



FIRST FACULTY
OF MEDICINE
Charles University

 Nantes
Université

COLLEGE ED
DOCTORAL BIOLOGIE
PAYS DE LA LOIRE SANTE

DISSERTATION THESIS

NANTES UNIVERSITE
CHARLES UNIVERSITY

ECOLE DOCTORALE *Biologie-Santé*
Speciality : Cell biology, Developmental biology

Thesis in co-tutelle

Leoš CMARKO

Pharmacological and Phenotypic Screen of New Therapeutically Relevant Calcium Channel Modulators

Criblage pharmacologique et phénotypique de nouveaux modulateurs des canaux calciques à relevance thérapeutique

Thesis defended in Prague, December 15, 2025

Research institutions: L'institut du thorax, Nantes / Charles University, Prague

Reporters :

prof. MUDr. Ladislav VYKLICKÝ, DrSc., Fyziologický ústav AV ČR, v. v. I, Prague
Evelyne BENOIT, Ph.D., CEA, Frédéric Joliot Institute for Life Sciences, Paris

Composition of examination board :

President : prof. MUDr. Karel ŠONKA, DrSc., Neurologická klinika 1. LF UK a VFN, Prague
Members : doc. RNDr. Pavla JENDELOVÁ, Ph.D., Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., Prague
Isabelle BARO, Ph.D., Inserm, L'institut du thorax, Nantes
Christine BERTHIER, Laboratoire Pathophysiologie et génétique du neurone et du muscle, Lyon
prof. MUDr. Ladislav VYKLICKÝ, DrSc., Fyziologický ústav AV ČR, v. v. I, Prague
Evelyne BENOIT, Ph.D., CEA, Frédéric Joliot Institute for Life Sciences, Paris
Thesis supervisor : Michel DE WAARD, Ph.D., Inserm, L'institut du thorax, Nantes
Thesis co-supervisor : Norbert WEISS, Ph.D., Ústav patofyziologie 3. LF UK, Prague

Titre : Criblage pharmacologique et phénotypique de nouveaux modulateurs des canaux calciques à relevance thérapeutique

Mots clés : type T, pharmacologie, criblage, douleur, venins d'araignées, mutation

Les canaux calciques de type T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$) jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'excitabilité neuronale et dans de nombreuses fonctions physiologiques. Leur dérégulation et leurs mutations sont associées à divers troubles neurologiques et neurodéveloppementaux. Comprendre la structure-fonction ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués est nécessaire pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cette thèse vise principalement à identifier et caractériser de nouveaux modulateurs pharmacologiques de canaux de type T à partir d'une bibliothèque de peptides issus de venins d'araignées, en utilisant le patch-clamp automatisé comme plateforme de criblage à haut débit. Ce criblage a permis de découvrir un peptide ayant un effet inhibiteur puissant spécifique de canaux T, validé dans des conditions recombinantes et natives. En poursuivant cette approche pharmacologique, le patch-clamp manuel a été utilisé pour tester des petites molécules conçus de manière rationnelle ciblant les canaux de type T. Cette approche a permis d'identifier un composé puissant dont l'efficacité analgésique a été validée dans des modèles précliniques de douleur. Enfin, afin de démontrer la complémentarité du patch-clamp manuel et automatisé, 18 variants de $Ca_v3.1$ associés à des troubles neurodéveloppementaux ont été caractérisés. Le patch manuel a été confirmé en étant très efficace pour l'analyse à haut débit de la densité de courant et des propriétés de gating des canaux, tandis que le patch manuel a fourni une résolution essentielle pour l'étude des variants de faible expression. Dans l'ensemble, cette thèse apporte de nouvelles informations sur la pharmacologie et la structure-fonction des canaux de type T, tout en soulignant l'intérêt combiné du patch-clamp manuel et automatisé pour la découverte de nouveaux médicaments et la classification fonctionnelle des variants génétiques. Ces résultats posent les bases pour développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les canaux de type T.

Title : Pharmacological and Phenotypic Screen of New Therapeutically Relevant Calcium Channel Modulators

Keywords : T-type channel, pharmacology, screening, pain, spider venom, mutation

T-type calcium channels ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$) play key roles in regulating neuronal excitability and numerous physiological functions. Dysregulation or mutations of these channels are linked to various neurological and neurodevelopmental disorders. Understanding the structure-function relationships and molecular mechanisms is crucial for developing new therapeutic strategies. In this dissertation automated patch-clamp electrophysiology (APC) was used as a high-throughput screening platform to identify novel T-type channel modulators from a spider venom peptide library. The screening led to the discovery of a potent, subtype-specific peptide toxin inhibitor, which was validated under recombinant and native conditions. Extending this pharmacological approach, manual patch-clamp electrophysiology (MPC) was used to test rationally designed small-molecule inhibitors of T-type channels. This effort yielded a lead compound with validated analgesic efficacy in preclinical pain models. Finally, to highlight the complementarity of APC and MPC, eighteen $Ca_v3.1$ variants associated with neurodevelopmental disorders were characterized. APC was proven highly effective for high-throughput analysis of current density and channel gating properties, whereas MPC provides essential resolution for low-expression variants. Altogether, this dissertation thesis provides new insights into T-type channel pharmacology and structure-function while highlighting the use of APC and MPC for drug discovery and classification of channel variants. Ultimately, these findings lay the groundwork for the development of novel T-type channel-targeted therapeutic strategies.