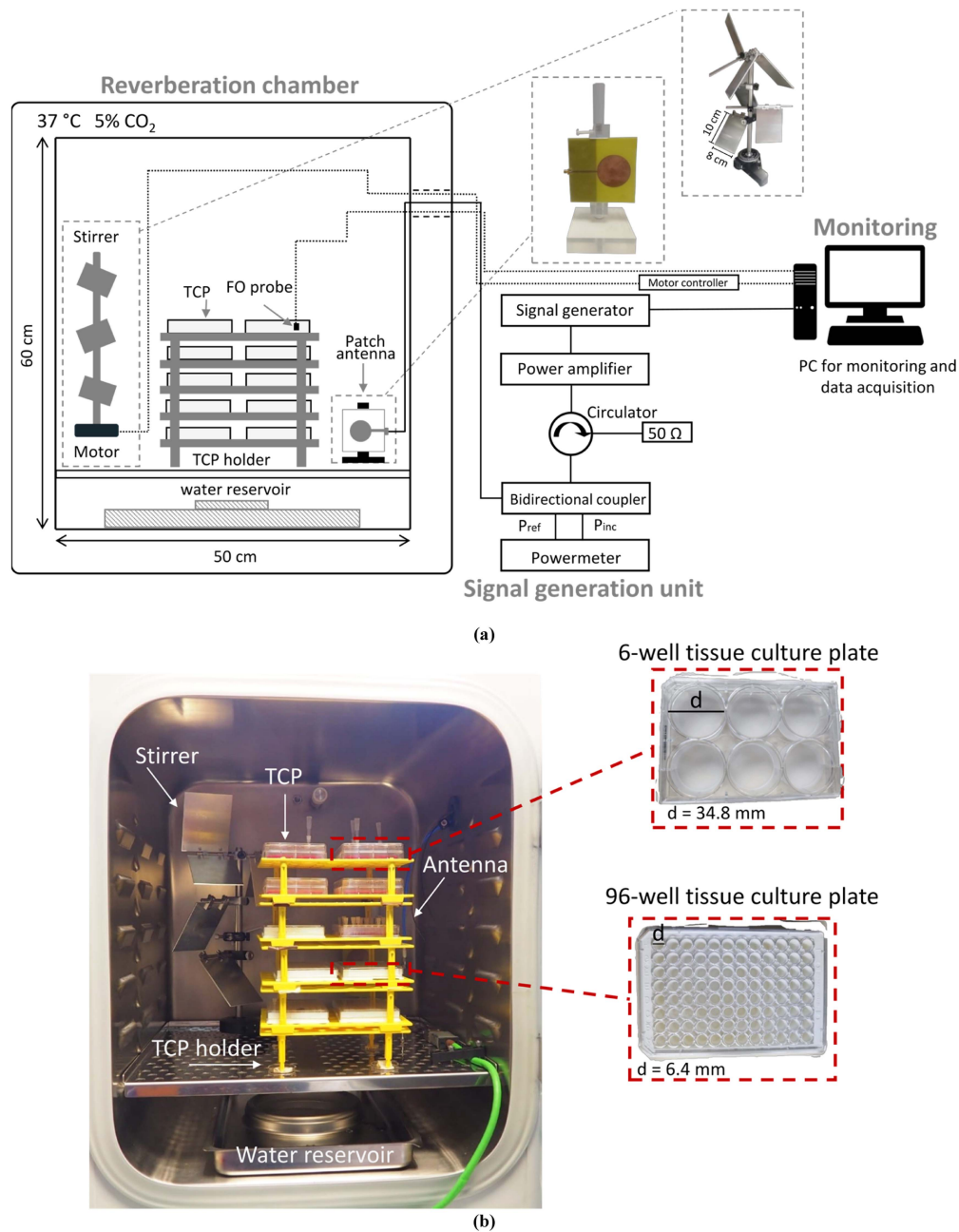


Fig. 1. (a) Schematic of the exposure system: (1) cell culture incubator converted into a reverberation chamber containing the patch antenna, the stirrer with its motor, the plastic holder hosting 10 tissue culture plates (TCPs), the fiber optic (FO) probe used for temperature measurements, and the water reservoir (on the left); (2) signal generation unit (center); (3) monitoring unit (on the right). Dimensions are not to scale. (b) Picture of the incubator containing the stirrer, the water reservoir, the antenna (on the back), and the holder of the TCPs. The insets on the right show a picture of a 6- (on the top) and 96- (on the bottom) well TCPs with diameter ( $d$ ) of 34.8 and 6.4 mm, respectively, used in this article.

experiments. To attain this objective, we have used the “well-stirred (WS) condition method” recently published [36], [37]. This method, briefly summarized hereafter, allows to determine the minimum operating frequency, defined as  $f_{wsc}$ , from which the chamber is considered “WS.” The exposure system was characterized from stepwise mode stirrer positions through measurements of the reflection coefficient, i.e., the  $S_{11}$  parameter of the emitting antenna.

#### A. Well-Stirred Condition Method

The WS condition method investigates the ability of the chamber to produce an EM field matching the characteristics of a “WS” (or ideal) RC. The complete definition of the WS method, given in [37], requires assessing, at a given frequency, the distribution of the EM field as well as the correlation of the collected samples. This is, respectively, carried out thanks to the

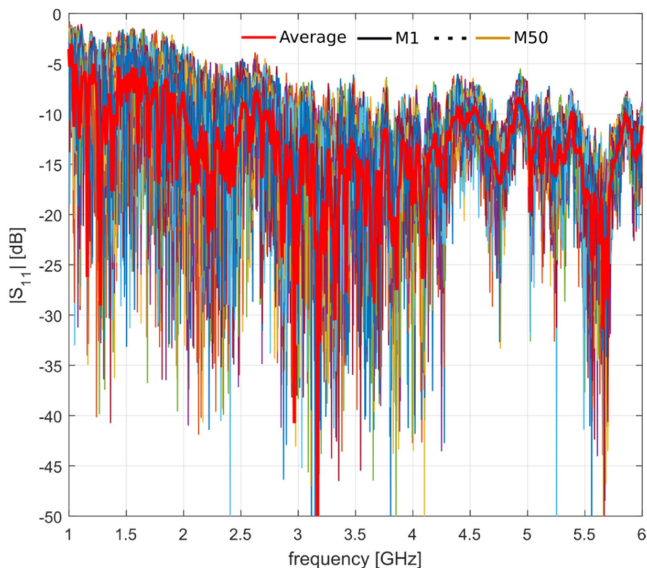


Fig. 2. Magnitude of the  $S_{11}$  parameter of the antenna for the unloaded configuration of the exposure system measured over 50 positions of the mode stirrer (step =  $7.2^\circ$ ). The red plot is the average value calculated over all the stirrer positions.

Anderson–Darling (AD) goodness-of-fit (GOF) test [38] and to the first-order autocorrelation coefficient  $r(1)$  [39]. These parameters are extracted from the stirred part of the  $S_{11}$  parameter of the emitting antenna installed in the RC, calculated for each stirrer position through the removal of the  $S_{11}$  vector average obtained for the different stirrer positions. A polynomial curve fitting allows the definition of two different frequencies:  $f_1$  related to the EM field distributions and  $f_2$  related to the EM sample correlation. These frequencies are obtained using theoretically justified threshold values when each criterion corresponding to a WS RC is assumed to be respected. To ensure that both criteria are matched, the maximum value between  $f_1$  and  $f_2$  is considered as the  $f_{wsc}$  frequency. In this article, the  $S_{11}$  parameter of the emitting antenna, shown in Fig. 2, was measured with a vector network analyzer. Measurements were performed for  $N$  equal to 50 equidistant positions of the mode stirrer, with  $7.2^\circ$  between two successive positions, over 1601 frequencies linearly spaced between 1 and 6 GHz. On the contrary, SAR measurements were performed with the stirrer continuously rotating during sample exposure at constant angular velocity of 10 degrees per second.

The influence of the TCPs number introduced in the exposure system on  $f_1$ ,  $f_2$ , and  $f_{wsc}$  was analyzed by progressively adding up to 10 TCPs to the “unloaded” configuration of the incubator, i.e., the incubator containing the metallic grid, the patch antenna, the stirrer and its motor stage, the reservoir with 300 ml of water, and the support without TCPs.

To satisfy biological requirements, two types of TCPs with 6- and 96-wells were used [inset of Fig. 1(b)]. To guarantee a typical biological environment during exposure, each well of the 6- and 96- TCPs was, respectively, filled with 2 ml and 200  $\mu$ l of cell culture medium (Dulbecco’s modified Eagle medium, Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA).

The chamber was progressively loaded with the following configurations:

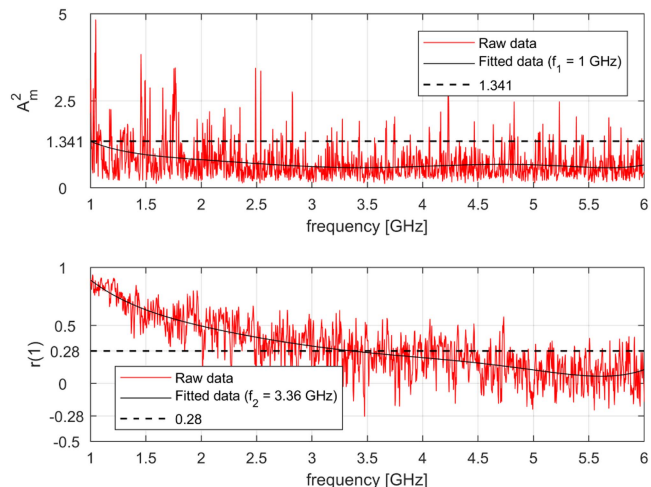


Fig. 3. Results related to the “well-stirred condition” method for the unloaded configuration of the exposure system. On the upper subplot, the corrected statistic  $A_m^2$  of the AD GOF test for each frequency, the sixth-order polynomial curve fit, as well as the value of  $f_1$  are presented. On the lower subplot, the first-order autocorrelation coefficient  $r(1)$  for each frequency, the sixth-order polynomial curve fit, as well as the value of  $f_2$  are presented.

TABLE I  
 $F_1$ ,  $F_2$ , AND  $F_{wsc}$  OF THE UNLOADED AND LOADED INCUBATOR WITH INCREASING NUMBER OF TISSUE CULTURE PLATES (TCPs)

Number of TCPs	Liquid volume (ml)	$f_1$ (GHz)	$f_2$ (GHz)	$f_{wsc}$ (GHz)
0 (unloaded)	0	< 1	3.36	3.36
2	24	< 1	3.62	3.62
4	48	1.09	3.82	3.82
6	86.4	1.06	4.22	4.22
8	124.8	1.08	4.3	4.3
10	163.2	1.15	4.5	4.5

- 1) 2 TCPs: two 6-well TCPs corresponding to 24 ml of cell culture medium.
- 2) 4 TCPs: four 6-well TCPs (48 ml).
- 3) 6 TCPs: four 6-well TCPs and two 96-well TCPs (86.4 ml).
- 4) 8 TCPs: four 6-well TCPs and four 96-well TCPs (124.8 ml).
- 5) 10 TCPs: four 6-well TCPs and six 96-well TCPs (163.2 ml).

Fig. 3 presents the results obtained for the unloaded configuration, while Table I contains  $f_1$ ,  $f_2$ , and  $f_{wsc}$  values for all the tested configurations. As observed,  $f_1$  is always around 1 GHz signifying that the ideal EM field distributions (i.e., the Rayleigh distribution for the  $S_{11}$  stirred samples) are matched above this frequency for all the configurations. The slight variation of  $f_1$  around 1 GHz, assumed not significant, is due to the sensitivity of the AD GOF test (see [36] and [37] for further details). Moreover, the insertion of the TCPs in the RC induces as expected an increase of  $f_2$ , i.e., an increase of the correlation between the mode stirrer positions. Indeed, the frequency  $f_{wsc}$  varies from 3.3 to 4.5 GHz depending on the number of inserted TCPs in the exposure system. The addition of TCPs contributes to the



decrease of the RC quality factor ( $Q$ -factor), which is known to increase the correlation of the measured samples.

It is worth noting that a value of  $f_{wsc}$  greater than 3.5 GHz (meaning that two successive mode stirrer positions are not perfectly uncorrelated at such frequency) still remains compliant, as shown later, with bioelectromagnetic exposures at this frequency. In particular, the fact that the ideal EM distributions of a WS RC are well respected for frequencies above 1 GHz in all configurations allows to be confident on the homogeneity of the SAR values obtained at any location of the wells within the cell culture incubator (and this is demonstrated later in Section V).

### B. Quality Factor

The composite  $Q$ -factor of an RC is used to describe the ability of the chamber to store energy or in other terms the amount of losses occurring in the RC. For the RC characterization process, establishing the  $Q$ -factor parameter is fundamental. The  $Q$ -factor is defined as the ratio between mean stored and transmitted energies in the chamber [40]

$$Q = \frac{\omega \varepsilon |E|^2 V}{P_t} \quad (1)$$

with  $\omega$  the angular frequency (rad/s),  $\varepsilon$  the permittivity (F/m),  $V$  the RC volume ( $\text{m}^3$ ),  $|E|$  the average total electric field strength (V/m), and  $P_t$  the antenna transmitted power (W).

The  $Q$ -factor can be experimentally estimated from the  $S_{11}$  measurement of an antenna [40]

$$Q = |S_{11} - S_{11}|^2 \frac{Z_0 \omega \varepsilon V}{\left(\frac{\lambda^2}{4\pi}\right) \left(1 - |S_{11}|^2\right)^2 \eta^2} \quad (2)$$

with  $\omega$  the angular frequency (rad/s),  $\varepsilon$  the permittivity (F/m),  $V$  the RC volume ( $\text{m}^3$ ),  $Z_0$  the wave impedance ( $\Omega$ ),  $\eta$  the antenna efficiency, and  $\lambda$  the wavelength (m). Note that the losses within the antenna are rather low and were therefore neglected and  $\eta$  was considered equal to 1.

The estimated  $Q$  obtained from  $S_{11}$  measurements over the whole frequency band considered in this article for three different loading configurations is reported in Fig. 4. As observed, the  $Q$ -factor even in the unloaded configuration is relatively low (lower than 1000). This is also consistent with the EM field distributions, which are verified above 1 GHz due to the excellent modal recovering [41] and also with the residual correlation observed at 3.5 GHz. As expected, the insertion of two TCPs results in a greater  $Q$ -factor ( $\sim 280$ ) compared to 10 TCPs ( $\sim 135$ ) around the frequency of 3.5 GHz (values averaged over a 40 MHz bandwidth).

In addition, the knowledge of  $Q$  allows predicting the average total electric field  $|E|$ , which can be obtained in the RC for a given transmitted power  $P_t$  [36]

$$|E| = \sqrt{\frac{QP_t}{\omega \varepsilon V}} \frac{15}{16} \sqrt{\frac{\pi}{3}}. \quad (3)$$

Therefore, for 13 W of incident power, the estimated  $E$ -field in the incubator at 3.5 GHz is between approximately 360 and 250 V/m when varying the load from 2 to 10 TCPs, respectively. To confirm the validity of the results and to correctly estimate the

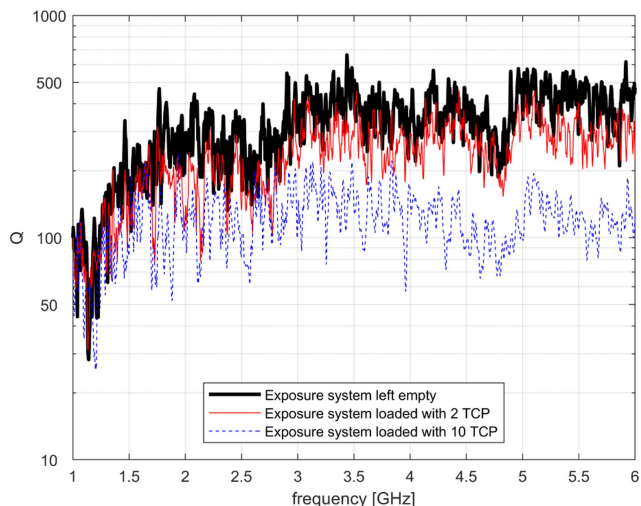


Fig. 4. Comparison of the average quality factor ( $Q$ ) of the exposure system calculated using (2) for 3 different configurations, including the unloaded incubator, or loaded with 2 and 10 tissue culture plates (TCPs).

SAR inside TCPs,  $E$ -field in the chamber was measured using a triaxial vector  $E$ -field probe (RadiSense). Measured values ( $243 \pm 48$  and  $190 \pm 35$  V/m, respectively for the incubator loaded with 2 and 10 TCPs) are within the same range of the  $E$ -field estimated values from  $S_{11}$ .

## IV. NUMERICAL SIMULATIONS

To complete and validate experimental dosimetry, numerical simulations were also performed using a three-dimensional finite difference time domain based EM method [42], [43], [44]. This allows the investigation of SAR values and homogeneity within the exposed samples.

Computer-aided design model of the exposure system is represented in Fig. 5. The cell culture incubator was modeled as a metallic box of  $0.5 \times 0.5 \times 0.6$  m corresponding to 150 L. All the elements inside the chamber were modeled, including the patch antenna, the stirrer, the water reservoir, and the plastic support accommodating 10 TCPs. All metallic elements, i.e., the stirrer, the incubator grid and walls, the reservoir, and the antenna microstrip elements, were modeled as perfect electric conductors. The patch antenna substrate, the TCPs, and the yellow rack holder were modeled with a relative permittivity of 4.3, 2.5, and 2.1, respectively. For the cell culture medium, a relative permittivity and a conductivity of 70 and 3.85 S/m (3.5 GHz, 37 °C) were used, respectively. These values were measured using a slim dielectric probe (85070E Dielectric probe kit, Agilent, USA).

Simulations were performed using a mesh with a cell size ranging from 0.5 mm in the culture medium with an adaptive mesh up to 2 mm. Boundary conditions were set by the metallic walls of the incubator as perfect electric conductors.

As in experiments, 50 simulations were performed to consider a complete rotation of the stirrer with  $7.2^\circ$  between 2 successive positions and averaged to obtain SAR values.

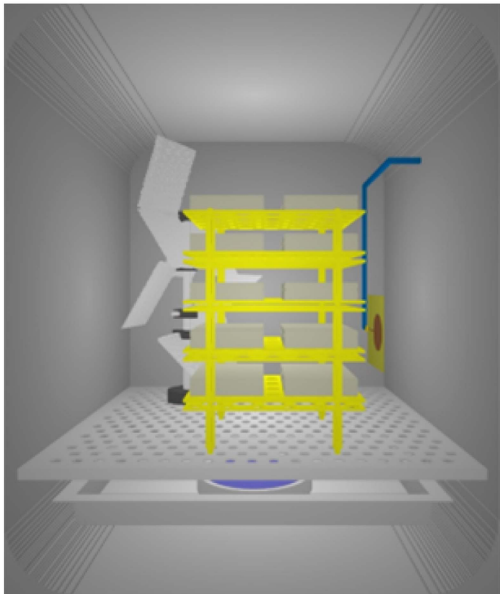


Fig. 5. Computer-aided design (CAD) model of the exposure system composed of a cell culture incubator, the metallic grid, the antenna, the stirrer, the water reservoir, and the plastic holder accommodating 10 tissue culture plates.

## V. RESULTS

In this section, experimental and numerical SAR values are presented and discussed.

### A. SAR Measurements Protocol

SAR is defined as the EM power dissipated per unit mass in the exposed sample and it represents the basic dosimetric parameter used to quantify the exposure levels at a given frequency. SAR can be obtained either from the measurement of the EM-induced heating or from electric field values in the medium [45]. Herein, temperature measurements during exposure were performed in cell culture medium (Dulbecco's modified eagle medium [Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA]) to retrieve local SAR values from the initial phase of the heating kinetics using the following equation:

$$\text{SAR} = C \left. \frac{\partial T}{\partial t} \right|_{t=t_0} \quad (4)$$

where  $C$  is the biological sample heat capacity [typically 4180 J/(kg·K) for cell culture medium] and  $\partial T/\partial t$  is the initial slope of the temperature curve when the effect of thermal convection on the exposed liquid is negligible [46].

A fiber-optic (FO) thermometer (Luxtron One, Lumasense Technologies, CA, USA) providing an accuracy of  $\pm 5\%$  was used in our experiments to acquire local temperature elevation within an estimated 1 mm<sup>3</sup> volume inside the exposed medium. The FO probe was completely immersed in the culture medium in a vertical position in contact with the bottom of the well, i.e., where adherent cells will be located during exposure. Samples were exposed during 144-s with the mode stirrer continuously rotating at a constant angular velocity of 10 degrees per second, i.e., four complete revolutions of the stirrer. Moreover, we have

performed measurements varying the speed of the stirrer and we did not observe significant variations on the temperature dynamics. Temperature measurements show a quasi-linear variation with a small increase (0.5 °C to 1.5 °C) thus limiting thermal convection phenomena occurrence. Measurements were performed under continuous wave signal at 3.5 GHz for an antenna input power of 13 W all along the exposure cycle and repeated at least  $n = 3$  times per each condition in order to assess repeatability.

### B. Results

1) *SAR Measurements Uncertainty*: SAR values fitted from the initial phase of the temperature dynamics highly depends on the curve noise of the acquisition system. In this article, induced temperature elevation was exponentially fitted along the whole exposure duration, i.e., 144 s from RF ON to RF OFF (Figs. 6, 8, and 9). However, only the slope at the origin was considered for SAR calculation using (4).

Fig. 6(a) shows three independent temperature measurements, i.e., temperature rise recorded at different moments in the center of the same well (point #1 of Fig. 7).  $\Delta T$  (°C) represents the temperature variation of the liquid with respect to the temperature before exposure, i.e., between RF ON and RF OFF in Figs. 6, 8, and 9. Temperature curves are highly reproducible at the same probe location and a 10% uncertainty on the local SAR is observed, mostly due to the noise of the acquired temperature rise.

2) *SAR Values in the 6-Well TCP*: Local SAR of the 6-well TCP (Fig. 7) was measured in the wells of the two TCPs (left and right positions) located on the top of the holder. In this case, measurements were performed with the chamber loaded under the requested conditions for biological experiments, i.e., 10 TCPs. Homogeneity of SAR within all the exposed wells was confirmed by measurements in several wells at different TCPs locations on the holder levels.

To assess SAR homogeneity, measurements were performed 1) in the center of each of the six wells of the TCP (points #1 of Fig. 7), and 2) in five positions within the same well (points from #1 to #5 in well number 4 of Fig. 7). Fig. 6(b) and (c), reporting the corresponding results, shows a high reproducibility of the measurements. SAR values extrapolated from the first phase of the heating kinetics in six different wells or in the same well are reported in Tables II and III, respectively ( $n = 3$  for each location).

Average local SARs in the center of the wells (points #1), obtained by pooling all recorded data of the plate in the six wells ( $n = 18$ , i.e., 3 measurements  $\times$  6 wells) for the left and right TCPs were  $1.49 \pm 0.17$  and  $1.42 \pm 0.11$  W/kg/ $P_{inc}$ , respectively.

Local SAR values measured in each well are reported in Table II. These results show high reproducibility at the same point and good homogeneity between the wells with a standard deviation within 15% suggesting that measurements are independent of the position within the chamber.

Global average SAR values of a single well with a diameter of 34.8 mm were obtained by pooling all recorded data in the same well at different locations ( $n = 15$ , 3 measurements

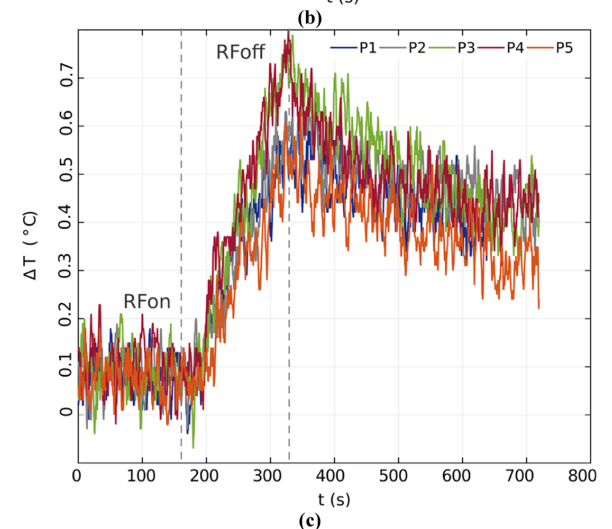
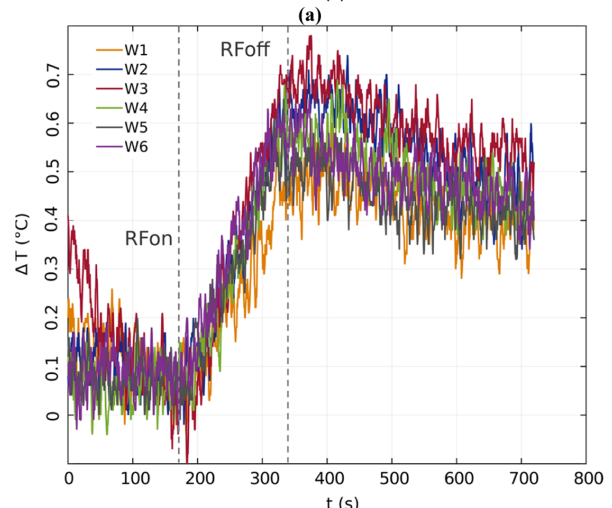
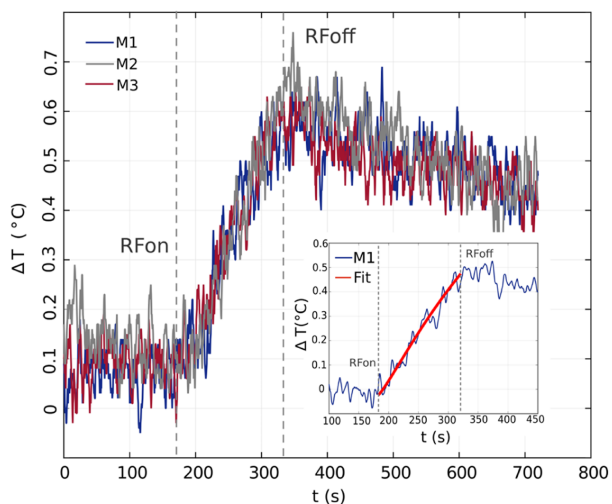


Fig. 6. Temperature elevation measured during exposure in 6-well tissue culture plates (TCPs) during 144-s of exposure at 13 W of incident power for the incubator loaded with 10 TCPs. Reproducibility is shown for measurements performed in (a) Point #1 of the same well ( $n = 3$ ), (b) Point #1 of six wells of a TCP, and (c) points from #1 to #5 of the same well. Inset in (a) shows an example of the fitting curve used to retrieve local SAR. Note that the customized code used to retrieve SAR allowed to optimize the fitting parameters to obtain linear or exponential curves. Grey dashed lines indicate the beginning (RFON) and the end (RFOFF) of the radiofrequency (RF) exposure. Location of points (#1 to #5) and wells is indicated in Fig. 7.

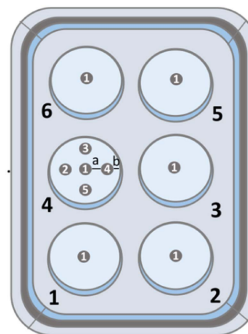


Fig. 7. Six-well tissue culture plate used for exposure. Temperature measurements were performed (i) in the center of each well at the location indicated by the number 1, and (ii) at different locations in well number 4 indicated by the numbers from 1 to 5. Distance of points 2 to 5 from point 1 (a) equals to  $\sim 1.5$  cm, while distance from the well edge (b) equals to  $\sim 2$  mm.

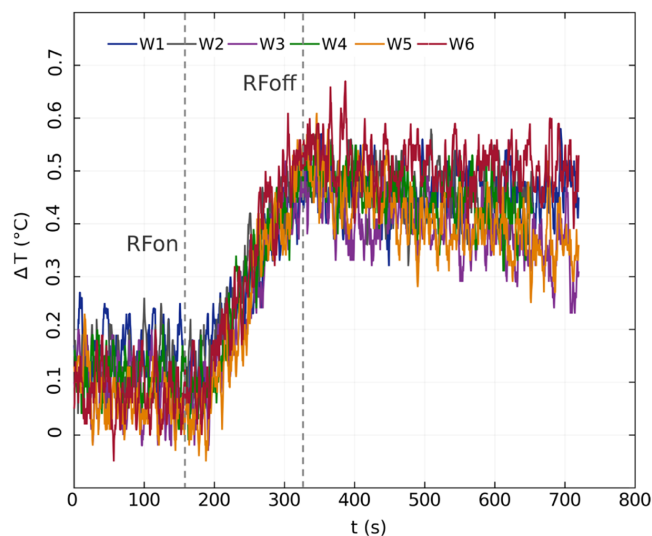


Fig. 8. Temperature elevation measured in six wells of a 96-well tissue culture plate during 144-s of exposure at 13 W of incident power for the incubator loaded with 10 TCPs. The grey dashed lines indicate the beginning (RFON) and the end (RFOFF) of the radiofrequency (RF) exposure.

TABLE II  
SPECIFIC ABSORPTION RATE (SAR) VALUES EXTRAPOLATED IN THE CENTER OF EACH WELL OF TWO SIX-WELL TISSUE CULTURE PLATES (LEFT AND RIGHT POSITIONS ON THE TOP OF THE HOLDER)

Well	Left	Right
	SAR (W/kg/ $P_{inc}$ )	
1	$1.47 \pm 0.35$	$1.55 \pm 0.06$
2	$1.34 \pm 0.47$	$1.47 \pm 0.15$
3	$1.47 \pm 0.31$	$1.23 \pm 0.27$
4	$1.36 \pm 0.14$	$1.37 \pm 0.12$
5	$1.75 \pm 0.28$	$1.61 \pm 0.28$
6	$1.62 \pm 0.29$	$1.27 \pm 0.14$

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).



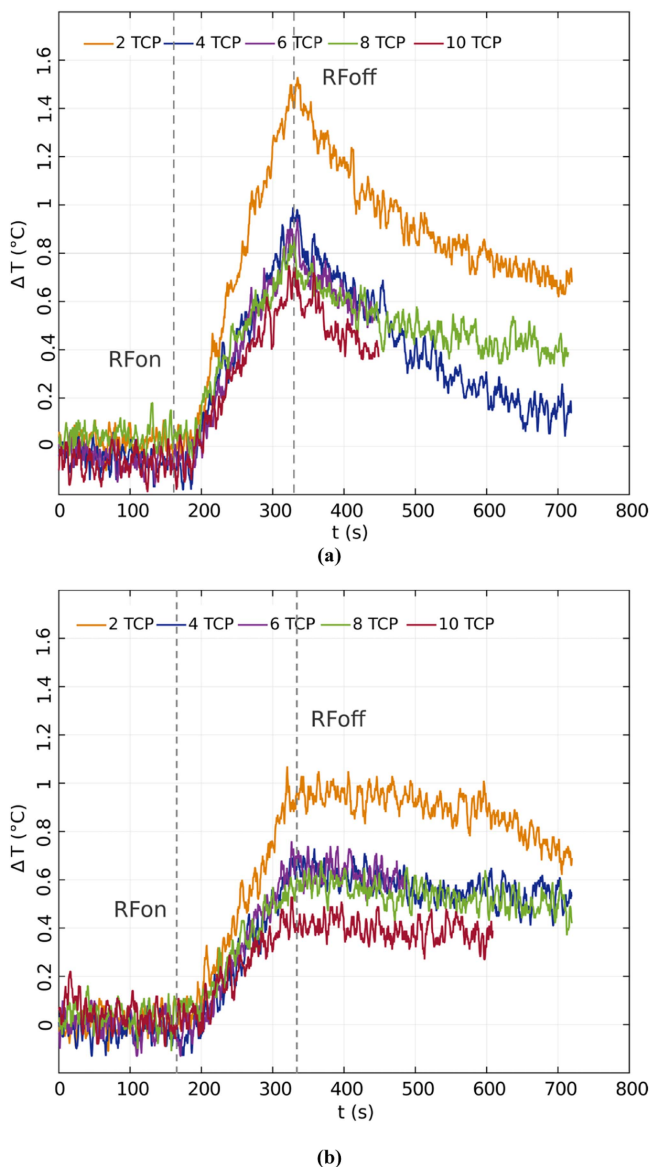


Fig. 9. Temperature elevation during 144 s of exposure at 13 W of incident power for different incubator loads from 2 to 10 tissue culture plates (TCPs) for (a) 6-well and (b) 96-well TCP. The grey dashed lines indicate the beginning (RFON) and the end (RFOFF) of the radiofrequency (RF) exposure.

TABLE III  
SPECIFIC ABSORPTION RATE (SAR) VALUES EXTRAPOLATED IN FIVE POINTS OF THE SAME WELL OF TWO SIX-WELL TISSUE CULTURE PLATES (LEFT AND RIGHT POSITIONS ON THE TOP OF THE HOLDER)

Position	Left	Right
	SAR (W/kg/ $P_{inc}$ )	
1	$1.36 \pm 0.14$	$1.37 \pm 0.12$
2	$1.03 \pm 0.26$	$1.22 \pm 0.12$
3	$1.86 \pm 0.09$	$1.74 \pm 0.21$
4	$1.87 \pm 0.01$	$2.06 \pm 0.05$
5	$1.71 \pm 0.17$	$1.7 \pm 0.09$

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).

TABLE IV  
SPECIFIC ABSORPTION RATE (SAR) VALUES AS A FUNCTION OF THE CHAMBER LOADING IN 6- AND 96-WELL TISSUE CULTURE PLATES (TCPs)

	Number of TCPs				
	2	4	6	8	10
	SAR (W/kg/ $P_{inc}$ )				
6-well	$2.91 \pm 0.05$	$2.13 \pm 0.54$	$2.14 \pm 0.17$	$1.93 \pm 0.06$	$1.8 \pm 0.31$
96-well	$2.56 \pm 0.06$	$1.62 \pm 0.19$	$1.75 \pm 0.07$	$1.24 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.07$

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).

$\times 5$  positions). The SAR values were  $1.56 \pm 0.36$  and  $1.61 \pm 0.33$  W/kg/ $P_{inc}$  for the well on the left and right side of the support, respectively. Maximal variation of SAR observed between the different positions considered in the well was within 30% (Table III). The larger variation of the results in this case corresponds also probably to the fact that the probe is not centered in the middle of the cell in positions #2 to #5. Note that the effect of the meniscus at the interface between the liquid and the plastic walls can significantly impact SAR distribution [47], [48]. However, this variation is compliant with values defined by international standards for EM waves exposures within the 300 MHz–300 GHz band [49].

3) *SAR Values in the 96-Well TCP*: SAR was also evaluated in 16 different wells of the 96-well TCPs located on the top left and right side of the support. An example of the temperature dynamics recorded is reported in Fig. 8. In this case, due to the small diameter of the well (6.4 mm), one probe location was measured per each well. SAR was equal to  $1.07 \pm 0.25$  and  $0.91 \pm 0.3$  W/kg/ $P_{inc}$  in the left and right plates, respectively ( $n = 16$ ). SAR values are also within a standard deviation of about 30%.

4) *SAR Values as a Function of the Incubator Loading*: Experimental SAR was retrieved in both 6- and 96-well TCPs as a function of the chamber loading ( $n = 3$  measurements per loading condition). Fig. 9 shows the temperature elevation induced in the center of one well of the exposed TCP (6- or 96-well) set on the top of the holder as a function of the incubator loading.

When two TCPs are used, temperature elevation and corresponding induced SAR are higher compared to the other loading conditions. Loading the chamber from 2 to 10 TCPs introduces a nonlinear SAR decrease of 38% and 57% for the 6- and 96-well TCPs, respectively (Table IV). This is due to the smaller liquid volume contained in the chamber loaded with two TCPs (SAR is defined as the power absorption per unit mass) thus higher  $Q$ -factor and  $E$ -field levels. Indeed, considering that SAR is proportional to  $|E|^2$  [45], an higher  $E$ -field implies an higher SAR.

5) *Numerical SAR Results*: Fig. 10 shows the SAR distribution normalized to 1 W incident power in both 6- and 96-well TCPs under the exposure conditions used for biological experiments. SAR values are represented over the surface of each well volume. They are obtained by averaging the results over the 50 stirrer positions, i.e., the same condition used for the chamber characterization (Section III). The 96-well shows

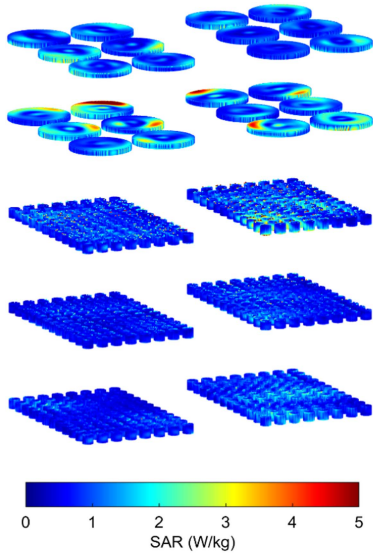


Fig. 10. Specific absorption rate (SAR) distributions normalized to 1 W incident power on the surface of 96- (first, second, and third floor) and 6- (fourth and fifth floor) well tissue culture plates.

TABLE V  
COMPUTED WHOLE VOLUME SPECIFIC ABSORPTION RATE (SAR) IN 6- AND 96-WELL TISSUE CULTURE PLATES (TCPs) FOR 1 W INCIDENT

	Left	Right
SAR (W/kg/P <sub>inc</sub> )		
Fifth floor/6-well plate	1.32±0.17	1.17±0.19
Fourth floor/6-well plate	1.74±0.67	1.48±0.32
Third floor/96-well plate	0.69±0.03	0.83±0.10
Second floor/96-well plate	0.51±0.01	0.52±0.05
First floor/96-well plate	0.52±0.03	0.81±0.10

Data are presented as mean over 50 positions ± standard deviation over each TCP.

higher SAR homogeneity compared to the 6-well. For both 6- and 96-well TCPs, Tables V and VI present SARs in the whole volume and the bottom layer, i.e., at the level of the cells. As observed in measurements, SAR values within the 96-well are lower compared to the 6-well TCPs, for the same incident power. Numerical SAR levels show a good homogeneity within the wells and overall, these results are in agreement with experimental local SAR measured at the bottom of the wells, with differences within the 30% considering the standard deviation. Indeed, measured average SAR values obtained in the 6-well (Table III) and 96-well (Section V) for 10 TCPs chamber loading were compared to numerical average SAR values obtained at the bottom layer (Table VI). The simulated SAR was obtained by averaging the four values of 6-well TCPs and six values of 96-well TCPs, respectively.

TABLE VI  
COMPUTED BOTTOM LAYER SPECIFIC ABSORPTION RATE (SAR) IN 6- AND 96-WELL TISSUE CULTURE PLATES (TCPs) FOR 1 W INCIDENT

	Left	Right
SAR (W/kg/P <sub>inc</sub> )		
Fifth floor/6-well plate	1.26±0.20	1.09±0.17
Fourth floor/6-well plate	1.37±0.53	1.29±0.26
Third floor/6-well plate	0.91±0.04	1.02±0.11
Second floor/6-well plate	0.69±0.03	0.65±0.08
First floor/6-well plate	0.62±0.05	0.98±0.11

Data are presented as mean over 50 positions ± standard deviation over each TCP.

The difference observed between numerical and experimental SAR values is possibly due to the numerical model used for simulation that despite its complexity, could not perfectly consider all the losses of the real chamber.

6) *Uncertainty Analysis Budget*: To validate the proposed exposure setup, a detailed uncertainty analysis was performed following the procedure described in [50]. The variations were evaluated considering the specific characteristics of the numerical and experimental setup and tools including datasheets, numerical modeling, measuring series, literature, etc. For the numerical uncertainty, we considered the variation of the model discretization, relative permittivity and conductivity of both TCPs and culture medium, and mechanical and electrical variations. For the experimental uncertainty, we considered the variations of the temperature and power measurements, location of the TCPs, volume, and dielectric properties of the culture medium. The expanded combined uncertainty for numerical and experimental dosimetry were assessed and found to be 1.9 dB, which is within the typical range compliant with ICNIRP guidelines [49].

## VI. CONCLUSION

In this article, we have designed and characterized the first cell culture incubator developed as an RC for in vitro exposure of multiple TCPs in the midband of the 5G telecommunication networks. The chamber is designed to host up to 10 TCPs under controlled conditions, 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, allowing homogeneous EM exposure within the same type of TCP up to 24 h. Mechanical stirring of the EM exposure emitted by a printed antenna was achieved with eight 8 × 10 cm<sup>2</sup> metallic blades mounted on a mast continuously rotating during exposure.

The RC was first experimentally characterized through measurements of the scattering parameter  $S_{11}$  of the antenna using a fast methodology. We showed that increasing the chamber loading increases the  $f_{wsc}$  which was equal to 3.36 and 4.5 GHz for the unloaded and loaded chamber with 10 TCPs, respectively. This is due to the increase of the correlation of the stirrer



positions. Consistently, the experimental  $Q$ -factor assessed at 3.5 GHz decreases due to losses in the chamber from values of approximately 316 to 135, when the incubator was unloaded or loaded with 10 TCPs, respectively.

SAR values were then first assessed through measurements of the EM-induced temperature elevation in the samples exposed to 3.5 GHz. Mean SAR levels in the 6- and 96-well TCPs were around 1.5 and 1 W/kg per watt antenna input power, respectively. For biological investigations, the incident power will be adjusted, from the normalized SAR per 1 W incident power, to deliver SAR and  $E$ -field values compliant with normative references values [49]. These SAR values were obtained when the chamber was loaded with 10 TCPs and they were independent of the wells position in the chamber. Moreover, during exposure, the EM fields' components were continuously stirred resulting in the achievement of SAR homogeneity with maximal variations lower than 30%. All the results presented in the article prove the relevance of our approach aiming to convert a cell culture incubator into an RC. Despite the relative low  $Q$ -factor of the facility, the obtained results show a remarkable homogeneity of the results as a function of the position of the wells within the enclosure. This homogeneity is assumed to be related to the characteristics of the RC really close to be perfectly WS at the frequency of 3.5 GHz. Experimental results were validated through numerical simulations that confirmed a good level of SAR homogeneity within the 30% in both 6- and 96-well TCPs. Therefore, the exposure system reported in this article leads the way toward the study at cellular and molecular levels of 3.5 GHz 5G exposures. In addition, the chamber can be also suitable for experiments at higher frequencies. Indeed, as the frequency increases samples correlation decreases. However, SAR measurements and numerical simulations must be performed at each higher specific working frequency to characterize the exposure.

## REFERENCES

- [1] J. Navarro-Ortiz, P. Romero-Diaz, S. Sendra, P. Ameigeiras, J. J. Ramos-Munoz, and J. M. Lopez-Soler, "A survey on 5G usage scenarios and traffic models," *IEEE Commun. Surv. Tut.*, vol. 22, no. 2, pp. 905–929, Secondquarter 2020, doi: [10.1109/COMST.2020.2971781](https://doi.org/10.1109/COMST.2020.2971781).
- [2] S. Kumar, A. S. Dixit, R. R. Malekar, H. D. Raut, and L. K. Shevada, "Fifth generation antennas: A comprehensive review of design and performance enhancement techniques," *IEEE Access*, vol. 8, pp. 163568–163593, 2020, doi: [10.1109/ACCESS.2020.3020952](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.3020952).
- [3] J. Wang, M. K. Lim, C. Wang, and M.-L. Tseng, "The evolution of the internet of things (IoT) over the past 20 years," *Comput. Ind. Eng.*, vol. 155, May 2021, Art. no. 107174, doi: [10.1016/j.cie.2021.107174](https://doi.org/10.1016/j.cie.2021.107174).
- [4] S. Li, L. D. Xu, and S. Zhao, "5G internet of things: A survey," *J. Ind. Inf. Integr.*, vol. 10, pp. 1–9, Jun. 2018, doi: [10.1016/j.jii.2018.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jii.2018.01.005).
- [5] K. Shafique, B. A. Khawaja, F. Sabir, S. Qazi, and M. Mustaqim, "Internet of things (IoT) for next-generation smart systems: A review of current challenges, future trends and prospects for emerging 5G-IoT scenarios," *IEEE Access*, vol. 8, pp. 23022–23040, 2020, doi: [10.1109/ACCESS.2020.2970118](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.2970118).
- [6] "Expositions aux champs électromagnétiques liées au déploiement de la technologie de communication « 5G » et effets sanitaires éventuels associés," ANSES—Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Apr. 2021.
- [7] Swedish Radiation Safety Authority, "2020:04 recent research on EMF and health risk," in *Proc. 14th Rep. SSM's Sci. Council Electromagn. Fields*, Apr. 2020, pp. 1–72.
- [8] Swedish Radiation Safety Authority, "2019:08 recent research on EMF and health risk," in *Proc. 13th Rep. SSM's Sci. Council Electromagn. Fields*, 2018, pp. 1–94.
- [9] "Expositions aux téléphones mobiles portés près du corps," ANSES—Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2019.
- [10] "Opinion on potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF)," SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), Jan. 2015.
- [11] M. Simkó and M.-O. Mattsson, "5G wireless communication and health effects—A pragmatic review based on available studies regarding 6 to 100 GHz," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 16, no. 18, Sep. 2019, Art. no. 3406, doi: [10.3390/ijerph16183406](https://doi.org/10.3390/ijerph16183406).
- [12] Y. Le Drean et al., "State of knowledge on biological effects at 40–60 GHz [Le point sur les effets biologiques à 40–60 GHz]," *Comptes Rendus Physique*, vol. 14, no. 5, pp. 402–411, May 2013, doi: [10.1016/j.cry.2013.02.005](https://doi.org/10.1016/j.cry.2013.02.005).
- [13] A. Di Ciaula, "Towards 5G communication systems: Are there health implications?," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 221, no. 3, pp. 367–375, Apr. 2018, doi: [10.1016/j.ijheh.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.01.011).
- [14] J. W. Hansen et al., "A systematic review of in vitro and in vivo radio frequency exposure methods," *IEEE Rev. Biomed. Eng.*, vol. 13, pp. 340–351, 2020, doi: [10.1109/RBME.2019.2912023](https://doi.org/10.1109/RBME.2019.2912023).
- [15] K. B. Jung et al., "Development and validation of reverberation-chamber type whole-body exposure system for mobile-phone frequency," *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 73–82, 2008, doi: [10.1080/15368370701878895](https://doi.org/10.1080/15368370701878895).
- [16] M. H. Capstick et al., "A radio frequency radiation exposure system for rodents based on reverberation chambers," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 59, no. 4, pp. 1041–1052, Aug. 2017.
- [17] S. Lalléchère, S. Girard, D. Roux, P. Bonnet, F. Paladian, and A. Vian, "Mode stirred reverberation chamber (MSRC): A large and efficient tool to lead high frequency bioelectromagnetic in vitro experimentation," *Prog. Electromagn. Res. B*, vol. 26, pp. 257–290, 2010.
- [18] J. Chakarothai, J. Wang, O. Fujiwara, K. Wake, and S. Watanabe, "Dosimetry of a reverberation chamber for whole-body exposure of small animals," *IEEE Trans. Microw. Theory Techn.*, vol. 61, no. 9, pp. 3435–3445, Sep. 2013, doi: [10.1109/TMTT.2013.2273761](https://doi.org/10.1109/TMTT.2013.2273761).
- [19] D. A. Hill, "Electromagnetic theory of reverberation chambers," Nat. Inst. Standards Technol., Gaithersburg, MD, USA, no. 1506, Dec. 1, 1998. [Online]. Available: [https://tsapps.nist.gov/publication/get\\_pdf.cfm?pub\\_id=24427](https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=24427)
- [20] H. A. Mendez, "A new approach to electromagnetic field-strength measurements in shielded enclosures," Wescon Tech. Papers, Los Angeles, CA, USA, pp. 617–655, Aug. 1968.
- [21] P. Corona, G. Latmiral, E. Paolini, and L. Piccioli, "Use of a reverberating enclosure for measurements of radiated power in the microwave range," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. EMC-18, no. 2, pp. 54–59, May 1976, doi: [10.1109/TEMC.1976.303466](https://doi.org/10.1109/TEMC.1976.303466).
- [22] M. L. Crawford and G. H. Koepke, "Design, evaluation and use of a reverberation chamber for performing electromagnetic susceptibility/vulnerability measurements," UNT Digital Library, Apr. 1986. Accessed: Oct. 27, 2022. [Online]. Available: <https://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc502595/>
- [23] C. Choeysakul, F. Schlagenhauser, P. Rattanakreep, and P. Hall, "EMC applications for military: Reverberation chamber tests," in *Proc. 20th Asia-Pacific Conf. Commun.*, 2014, pp. 434–437, doi: [10.1109/APCC.2014.7092851](https://doi.org/10.1109/APCC.2014.7092851).
- [24] Q. Xu, X. Shen, K. Chen, Y. Zhao, and Y. Huang, "Absorption cross section measurement of a vehicle in reverberation chamber for quick estimation of field strength," *IEEE Electromagn. Compat. Mag.*, vol. 8, no. 4, pp. 44–49, 4th Quarter 2019, doi: [10.1109/MEMC.2019.8985598](https://doi.org/10.1109/MEMC.2019.8985598).
- [25] D. M. Johnson, M. B. Slocum, and D. Hoskins, "High-power radiated susceptibility testing of rescue hoist systems in reverberation chambers," in *Proc. 19th Digit. Avionics Syst. Conf.*, 2000, pp. 3B2/1–3B2/8, doi: [10.1109/DASC.2000.886923](https://doi.org/10.1109/DASC.2000.886923).
- [26] Y. Gong et al., "Life-time dosimetric assessment for mice and rats exposed in reverberation chambers for the two-year NTP cancer bioassay study on cellphone radiation," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 59, no. 6, pp. 1798–1808, Dec. 2017, doi: [10.1109/TEMC.2017.2665039](https://doi.org/10.1109/TEMC.2017.2665039).
- [27] National Toxicology Program, "NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies in B6C3F1/N mice exposed to whole-body radio frequency radiation at a frequency (1900 MHz) and modulations (GSM and CDMA) used by cell phones," *Nat. Toxicol. Prog. Tech. Rep. Ser.*, vol. 596, pp. 1–70, Nov. 2018, doi: [10.22427/NTP-TR-596](https://doi.org/10.22427/NTP-TR-596).
- [28] T. Wu, A. Hadjem, M.-F. Wong, A. Gati, O. Picon, and J. Wiart, "Whole-body new-born and young rats\text quote single exposure assessment in a reverberating chamber operating at 2.4 GHz," *Phys. Med. Biol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1619–1630, Feb. 2010, doi: [10.1088/0031-9155/55/6/006](https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/6/006).

- [29] P. F. Biagi et al., "A reverberation chamber to investigate the possible effects of "in vivo" exposure of rats to 1.8 GHz electromagnetic fields: A preliminary study," *Prog. Electromagn. Res.*, vol. 94, pp. 133–152, 2009, doi: [10.2528/PIER09061006](https://doi.org/10.2528/PIER09061006).
- [30] S. Jeon et al., "Field uniformity assessment of a reverberation chamber for a large-scale animal study," *IEEE Access*, vol. 9, pp. 146471–146477, 2021.
- [31] J. Shi, J. Chakarothai, J. Wang, O. Fujiwara, K. Wake, and S. Watanabe, "Improvement of SAR accuracy by combining two SAR quantification methods for small animals in reverberation chamber above 10 GHz," *IEEE Access*, vol. 8, pp. 138170–138178, 2020.
- [32] A. K. Fall, P. Besnier, C. Lemoine, M. Zhadobov, and R. Sauleau, "Design and experimental validation of a mode-stirred reverberation chamber at millimeter waves," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 57, no. 1, pp. 12–21, Feb. 2015, doi: [10.1109/TEMC.2014.2356712](https://doi.org/10.1109/TEMC.2014.2356712).
- [33] A. K. Fall, C. Lemoine, P. Besnier, R. Sauleau, Y. L. Dréan, and M. Zhadobov, "Exposure assessment in millimeter-wave reverberation chamber using murine phantoms," *Bioelectromagnetics*, vol. 41, no. 2, pp. 121–135, 2020.
- [34] R. Serra et al., "Reverberation chambers a la carte: An overview of the different mode-stirring techniques," *IEEE Electromagn. Compat. Mag.*, vol. 6, no. 1, pp. 63–78, First Quarter 2017, doi: [10.1109/EMEC.2017.7931986](https://doi.org/10.1109/EMEC.2017.7931986).
- [35] D. A. Hill, "Boundary fields in reverberation chambers," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 47, no. 2, pp. 281–290, May 2005, doi: [10.1109/TEMC.2005.847370](https://doi.org/10.1109/TEMC.2005.847370).
- [36] G. Andrieu and N. Ticaud, "Performance of reverberation chambers using the using the 'well-stirred' condition method," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 62, no. 1, pp. 3–15, Feb. 2020.
- [37] G. Andrieu, N. Ticaud, F. Lescoat, and L. Trougnou, "Fast and accurate assessment of the 'well stirred condition' of a reverberation chamber from  $S_{11}$  measurements," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 61, no. 4, pp. 974–982, Aug. 2019, doi: [10.1109/TEMC.2018.2847727](https://doi.org/10.1109/TEMC.2018.2847727).
- [38] C. Lemoine, P. Besnier, and M. Drissi, "Investigation of reverberation chamber measurements through high-power goodness-of-fit tests," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 49, no. 4, pp. 745–755, Nov. 2007, doi: [10.1109/TEMC.2007.908290](https://doi.org/10.1109/TEMC.2007.908290).
- [39] O. Lunden and M. Backstrom, "Stirrer efficiency in FOA reverberation chambers. Evaluation of correlation coefficients and chi-squared tests," in *Proc. IEEE Int. Symp. Electromagn. Compat. Symp. Rec.*, 2000, pp. 11–16, doi: [10.1109/ISEMC.2000.875529](https://doi.org/10.1109/ISEMC.2000.875529).
- [40] P. Besnier, C. Lemoine, and J. Sol, "Various estimations of composite Q-factor with antennas in a reverberation chamber," in *Proc. IEEE Int. Symp. Electromagn. Compat.*, 2015, pp. 1223–1227, doi: [10.1109/ISEMC.2015.7256344](https://doi.org/10.1109/ISEMC.2015.7256344).
- [41] A. Adardour, G. Andrieu, and A. Reineix, "On the low-frequency optimization of reverberation chambers," *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, vol. 56, no. 2, pp. 266–275, Apr. 2014, doi: [10.1109/TEMC.2013.2288001](https://doi.org/10.1109/TEMC.2013.2288001).
- [42] R. Orlacchio, L. Carr, C. Palego, D. Arnaud-Cormos, and P. Leveque, "High-voltage 10 ns delayed paired or bipolar pulses for in vitro bioelectric experiments," *Bioelectrochemistry*, vol. 137, Feb. 2021, Art. no. 107648.
- [43] P. Leveque, A. Reineix, and B. Jecko, "Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas: Application of FDTD method," *Electron. Lett.*, vol. 28, no. 6, pp. 539–541, Mar. 1992.
- [44] M. Á. García-Fernández et al., "Dosimetric characteristics of an EMF delivery system based on a real-time impedance measurement device," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 63, no. 11, pp. 2317–2325, Nov. 2016, doi: [10.1109/TBME.2016.2527927](https://doi.org/10.1109/TBME.2016.2527927).
- [45] *IEEE Recommended Practice for Determining the Peak Spatial-Average Specific Absorption Rate (SAR) in the Human Head From Wireless Communications Devices: Measurement Techniques*, IEEE Std 1528-2013 (Revision of IEEE Std 1528-2003), Sep. 2013, pp. 1–246.
- [46] R. Orlacchio et al., "Millimeter-wave heating in in vitro studies: Effect of convection in continuous and pulse-modulated regimes," *Bioelectromagnetics*, vol. 40, no. 8, pp. 553–568, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/bem.22223>.
- [47] J. Schuderer and N. Kuster, "Effect of the meniscus at the solid/liquid interface on the SAR distribution in petri dishes and flasks," *Bioelectromagnetics*, vol. 24, no. 2, pp. 103–108, Feb. 2003, doi: [10.1002/bem.10066](https://doi.org/10.1002/bem.10066).
- [48] A. W. Guy, C. K. Chou, and J. A. McDougall, "A quarter century of in vitro research: A new look at exposure methods," *Bioelectromagnetics*, vol. 20, no. S4, pp. 21–39, 1999, doi: [10.1002/\(sici\)1521-186x\(1999\)20:4+<21::aid-bem5>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-186x(1999)20:4+<21::aid-bem5>3.0.co;2-m).
- [49] ICNIRP, "Guidelines for limiting exposure to electromagnetic fields (100 kHz to 300 GHz)," *Health Phys.*, vol. 118, no. 5, pp. 483–524, May 2020, doi: [10.1097/HP.0000000000001210](https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001210).
- [50] N. Kuster, V. B. Torres, N. Nikoloski, M. Frauscher, and W. Kainz, "Methodology of detailed dosimetry and treatment of uncertainty and variations for in vivo studies," *Bioelectromagnetics*, vol. 27, no. 5, pp. 378–391, 2006, doi: [10.1002/bem.20219](https://doi.org/10.1002/bem.20219).



**Rosa Orlacchio** was born in Sapri, Italy. She received the M.Sc. degree in biomedical engineering (Hons.) from the "La Sapienza," University of Rome, Rome, Italy, in 2014, and the Ph.D. degree in bioelectromagnetics from the Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes, University of Rennes 1, Rennes, France, in 2019.

She is currently a Postdoctoral Researcher with the BioEM Team, XLIM Research Institute, CNRS, University of Limoges, Limoges, France. Her research interests include the evaluation of the biological effects

of nanosecond electric pulses on cells, and thermal electromagnetic dosimetry and microdosimetry.



**Guillaume Andrieu** (Senior Member, IEEE) was born in Limoges, France, in 1980. He received the master's degree in radiofrequencies and optical communications from the University of Limoges, Limoges, France, in 2003, and the Ph.D. degree in electronics from the IEMN Laboratory, Telice Group, University of Lille, Villeneuve d'Ascq, France, in 2006.

In 2003, he joined the Renault Technocentre, Guyancourt, France. In 2006, he joined the XLIM Laboratory, University of Limoges, as a Postdoctoral

Fellow, where he has been an Associate Professor since 2009. His current research interests include coupling on cables and electromagnetic compatibility testing, including reverberation chambers and bulk current injection tests.

**Alexandre Joushomme** received the master's degree in biochemistry and molecular biology from the University of Bordeaux, Bordeaux, France, in 2019. He is currently working toward the Ph.D. degree in biochemistry with the IMS Laboratory (Integration from Material to Systems), University of Bordeaux.

After obtaining the master's degree, he chose to carry out his thesis with the IMS Laboratory. He designs BRET probes allowing the study of the molecular mechanisms of cells in real time. Thanks to this technique, he is looking for nonthermal effects of RF EMF on the structural and functional modulation of proteins. He also uses techniques such as impedancemetry and holomicroscopy to study the impact of RF EMF on cell development and death or on the response of proteins and metabolic pathways to pharmacological compounds.



**Lorenza Patrignoni** was born in Tolentino, Italy, in 1990. She received the master's degree in chemistry and technology of drugs from the University of Perugia, Perugia, Italy, in 2015. She is currently working toward the Ph.D. degree with the Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France, in collaboration with the IMS Laboratory of Bordeaux, where she is engaged in the study of biological effects of radiofrequency on human cells.



**Annabelle Hurtier** received the BTEC Higher National Diploma in biotechnology, in Bordeaux, France, in 2005.

She is currently a Bordeaux INP Biologist Technician with the IMS Laboratory. She is in charge of animal facility and is a Specialist in animal welfare.



**Florence Poulletier De Gannes** received the Ph.D. degree in functional characterization of immortalized microglial cells during thermal and apoptotic stress situations from the University of Bordeaux, Bordeaux, France, in 1998.

She is currently a CNRS Research Engineer with the IMS Laboratory. Her research interests include adverse and beneficial biological effects of noninvasive electromagnetic fields funded by several national and foreign projects. She also works on EMF health risk assessment.



**Isabelle Lagroye** received the master's, D.Pharm., and Ph.D. degrees in life science from the Bordeaux 2 University, Bordeaux, France, in 1991 and 1997, respectively.

After a Postdoctoral position with the Radiation Oncology Center, Dr. Roti-Roti's laboratory, Saint-Louis, MO, USA, she has been doing research work with the Bioelectromagnetics Team, IMS Laboratory, University of Bordeaux, Bordeaux, France, since 1999. She is currently a Professor with the Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France. She earlier

studied the effect of 50-Hz magnetic fields on cellular transformation and oncoproteins expression. She has authored 40 peer-reviewed papers and more than 20 invited conferences and 50 conferences. She has coauthored the last ICNIRP ELF blue book, part of the Static and ELF Fields EHC Task Groups at WHO, and participant in technical consultation for WHO RF research agenda in 2010. Her research interests include the toxicological effects of noninvasive electromagnetic fields, investigating genotoxicity, apoptosis, protein expression, and stress markers in rat brain and cell cultures exposed to mobile telephone signals.

Prof. Lagroye is a member of the BioElectroMagnetics Society and European BioElectromagnetics Association.



**Yann Percherancier** received the Ph.D. degree in cellular and molecular biochemistry from Pasteur Institute, Paris, France.

During his Ph.D. degree, he studied the biochemistry of HIV-1 virus entry into T-lymphocytes, focusing on the role of specific lipid microdomains (also known as "lipid rafts") in this process. He continued his investigations as a Postdoctoral Researcher with the Laboratory of Michel Bouvier, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, recognized worldwide as a gold standard in molecular pharmacology. In

October 2005, he returned to France as a CNRS Staff Researcher, using the BRET technique to study various cellular process in real time on living cells. In 2009, he moved to Bordeaux and joined the Bernard Veyret Research Group to work on bioelectromagnetism. His current research focuses on the deciphering EMF effects at the cellular and molecular level on living matter in real time.



**Delia Arnaud-Cormos** was born in Cugir, Romania, in 1978. She received the Diplôme d'Ingénieur degree in telecommunication from the Institute of Computer Science and Communication, Rennes, France, in 2002, and the master's and Ph.D. degrees in electronics from the INSA, Rennes, France, in 2003 and 2006, respectively.

Since 2007, she has been with the Bioelectromagnetics Team, XLIM Institute, University of Limoges/CNRS, Limoges, France, as an Associate Professor. In 2012, she joined the Pulsed Power Group,

University of Southern California, Los Angeles, CA, USA, where she developed research with the Biological Applications Research Team. Since 2018, she has been a Junior Member with the Institut Universitaire de France, Paris, France, and a member of the International Bioelectrics Consortium. Her research interests include nanosecond pulses/microwave exposure system setup and dosimetric characterization for bioelectromagnetic studies.



**Philippe Leveque** (Member, IEEE) was born in Poitiers, France, in 1964. He received the Ph.D. degree in electronics, electrotechnics, and optics from the University of Limoges, Limoges, France, in 1994.

In 1995, he joined the CNRS. He is involved in the development of dosimetry and exposure setups for health-risk assessment in cooperation with biological and medical research groups. He is currently a Senior Scientist with the CNRS and the Group Leader of Bioelectromagnetics Team with the XLIM Research Institute focusing on nanopulse application.

His research interest includes the scattering problems of electromagnetic waves, particularly in the time domain.