



**HAL**  
open science

# Étude de la pharmacologie moléculaire et de la régulation du canal TRPV1 à l'aide de la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET)

Yann Chappe

► **To cite this version:**

Yann Chappe. Étude de la pharmacologie moléculaire et de la régulation du canal TRPV1 à l'aide de la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET). Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0077 . tel-04023249

**HAL Id: tel-04023249**

**<https://theses.hal.science/tel-04023249v1>**

Submitted on 10 Mar 2023

**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 OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE Science de la Vie et de la Santé  
SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

**Par Yann CHAPPE**

**Étude de la pharmacologie moléculaire et de la régulation  
du canal TRPV1 à l'aide de la technique du transfert  
d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET)**

Sous la direction du Docteur Yann Percherancier

Soutenue le 22 Mars 2022

Membres du jury :

M. Laurent GROC, Directeur de recherche CNRS, IINS - UMR 5297	Président
Mme Céline GALES, Directrice de recherche Inserm, UMR 1297 - I2MC	Rapporteur
M. Florian LESAGE, Directeur de recherche CNRS, IPMC UMR7275	Rapporteur
Mme Dimitra GKIKA, Associate Professor Inserm, U.1003 cell physiologie	Examineur
M. Aubin PENNA, Chargé de recherche CNRS, Laboratoire STIM	Examineur
M. Yann PERCHERANCIER, Chargé de recherche CNRS, IMS UMR 5218	Directeur de thèse

## Résumé :

Malgré leur potentiel en tant que cible thérapeutique, moins de 20% des canaux ioniques sont actuellement exploités pour chercher de nouveaux médicaments. Pour le criblage à haut débit (HTS) des canaux ioniques, le patch-clamp automatisé (APC) est la technique de référence, mais il permet un débit moyen, reste coûteux et nécessite une manipulation experte. Pour les étapes précoces de criblage de médicaments, les sondes à fluorescence sont souvent préférées et confirmées ultérieurement par APC. Ces techniques mesurent des événements moléculaires distants spatialement et temporellement du canal étudié, ce qui favorise une fréquence élevée de faux positifs. Cet inconvénient peut être contourné en mesurant les événements à proximité du canal ionique étudié.

Au cours des vingt dernières années, les approches basées sur le transfert d'énergie par résonance (RET) ont offert de nouvelles opportunités pour sonder l'activité d'une liste toujours croissante de protéines dans les cellules vivantes, en temps réel. Ces techniques s'appuient sur le transfert d'énergie non-radiatif entre un donneur d'énergie et un accepteur d'énergie fluorescent compatible. Un tel mécanisme quantique repose strictement sur la proximité moléculaire (environ 100 Å) et l'orientation entre les molécules donneuses et acceptrices pour le transfert d'énergie. Il s'agit d'un système de choix pour mesurer la dynamique des interactions et des changements de conformation des protéines. Parmi les différentes techniques RET, le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) est une méthode accessible et abordable, qui est de plus en plus largement utilisée pour étudier l'activité des protéines dans les systèmes vivants. L'élimination du besoin d'une source de lumière externe pour l'excitation des donneurs donne au BRET certains avantages par rapport aux techniques connexes telles que le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Grâce à ces avantages, le test BRET a été largement mis en œuvre pour étudier l'activité des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et des kinases.

L'objectif de cette thèse est de développer plus avant l'utilisation de la technique de BRET pour l'étude fonctionnelle et pharmacologique des canaux ioniques dans les cellules vivantes. Grâce à diverses sondes BRET intra- et inter- moléculaires, nous avons réalisé le suivi dynamique de l'activité et de la régulation du canal TRPV1 à divers niveaux, en mesurant : (i) les changements conformationnels, (ii) le couplage avec l'un de ses partenaires fonctionnels la Calmoduline (CaM), (iii) la concentration d'ion proximal situé sous le canal et iv) sa distribution subcellulaire. Ces différents modes de lectures permettent d'éclairer la

pharmacologie de TRPV1 sous un nouveau jour en nous donnant accès à des paramètres qu'il n'est pas possible de mesurer à l'aide de techniques conventionnelles comme la patch-clamp ou les sondes à fluorescence.

Les sondes BRET mesurant les changements de conformation de TRPV1 et son couplage à la CaM ont été évaluées en tant que nouvelle méthode HTS en criblant la banque Prestwick, une bibliothèque chimique de petite taille avec une grande diversité structurale, à la recherche de composés agonistes et antagonistes de TRPV1. L'analyse multiparamétrique résultante a permis de montrer la capacité des inhibiteurs de la CaM à moduler l'activation chimique de TRPV1. Une analyse plus poussée de ce phénomène a mis en exergue l'importance du couplage fonctionnel de TRPV1 avec la CaM pour le maintien de TRPV1 à la membrane plasmique.

Enfin, dans un dernier volet, nous montrons que certains ligands peuvent moduler la sélectivité cationique au travers du canal TRPV1 et de certains canaux P2X. Ceci représente une opportunité thérapeutique potentielle pour cibler des voies spécifiques qui ne produisent que les effets attendus, tout en évitant les effets indésirables induits par les différentes cascades de signalisation.

**Mots clés :** BRET, canaux ioniques, TRPV1, sélectivité ionique, pharmacologie



## Résumé :

Malgré leur potentiel en tant que cible thérapeutique, moins de 20% des canaux ioniques sont actuellement exploités pour chercher de nouveaux médicaments. Pour le criblage à haut débit (HTS) des canaux ioniques, le patch-clamp automatisé (APC) est la technique de référence, mais il permet un débit moyen, reste coûteux et nécessite une manipulation experte. Pour les étapes précoces de criblage de médicaments, les sondes à fluorescence sont souvent préférées et confirmées ultérieurement par APC. Ces techniques mesurent des événements moléculaires distants spatialement et temporellement du canal étudié, ce qui favorise une fréquence élevée de faux positifs. Cet inconvénient peut être contourné en mesurant les événements à proximité du canal ionique étudié.

Au cours des vingt dernières années, les approches basées sur le transfert d'énergie par résonance (RET) ont offert de nouvelles opportunités pour sonder l'activité d'une liste toujours croissante de protéines dans les cellules vivantes, en temps réel. Ces techniques s'appuient sur le transfert d'énergie non radiatif entre un donneur d'énergie et un accepteur d'énergie fluorescent compatible. Un tel mécanisme quantique repose strictement sur la proximité moléculaire (environ 100 Å) et l'orientation entre les molécules donneuses et acceptrices pour le transfert d'énergie. Il s'agit d'un système de choix pour mesurer la dynamique des interactions et des changements de conformation des protéines. Parmi les différentes techniques RET, le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) est une méthode accessible et abordable, qui est de plus en plus largement utilisée pour étudier l'activité des protéines dans les systèmes vivants. L'élimination du besoin d'une source de lumière externe pour l'excitation des donneurs donne au BRET certains avantages par rapport aux techniques connexes telles que le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Grâce à ces avantages, le test BRET a été largement mis en œuvre pour étudier l'activité des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et des kinases.

L'objectif de cette thèse est de développer plus avant l'utilisation de la technique de BRET pour l'étude fonctionnelle et pharmacologique des canaux ioniques dans les cellules vivantes. Grâce à diverses sondes BRET intra- et intermoléculaires, nous avons réalisé le suivi dynamique de l'activité et de la régulation du canal TRPV1 à divers niveaux, en mesurant : (i) les changements conformationnels, (ii) le couplage avec l'un de ses partenaires fonctionnels la Calmoduline (CaM), (iii) la concentration d'ion proximal situé sous le canal et iv) sa distribution subcellulaire. Ces différents modes de lectures permettent d'éclairer la

pharmacologie de TRPV1 sous un nouveau jour en nous donnant accès à des paramètres qu'il n'est pas possible de mesurer à l'aide de techniques conventionnelles comme la patch-clamp ou les sondes à fluorescence.

Les sondes BRET mesurant les changements de conformation de TRPV1 et son couplage à la CaM ont été évaluées en tant que nouvelle méthode HTS en criblant la banque Prestwick, une bibliothèque chimique de petite taille avec une grande diversité structurale, à la recherche de composés agonistes et antagonistes de TRPV1. L'analyse multiparamétrique résultante a permis de montrer la capacité des inhibiteurs de la CaM à moduler l'activation chimique de TRPV1. Une analyse plus poussée de ce phénomène a mis en exergue l'importance du couplage fonctionnel de TRPV1 avec la CaM pour le maintien de TRPV1 à la membrane plasmique.

Enfin, dans un dernier volet, nous montrons que certains ligands peuvent moduler la sélectivité cationique au travers du canal TRPV1 et de certains canaux P2X. Ceci représente une opportunité thérapeutique potentielle pour cibler des voies spécifiques qui ne produisent que les effets attendus, tout en évitant les effets indésirables induits par les différentes cascades de signalisation.

**Mots clés :** BRET, canaux ioniques, TRPV1, sélectivité ionique, pharmacologie

# Remerciements

J'adresse en premier lieu mes remerciements et une infini reconnaissance à mon mentor et superviseur le docteur Yann Percherancier. Merci, de m'avoir permis de faire cette thèse dans ton équipe, pour ton encadrement et tes enseignements, j'ai beaucoup appris grâce à toi. Tu m'as donné envie de donner le meilleur et tu m'as ouvert de nombreuses perspectives. Je me rappellerai toujours de cette petite balade au tour de l'étang pendant le concours de l'ED SVS... Nos nombreuses discussions scientifiques, ainsi que ta théorie des multiples P. Je n'oublie pas ton problème avec l'eau de Javel, pour le bien-être de tous, stp...

Je remercie mes rapporteurs et examinateurs, madame Céline Gales, madame Dimitra Gkika dont j'ai été ravi de faire la connaissance à San Francisco, monsieur Florian Lesage, monsieur Aubin Penna et monsieur Laurent Gros de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail, merci à tous pour vos retours très constructifs.

Merci à tous les membres de mon équipe Bio-EM, qui entretiennent une ambiance exceptionnelle dans le laboratoire et partagent de belles valeurs d'entre-aide et de bienveillance. Isabelle, Bernard, Renaud, André, Florence, Annabelle, Lorenza, Melody (tes comètes difforme ^^ encore bravo pour ta thèse), la « petite Annah » comtesse de Canovi (alors ça Spike), mon petit Alex avec qui j'ai partagé énormément de temps (et bien plus encore), Noé et Pablo mes autres stagiaires qui sont très efficaces et que j'espère voir réussir.

Merci à tous nos collègues et partenaires scientifiques qui ont contribué à faire de cette thèse une réussite ainsi que pour nos discussions et vos précieux conseils.

A l'équipe de la PTIB Solène Barbeau, Thomas Ducret et plus particulièrement Jean François Quignard, merci de m'avoir permis de faire « un peu » de patch clamp et de confocale chez vous. Merci pour vos enseignements en électrophysiologie qui m'ont été précieux.

A l'équipe de Montpellier, Sandra et Vincent qui ont toujours répondu présent même si parfois on en demandait beaucoup...

A nos collaborateurs de l'entreprise Domain Therapeutics avec lesquelles tout a commencé, Christel, Nathalie, Pauline, Luc, Xavier... Pour m'avoir permis de découvrir l'aspect industriel de la recherche de médicament et cette journée à Strasbourg.

Aux membres de la SATT, avec qui l'aventure a commencé et continue, Lucile Tran, Christelle Latxague et Jean Luc Chagnaud.

A petite famille et particulièrement à ma compagne Sophie, qui me supporte et je sais ce n'est pas facile. Encore plus avec nos deux enfants Julian et Noah pleins d'énergie, merci ma chérie, mon épouse, ou plutôt félicitation de m'avoir supporté. Tu m'as permis de me consacrer pleinement à cet objectif, c'était important pour moi et tu as assuré. J'ai énormément de chance de t'avoir, d'avoir fondé cette famille avec toi, tu es une personne exceptionnelle. Tu es mon âme sœur et grâce à toi et nos enfants je suis comblé de bonheur tous les jours, je vous aime fort.

A ma TRES grande famille, mes parents (merci d'être venu me voir), mes sœurs, mon frère qui me supportent depuis toujours et à ma belle-famille. Je suis très heureux d'avoir partagé cette passion avec vous, même si je peux le comprendre, je suis difficile à suivre parfois. Merci à tous, pour votre soutien, je vous aime fort. A mes potos, en particulier mon cousin Amaury et Eddy. Je vous kiff les gars.

À mon épouse et mes enfants,

---

# **Title: Study of the molecular pharmacology and regulation of the TRPV1 channel using the technique of bioluminescence resonance energy transfer (BRET)**

## **Abstract:**

Ion channels are essential proteins for the proper functioning of cell physiology and involved in a wide range of functions. They are in fact interesting drug targets for many therapeutic applications.

Despite this potential, the pharmacological profiling of most ion channels remains unaddressed. For high-throughput screening (HTS) of ion channels, the automated patch-clamp technique (APC) is the gold standard, but it provides medium throughput, remains expensive, and requires expert handling. For early stages of drug screening, indirect readout technologies are often preferred, later confirmed by APC. These techniques monitor molecular events that are spatially and temporally distant from the studied channel, promoting a high frequency of false positives. This drawback can be bypassed by measuring proximal events near the studied ion channel once activated.

Over the past twenty years, approaches based on resonance energy transfer (RET) have offered new opportunities to probe the activity of an ever-growing list of proteins in living cells, in real time. These techniques are based on non-radiative energy transfer between an energy donor and a compatible fluorescent energy acceptor. Such a quantum mechanism strictly relies on molecular proximity (about 100 Å) and orientation between donor and acceptor molecules for energy transfer. It is a system of choice for monitoring both constitutive and regulated inter and intramolecular interactions. Among the various RET techniques, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) is a popular method to study protein activity in living systems. Eliminating the need for an external light source for donor excitation, gives BRET certain advantages over related techniques such as fluorescence resonance energy transfer (FRET). Thanks to these advantages, the BRET test has been widely implemented for G-protein-coupled receptor (GPCR) and kinase screening.

The objective of this thesis is to use the BRET technique, and apply it to the functional and pharmacological study of ion channels in living cells and in real time by designing BRET probes targeting these channels. Thanks to these probes, we evaluated the activity and regulation of the TRPV1 channel, by monitoring (i) ion channel conformational changes during gating, (ii) the coupling with one of its functional partners, the Calmodulin (CaM) protein, (iii) the proximal ion concentration near the channel pore and iv) its subcellular distribution. These events are of critical importance for TRPV1 pharmacology but remained intractable using standard HTS techniques for ion channels such as APC or automated calcium assay.

The BRET probes targeting TRPV1 conformational changes and functional coupling with CaM were evaluated as novel HTS methods by screening the Prestwick library, a small chemical library with high structural diversity, for both agonists and antagonists. The resulting multiparametric analysis demonstrated the ability of CaM inhibitors to modulate chemical activation of TRPV1. Further analysis of this phenomenon highlighted the importance of functional coupling of TRPV1 with CaM for the maintenance of TRPV1 at the plasma membrane.

Finally, in a last part, we show that some ligands can differentially modulate the cationic selectivity through the TRPV1 channel and some P2X channels. Biased ligand activity in ion channel represents a potential therapeutic opportunity to target specific pathways that produce only the expected effects, while avoiding ligand adverse effects.

**Keywords:** BRET, ion channels, TRPV1, ion selectivity, pharmacology

---

## Unité de recherche

[Laboratoire de l'Intégration du matériau au système (IMS), UMR5218,

351 cours de la libération, Bâtiment A31

33405 Talence cedex, France]

Liste des abréviations .....	4
<b>Introduction générale</b> .....	6
1 Les Canaux ioniques .....	7
1.1 Taxonomie.....	8
1.2 Les canaux ioniques voltage-dépendants .....	10
1.2.1 Phylogénie.....	10
1.2.2 Structure des VGICs.....	12
1.2.2.1 Pore et filtre de sélectivité.....	12
1.2.2.2 Domaine S4 et voltage dépendance.....	15
1.2.2.3 Gating .....	16
1.2.3 Les sous-familles des canaux voltage-dépendants .....	17
1.2.3.1 Les canaux potassiques voltage-dépendants .....	17
1.2.3.2 Les canaux calciques et sodiques voltage-dépendants .....	19
1.2.4 Rôles physiopathologiques des canaux ioniques.....	20
1.2.5 Applications pharmaceutiques .....	20
1.3 Les canaux à récepteur de potentiel transitoire .....	22
1.3.1 Historique des canaux TRP .....	23
1.3.2 Phylogénie des canaux TRP .....	24
1.3.3 Structure et fonctions des canaux TRPs .....	25
1.3.4 Sous-familles de TRP.....	26
1.3.4.1 TRPM (Melastatine).....	27
1.3.4.2 TRPA (Ankyrine).....	28
1.3.4.3 TRPP (Polycystine) et TRPML (Mucolipine).....	28
1.3.4.4 TRPC (Canonique).....	29
1.3.4.5 TRPV.....	30
1.3.5 Structures et fonctions des thermoTRPs .....	30
1.3.6 TRPV1.....	33
1.3.6.1 Structure .....	33
1.3.6.2 Expression et fonctions .....	35
1.3.6.3 Thermo-sensation et thermorégulation.....	37
1.3.6.4 Molécules chimiques endogènes .....	38
1.3.6.5 Molécules chimiques exogènes (xénobiotiques).....	39
1.3.6.6 pH.....	41
1.3.6.7 Notion de sensibilisation .....	41
1.3.6.8 Notion de désensibilisation .....	43
1.3.6.9 Applications physiopathologiques de TRPV1 .....	44
1.3.6.10 TRPV1 une cible pharmacologique .....	45



1.3.6.11	Bilan .....	47
1.4	Techniques d'études des canaux ioniques pour la recherche de médicaments .....	48
1.4.1	Principe du criblage de molécules à très haut débit HTS.....	48
1.4.2	Techniques d'études HTS des canaux ioniques .....	49
1.4.2.1	Test Fluorescents.....	50
1.4.2.1.1	Sondes chimiques à ions .....	51
1.4.2.1.1.1	Sondes chimiques à Potassium.....	51
1.4.2.1.1.2	Sondes chimiques à Calcium.....	53
1.4.2.1.1.3	Sondes chimiques à Sodium.....	55
1.4.2.1.2	Sondes chimiques à potentiel de membrane.....	56
1.4.2.2	Électrophysiologie.....	58
1.4.2.2.1	Bref historique de l'électrophysiologie .....	58
1.4.2.2.2	Technique du patch-clamp .....	58
1.4.2.2.3	Approche technique et modes de mesure .....	59
1.4.2.2.4	Automatisation .....	63
1.4.2.2.5	Bilan .....	64
2	Nouvelle approche pour l'étude des canaux ioniques et de leur pharmacologie à l'aide du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence .....	65
2.1	Construction du test biologique.....	65
2.2	Le principe du transfert d'énergie en résonance (RET) .....	66
2.2.1	La Green Fluorescent Protein « GFP » .....	68
2.2.2	La DsRed « RFP ».....	69
2.2.3	La mNeonGreen .....	70
2.3	Le FRET.....	70
2.4	Le BRET .....	72
2.4.1	La Bioluminescence .....	72
2.4.2	Bioluminescence et transfert d'énergie en résonance .....	73
2.4.3	Technique de marquage et clonage .....	75
	<b>RESULTATS</b> .....	78
3	Étude des canaux ioniques voltage-dépendants à l'aide du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence .....	79
3.1	Développement des tests BRET intramoléculaires .....	79
3.2	Article 1 : Criblage haut débit des ligands de TRPV1 à la lumière du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence .....	80
3.3	Développement des tests BRET mesurant la quantité intracellulaire d'ions dans le nanoenvironnement du pore des canaux. ....	105
3.4	Article 2: Ligand bias induces variable ion selectivity in TRPV1 and P2X5/7.....	107
3.5	Exemplification du principe des sondes BRET à ions étendu à d'autres canaux...	139

3.6	Étude de la distribution du canal TRPV1 et de sa pharmacologie à l'aide d'un test BRET bystander. ....	142
3.6.1	Confirmation de l'impact de la calmoduline dans la fonctionnalité du canal TRPV1. ....	147
3.6.2	Application de la technique de « bystander BRET » à l'étude de la distribution de TRPV1. ....	150
3.6.3	Influence du calcium extracellulaire sur l'internalisation de TRPV1 caps dépendante.....	154
3.6.4	Étude de l'impact de l'interaction calmoduline/TRPV1 sur la distribution du canal à l'état de base et suite à son activation .....	156
3.6.5	Conclusion de l'étude préliminaire visant à évaluer l'impact de l'interaction calmoduline/TRPV1 sur la distribution cellulaire du canal .....	158
	<b>DISCUSSION</b> .....	159
	<b>PERSPECTIVES</b> .....	162
	<b>Bibliographie</b> .....	163

## Liste des abréviations

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
4 $\alpha$ -PDD	4 $\alpha$ -Phorbol 12,13-didecanoate
5-iodoRTX	5-iodorésinifératoxine
a.a	acide aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique (DNA en anglais)
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARD	Domaine Ankyrin Répété
ATP	Adénosine Triphosphate
BRET	Transfert d'Energie en Résonance de Bioluminescence
Ca	Calcium
CaM	Calmoduline
CAPS	Capsaïcine
Cdk5	Cyclin-dependant kinase 5
CoeH	CoelentérazineH
CPZ	Capsazépine
DAG	Diacylglycérol
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DRG	Dorsal Root Ganglia
EC50	concentration efficace demi-maximale
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Acide éthylène tétraacétique
FDA	Food and drug agency
FRET	Transfert d'Energie en Résonance de Fluorescence
GFP	Green Fluorescent Protein
GHK	Goldman, Hodgkin et Huxley
HERG	Human ether-à-go-go gene
HTS	High Throughput Screening
IC50	concentration inhibitrice demi-maximale
IP <sub>3</sub>	Inositol Triphosphate
K2P	Canaux potassiques à deux domaines pores
KATP	Canaux potassiques sensibles à l'ATP

KIF13B	Kinesin-3 family member 13B
KiR	Canaux potassiques à rectification entrante
KV	Canaux potassiques dépendant du potentiel
LGIC	Ligand gated ion channel
nLuc	NanoLuciférase
NGF	Nerve Growth Factor
PD	Pore Domain
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKD2	Polycystic Kidney Disease
PLC	Phospholipase C
RET	Transfert d'Energie en Résonance
RFP	Red Fluorescent Protein
Rluc	<i>Renilla</i> Luciférase
RTX	Résinifératoxine
RuR	Ruthénium Red
SUR	Récepteurs aux sulphonylurés
SVF	Sérum de veau foetal
TM	Transmembranaire
TEA	Tetraéthylammonium
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrine
TRPC	Transient Receptor Potential Canonique
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatine
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipine
TRPN	Transient Receptor Potential NompC
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystine
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
VGIC	Voltage gated ion channel
VSD	Voltage sensing domain
YFP	Yellow Fluorescent Protein

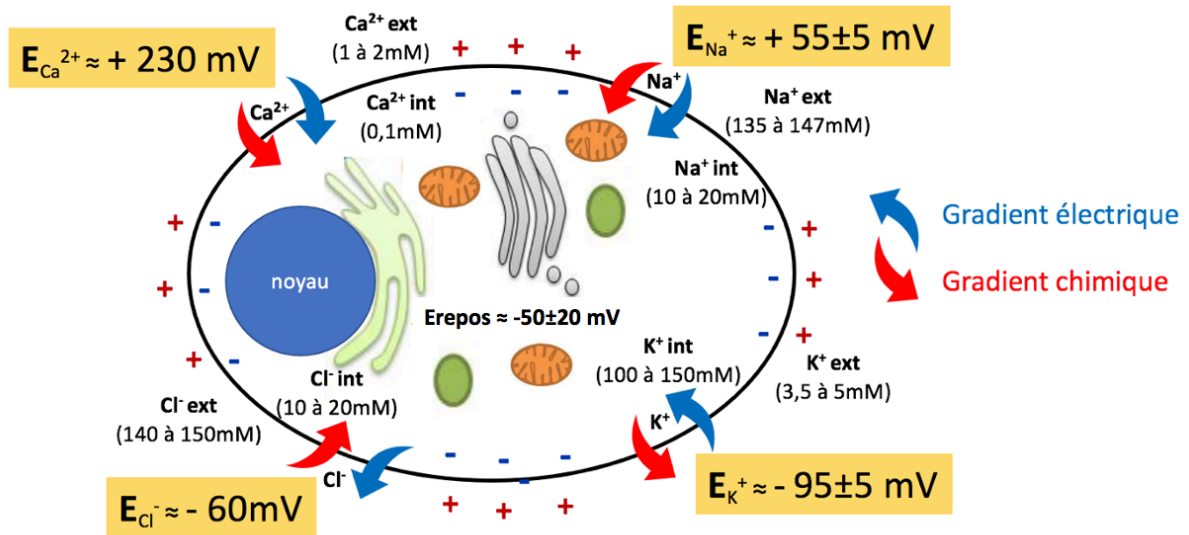
## Introduction générale

Les échanges d'ions sont d'une importance physiologique capitale pour les fonctions cellulaires. À l'état de base, la cellule possède dans son cytoplasme et dans ses différents compartiments des concentrations en ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  pour les majoritaires, bien différentes de son environnement extracellulaire (Fig. 1). À titre d'exemple, la concentration d'ions sodium dans son cytoplasme est bien inférieure à celle de son environnement. À l'inverse, les ions potassium sont à des concentrations plus élevées à l'intérieur qu'à l'extérieur.

De telles différences en ions de part et d'autre de la membrane cellulaire, classiquement imperméable aux ions, permettent la génération d'un gradient dit électrochimique. Ce gradient résulte de la combinaison entre un gradient chimique et un gradient de charge à cause respectivement, des différences de concentration en ions et en répartition de charge de part et d'autre de la membrane cellulaire.

Au niveau des membranes cellulaires, ce gradient électrochimique est maintenu par les protéines ionophoriques. Ces protéines correspondent à des structures électrogéniques telles que les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dans la membrane plasmique, la SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase dans la membrane du réticulum endoplasmique et certains canaux ioniques principalement potassiques dits « de fuite » qui sont ouverts de manière constitutive et permettent aux ions  $\text{K}^+$  de fuir à travers la membrane de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule.

En sortant, ce flux d'ions chargé positivement établit un potentiel électrique à travers la membrane rendant l'intérieur de la cellule plus négatif que l'extérieur, jusqu'à ce qu'un équilibre, situé entre -30 et -90 mV selon le type cellulaire observé, soit atteint. Cette répartition inégale des charges à travers la membrane génère une force qui entraîne la diffusion des ions jusqu'à ce que les charges soient équilibrées de part et d'autre de la membrane. Ce potentiel électrochimique régule ainsi en grande partie les échanges d'ions de la cellule (Fig. 1). Toutefois, étant donné le caractère hydrophobe de la membrane cellulaire, ces ions ne peuvent la traverser librement. Leur diffusion à travers les membranes requiert une certaine catégorie de protéines membranaires : les canaux ioniques.



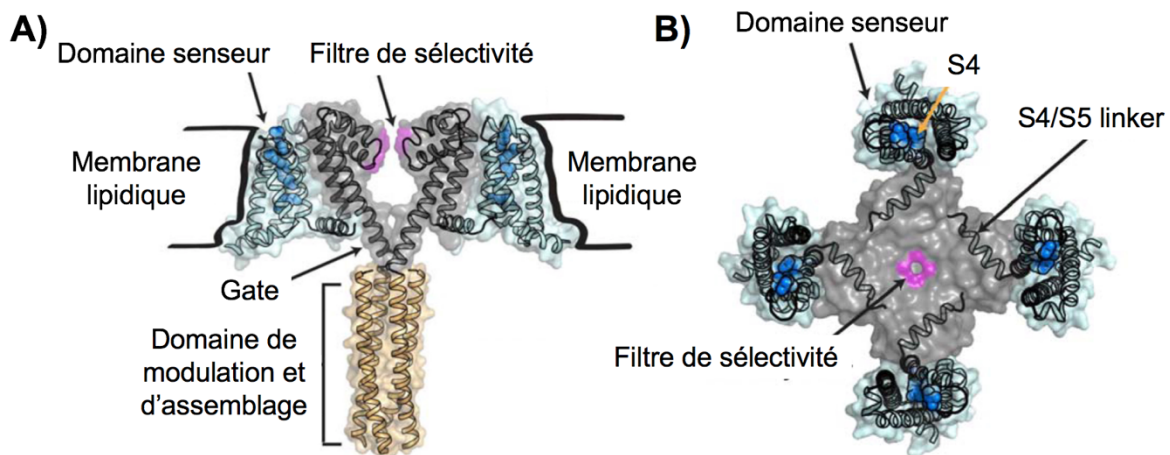
**Figure 1 :** Concentration des principaux ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$ ) dans les milieux intra- et extra- cellulaire des cellules de mammifère avec leur potentiel d'équilibre et leur gradient électrochimique correspondant.

## 1 Les Canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des constituants essentiels au bon fonctionnement des cellules. Ce sont des structures protéiques qui traversent les membranes cellulaires, pour y former des pores de quelques Angströms (Fig. 2). Ils donnent ainsi à nos cellules, la capacité de faciliter les échanges d'ions avec l'environnement extérieur et entre les différents compartiments cellulaires selon un mécanisme de transport passif facilité. Le passage des ions à travers ces canaux est ainsi uniquement dépendant du gradient électrochimique.

En facilitant la diffusion d'ions à travers les membranes, les canaux ioniques entraînent la production de signaux électriques d'une importance capitale pour le bon fonctionnement de la physiologie cellulaire. Ils permettent le maintien du potentiel membranaire négatif et l'excitabilité cellulaire pour la génération de potentiels d'action au sein de cellules excitables comme les neurones. Ils régulent le pH intracellulaire autour d'une valeur de 7,2 grâce aux mouvements des protons  $\text{H}^+$ , et maintiennent l'équilibre osmotique cellulaire de 290 mOsm en intracellulaire contre 300 mOsm en extracellulaire. Certains ions transitant par les canaux comme le calcium servent de messenger secondaire dans les voies de transduction du signal, permettant par exemple la prolifération, la différenciation ou l'apoptose.

Grâce à leur positionnement périphérique au sein de la membrane plasmique, les canaux ioniques sont des récepteurs majeurs de nos cellules. Ils sont en première ligne pour détecter les variations de l'environnement cellulaire proche. Les canaux, grâce à leur activité de contrôle des échanges d'ions, sont ainsi capables de convertir les messages chimiques et/ou mécaniques environnementaux en signaux électriques intracellulaires. En faisant varier les concentrations en ions, ils permettent à la cellule d'adapter son comportement et/ou sa physiologie aux conditions environnementales.



**Figure 2 :** A) Modèle schématisé en ruban du canal ionique ancestral bactérien BacNaV observé dans le plan de la membrane plasmique et B) Vue du dessus par le côté extracellulaire d'après (Isacoff et al., 2013) et construit à partir de (Payandeh et al., 2011; Payandeh and Minor, 2015; Shaya et al., 2014).

## 1.1 Taxonomie

Les canaux ioniques contrôlent les échanges d'ions qui forment la base moléculaire de l'excitabilité cellulaire. De cette manière, ils façonnent des signaux cellulaires rapides comme : (i) la génération des courants électriques, (ii) l'activité réceptrice sensorielle environnementale ou (iii) la transduction de signaux. Ils interviennent également dans des processus cellulaires beaucoup plus lents, comme la mitose et la migration cellulaire.

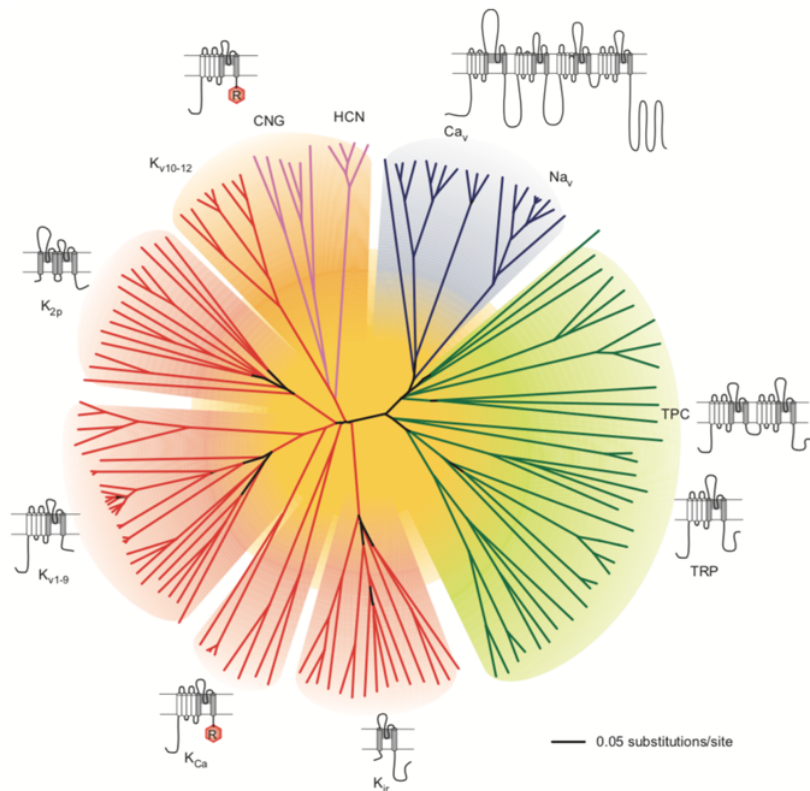
Pour prendre en charge cette large gamme de fonctions, les canaux présentent une grande variété de structures qui diffèrent selon leur mode d'ouverture classiquement appelé « gating », de fermeture, leur conductance ionique et leur sélectivité. Ils disposent ainsi, d'une très grande diversité avec plus de 260 sous-unités de canal structurellement distinctes et 90 sous-unités

régulatrices, codées par plus de 400 gènes. Les gènes codant ces protéines représentent environ 1,5 % du génome humain.

À partir de 1998, les 1<sup>ères</sup> résolutions de structure des canaux ioniques, obtenues par le lauréat du prix Nobel de chimie 2003 Roderick MacKinnon (Jiang et al., 2002), ont permis de grandement améliorer la compréhension de la base structurale derrière la fonction des canaux ioniques (Fig. 2). On a ainsi pu constater que de nombreux canaux (par exemple, les canaux KV, NaV, CaV, HCN et TRP) partagent plusieurs similitudes structurales, suggérant que ces canaux ont évolué à partir d'un ancêtre commun, qui serait un canal ionique de type voltage-dépendant. Cependant, d'autres canaux ioniques tels que les canaux chlorures, les aquaporines et les canaux ligands-dépendants, ont des propriétés structurales complètement différentes des canaux voltages-dépendants, suggérant une évolution très divergente.

Sur la base de ces constats, la superfamille des canaux cationiques est aujourd'hui principalement sous-divisée en deux grandes familles, selon les mécanismes contrôlant les transitions d'ouverture-fermeture ou « gating ». On distingue ainsi les canaux sensibles au potentiel membranaire, aussi appelés canaux voltage-dépendants dits « VGIC » (pour « voltage-gated ion channel ») et les canaux sensibles à des stimuli de nature chimique comme les récepteurs ionotropiques ou les canaux ligands dépendants dits « LGIC » (pour « Ligand-gated ion channel »). Néanmoins, il est évidemment que subdiviser une si grande famille en 2 sous-familles n'est pas suffisant. Ainsi, ils sont eux même régulièrement sous-divisés grâce à d'autres déterminants moléculaires, comme la topologie de leurs sous-unités, leur mode d'activation/inactivation/désensibilisation, leur conductance, leur sélectivité ionique. Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes principalement intéressés à l'étude des canaux ioniques faisant partie de la famille des voltage-dépendants (Fig. 3).





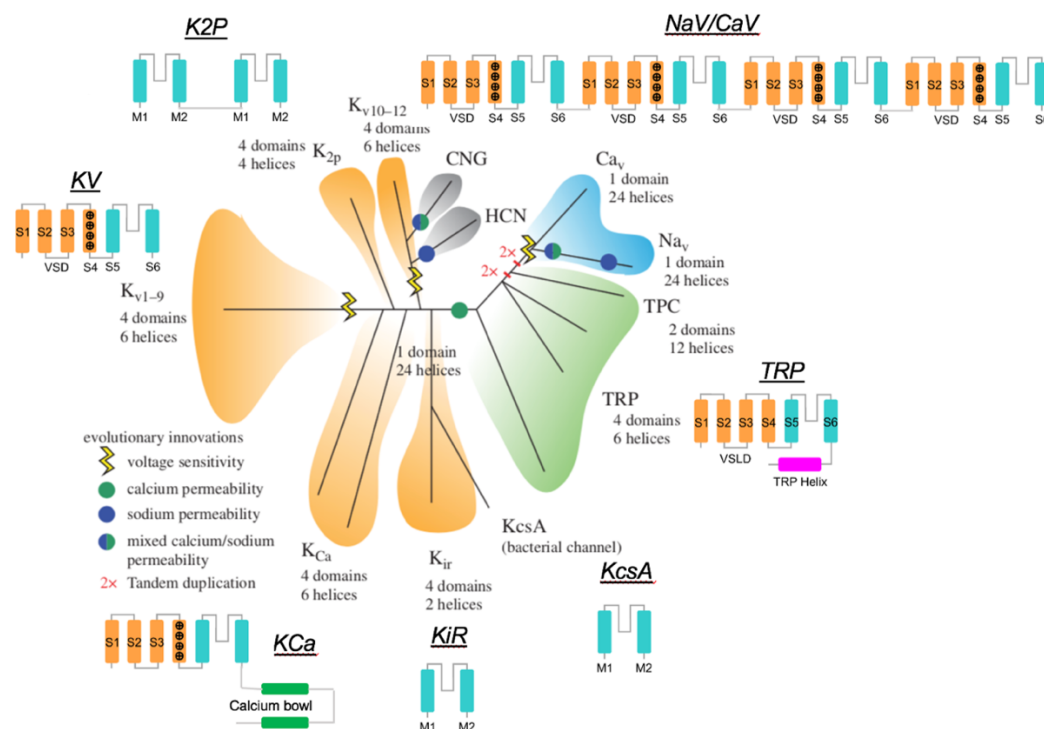
**Figure 3 :** Dendrogramme des deux grandes familles de canaux cationiques voltage-dépendants (Clapham, 2003).

## 1.2 Les canaux ioniques voltage-dépendants

### 1.2.1 Phylogénie

À l'échelle moléculaire, les canaux voltage-dépendants sont des complexes protéiques issus de l'assemblage de plusieurs sous-unités  $\alpha$  homologues. Les sous-unités  $\alpha$  sont des protéines membranaires intégrales qui constituent l'unité de base des canaux. À partir des années 1980, ces canaux ont été identifiés, clonés et caractérisés comme voltage-dépendants suite à la découverte dans la structure des canaux des sous-familles NaV, KV et CaV, d'un segment transmembranaire S4 sensible au potentiel de membrane. La découverte de ce domaine a servi de critère de base pour construire la superfamille des canaux voltage-dépendants. Les VGICs sont ainsi composés de deux domaines majeurs : le domaine responsable de la formation du pore dit « pore domaine ou PD », qui est associé au domaine sensible à la tension membranaire appelé voltage sensing domain ou « VSD ». Les PDs sont composés de deux segments transmembranaires S5 et S6 reliés ensemble par la boucle P extracellulaire et partiellement rentrant dont la fonction précise sera détaillée dans le chapitre 1.2.2.1. Les VSDs

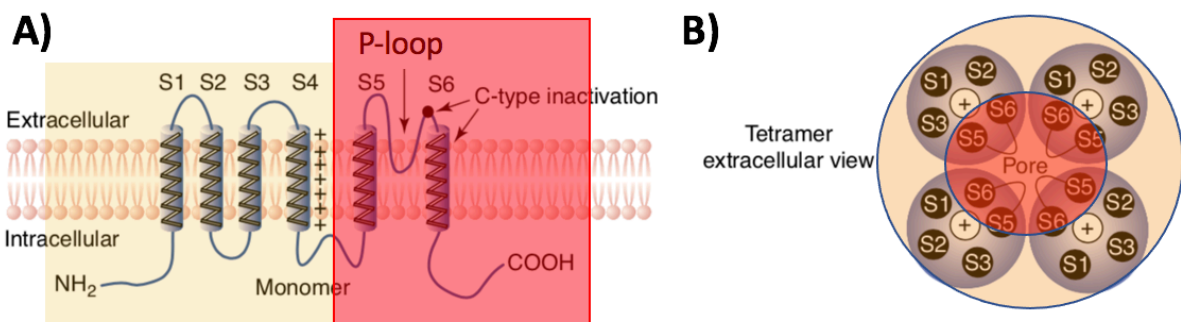
sont composés des quatre premiers segments TM (S1-S4) dont le S4 chargé positivement qui est le capteur de tension. Ce segment S4 correspond à une séquence répétée contenant 3 à 7 charges positives apporté par des résidus arginines et lysines espacées par des intervalles de 3 acides aminés hydrophobes dont le mécanisme est détaillé dans le chapitre 1.2.2.2. En principe, les VGIC sont classifiés sur la base des similitudes structurales avec cette sous-unité  $\alpha$  voltage-dépendante. Cette classification a permis d'identifier plus de 140 canaux voltages dépendant, dont plus de 110 comportent un domaine VSD dont le mode de fonctionnement sera détaillé dans le chapitre 1.2.2.2 (Yu et al., 2005). Sur la base des études phylogénétiques, toutes les sous-unités des VGIC sont issues de la sous-unité  $\alpha$  du canal ionique ancestral bactérien KcsA, composé seulement du domaine pore avec ses extrémités N- et C- terminales cytoplasmiques. Par conséquent, au sein de cette famille, chacune de ces sous-unités  $\alpha$  disposent de 2 à 6 domaines transmembranaires d'hélices  $\alpha$  (Fig. 4). Bien que structurellement apparentée, on peut très facilement constater 7 groupes différents ayant chacun des caractéristiques qui leurs sont propres et qui forment les différentes sous-familles des canaux voltage-dépendants présentées dans le chapitre 1.2.3.



**Figure 4 :** Arbres phylogénétique hypothétique des canaux voltage-dépendant et représentation schématique de leur évolution structurale à partir d'un ancêtre commun bactérien KcsA disposant de 2 domaines transmembranaires.

### 1.2.2 Structure des VGICs

La formation d'un canal fonctionnel voltage-dépendant résulte de l'assemblage de plusieurs sous-unités  $\alpha$ . Certaines de ces sous-unités sont codées par des gènes distincts individualisés. Les autres sont regroupées au sein d'un seul polypeptide, reliées par de longs domaines cytoplasmiques (NaV et CaV). Ces structures s'organisent selon un arrangement circulaire autour d'un pore étroit, en partie hydrophile, s'étendant de part et d'autre de la membrane (Fig. 5). Dans cette structure, les domaines PDs des sous-unités  $\alpha$  sont à l'interface du pore dans le tétramère. Ils permettent l'assemblage ordonné des sous-unités autour du pore. Le pore central est entouré par le segment S4 contenu dans le domaine VSD qui occupe une position centrale dans le monomère isolé de la membrane par les segments S1, S2 et S3. La formation d'un canal fonctionnel nécessite parfois d'autres protéines partenaires comme les sous-unités  $\beta$ . Les pores ainsi formés peuvent être issus de la même sous-unité  $\alpha$  formant des homomères, ou de sous-unités  $\alpha$  différentes pour former des hétéromères.



**Figure 5 :** A) Organisation structurale secondaire des sous-unités  $\alpha$  des canaux voltage-dépendants au sein de la membrane et B) topologie des sous-unités au sein du tétramère formant le canal ionique mettant en avant les domaines VSD en orange et les PDs en rouge.

#### 1.2.2.1 Pore et filtre de sélectivité

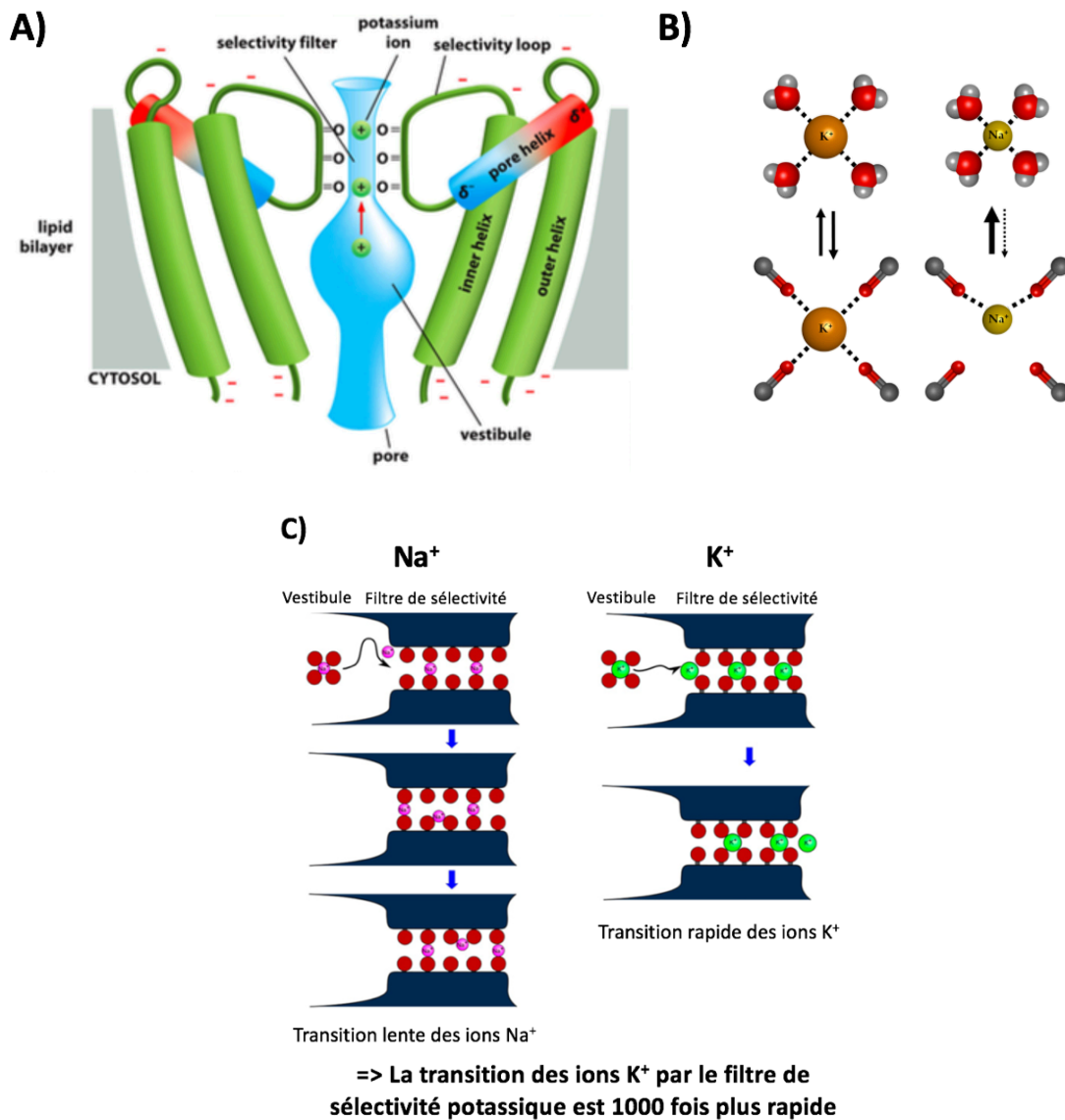
Dans le tétramère, la région du pore formé des « PDs » est la plus importante et celle qui caractérise le mieux les canaux. Le pore est formé par les domaines transmembranaires S5 et S6 et d'une boucle contenant la région P qui les relie et qui contient une séquence consensus essentielle à la formation du filtre de sélectivité. La région P s'intègre partiellement dans la membrane plasmique depuis le milieu extracellulaire pour former une zone plus étroite et moins hydrophile au niveau du pore. Ce pore présente une grande diversité de structure et de charge en fonction des acides aminés qui le tapissent. Il permet aux canaux de distinguer les différents

types d'ions pour générer ainsi un profil de sélectivité ionique différent pour chaque type de canal (Catterall, 2010).

La structure globale du pore est homogène entre les différents canaux. À l'entrée, le pore est composé d'une large cavité en forme de cône. Cette forme conique favorise l'accumulation d'ions hydratés jusqu'à l'entrée du pore au niveau du « vestibule ». Cette structure qui s'étale de l'entrée du pore jusqu'au niveau du filtre de sélectivité permet d'accumuler un pool d'ions hydratés sous le filtre de sélectivité préalablement à l'activation du canal. Lors de son activation, le canal produit un remodelage structural important qui entraîne un effet poussoir par répulsion des charges du pool d'ions accumulés dans le vestibule, et qui transitent alors vers le filtre de sélectivité. (Kopec et al., 2019)

À l'entrée du filtre de sélectivité, l'ion est stabilisé et désolvaté grâce aux groupes carboxyles des liaisons peptidiques et des chaînes latérales des acides aminés du filtre de sélectivité. Dans cette structure, les ions sont maintenus espacés d'une distance optimale pour mimer les oxygènes des molécules d'eau qui les hydratent normalement. En aval du filtre de sélectivité, les ions sont resolvatés et sortent du pore.

Ce passage est possible seulement pour les ions de bonnes tailles (Fig. 6). De cette manière, un canal est capable via son filtre de sélectivité de distinguer la taille d'un ion potassium à l'état solvaté (~2,4 Angstrom), d'un ion sodium (~2,8 Angstrom) (Mita et al., 2021). En permettant cette distinction par la taille ou par leur charge, un canal peut être jusqu'à 1000 fois plus sélectif pour certains types d'ions, comme les canaux NaV pour le sodium, ou les canaux KV pour le potassium. D'autres canaux peuvent être perméables à plusieurs types d'ions à la fois, partageant une charge commune positive ou négative. C'est par exemple le cas pour les canaux cationiques qui laissent passer le sodium et le potassium (tous deux de charge positive). On parle de perméabilité non-sélective.

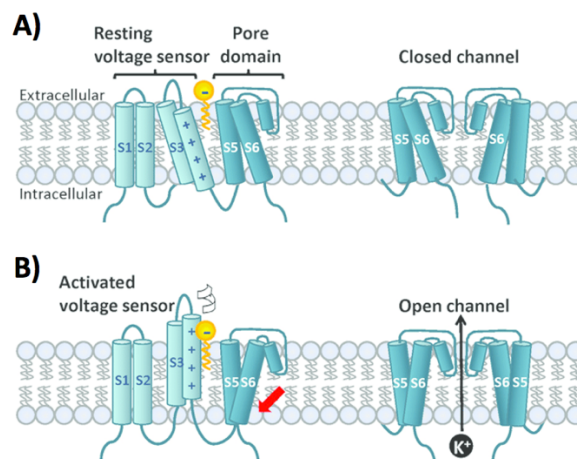


**Figure 6 :** **A)** Représentation schématique du pore d'un canal potassique dans la membrane plasmique contenant son filtre de sélectivité. **B)** Représentation des ions en solution sous forme hydratée montrant la distance séparant l'ion de l'atome d'oxygène comparé à la distance relative de l'ion « pseudo hydraté », transitant par le filtre de sélectivité d'un canal potassique. **C)** Schéma représentant les caractéristiques de conductance distinctes des ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> via le filtre de sélectivité du canal potassique bactérien KcsA. Les sphères rouges représentent les atomes d'oxygène des molécules d'eau dans le vestibule, ou des groupes carbonyle et hydroxyle (des Thr) présent dans le filtre de sélectivité. (Mita et al., 2021)

### 1.2.2.2 Domaine S4 et voltage dépendance

Le rôle principal des VGICs est la transduction du signal électrique dans les cellules excitables, comme les neurones ou les cellules musculaires. Dans ces cellules, le signal électrique généré se déplace rapidement à la surface de la membrane plasmique en raison de l'ouverture successive des canaux ioniques présents à proximité, sensibles au changement de différence de potentiel. Cette transduction électrique du signal s'effectue principalement grâce aux deux fonctions des canaux VGIC, à savoir la détection du potentiel de membrane et la conduction ionique.

Pour détecter ces changements de potentiel électrique, les VGIC utilisent leur domaine VSD qui répond aux changements de la tension transmembranaire par un remodelage de sa structure, lequel se répercute sur la conformation du canal. Lors d'une dépolarisation, le VSD chargé positivement subit une torsion et une translocation qui le fait sortir du plan de la membrane plasmique vers l'extérieur par répulsion de charge, entraînant l'apparition de 2 arginines au niveau de la face externe (Yang et al, 1996). Ce changement de conformation déforme la structure du canal, entraînant un remodelage structural qui se répercute jusqu'au segment S6. Ce remodelage entraîne l'ouverture du pore et permet le passage transitoire et coordonné des ions selon leur gradient électrochimique, et la propagation des signaux électriques (Fig. 7, Benzilla et al, 2002). Le VSD permet le couplage électromécanique du canal en définissant le seuil de potentiel de membrane à partir duquel le pore s'ouvre.



**Figure 7 :** Représentation schématique du mécanisme d'ouverture des canaux potassiques voltage-dépendants par le biais du domaine S4 dont les charges **A)** cachés dans la membrane à l'état de repos sont **B)** répulsées vers l'extérieur de la cellule lors d'une dépolarisation conduisant à l'ouverture du pore et la sortie de potassium (Moreno et al., 2016).

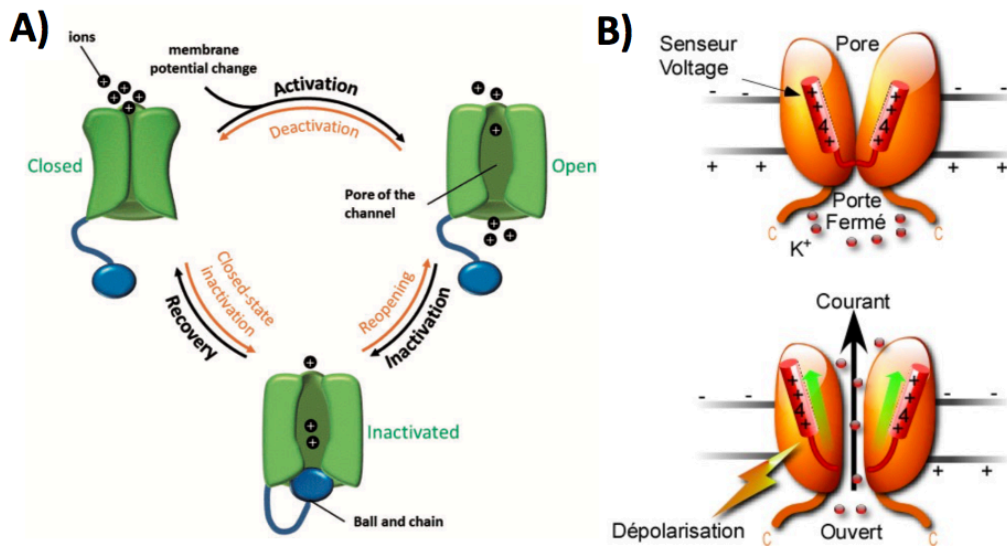
### 1.2.2.3 Gating

Classiquement, les canaux voltage-dépendants suivent une oscillation dynamique, précise et rapide entre 3 états différents : ouvert (O), fermé (F) et inactivé (I) (Fig. 8A) (Hinard et al., 2016). Ils peuvent ainsi générer des profils de signaux différents plus ou moins transitoires (Moreno et al., 2016).

À l'état natif, les canaux se trouvent principalement dans un état de repos dit « fermé » (F) avec une faible probabilité d'ouverture. Dans cet état, ils ne permettent pas les flux d'ions. En réponse à des changements du potentiel membranaire, la probabilité d'ouverture des VGICs augmente jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement au-dessus d'un potentiel défini pour chaque type de canal. Ce phénomène classiquement appelé « gating » correspond au passage des canaux dans un état dit « ouvert » (O). Au moment de l'ouverture des canaux, les ions diffusent à travers les pores de manière hautement efficace et sélective avec un débit supérieur à  $10^7$  ions par seconde, soit au moins 1000 fois plus rapide qu'une pompe à ions ( $10^2$  à  $10^3$  ions par sec). L'ouverture d'un canal ionique est un événement fugace, ce qui contribue à limiter les surcharges d'ions intracellulaires et à favoriser le maintien de l'homéostasie ionique cellulaire. Ainsi, quelques millisecondes après l'ouverture, des mécanismes d'inactivation stoppent les flux d'ions afin de limiter le déséquilibre ionique. À ce moment, les VGIC entrent dans un état de repos dit « inactivé » (I) ou désensibilisé, où ils ne peuvent plus répondre aux signaux pendant une courte période. De cette manière, un canal modifie la répartition des charges de part et d'autre du canal de manière rapide tout en ne laissant transiter que très peu d'ions (Fig. 8B). En conséquence, pendant les périodes d'ouverture d'un canal ionique, la concentration d'un ion particulier dans le cytoplasme dans son ensemble ne change pas l'homéostasie ionique de manière significative. En revanche, il a pu être montré que la concentration à proximité immédiate du canal est fortement modifiée produisant un changement très rapide du potentiel membranaire (Hinard et al., 2016; Hodgkin and Huxley, 1952).

Ces transitions des canaux voltage-dépendants sont essentielles pour un grand nombre de processus dans les cellules excitables et non-excitables, et donne la faculté aux cellules de s'adapter rapidement aux conditions environnementales.





**Figure 8 :** A) Illustration schématique des trois différents états ouverts, fermés et inactivés entre lesquels les canaux voltage-dépendants oscillent pour la génération de signaux électriques (Hinard et al., 2016) B) Représentation schématique du mécanisme d'ouverture du pore d'un canal voltage-dépendant en réponse à une dépolarisation de la membrane (Yannick, n.d.)

### 1.2.3 Les sous-familles des canaux voltage-dépendants

Comme nous avons pu le voir précédemment, la topologie des sous-unités des canaux voltage-dépendants permet de distinguer 7 grandes sous familles. La plupart des canaux ioniques de cette famille sont hautement sélectifs pour certains types d'ions spécifiques. Ils sont régulièrement caractérisés par leur sélectivité ionique et leur sensibilité au voltage tel que les canaux NaV, CaV, et KV, qui discriminent respectivement les ions sodium, calcium et potassium. D'autres canaux ioniques présentent un profil de sélectivité moins restreint, mais avec une sélectivité préférentielle pour un type d'ion aux dépens des autres comme les TRPs. On parle de canaux non sélectifs. On distingue ainsi 5 types de sélectivités chez les canaux voltage dépendants sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et cationiques non-sélectifs.

#### 1.2.3.1 Les canaux potassiques voltage-dépendants

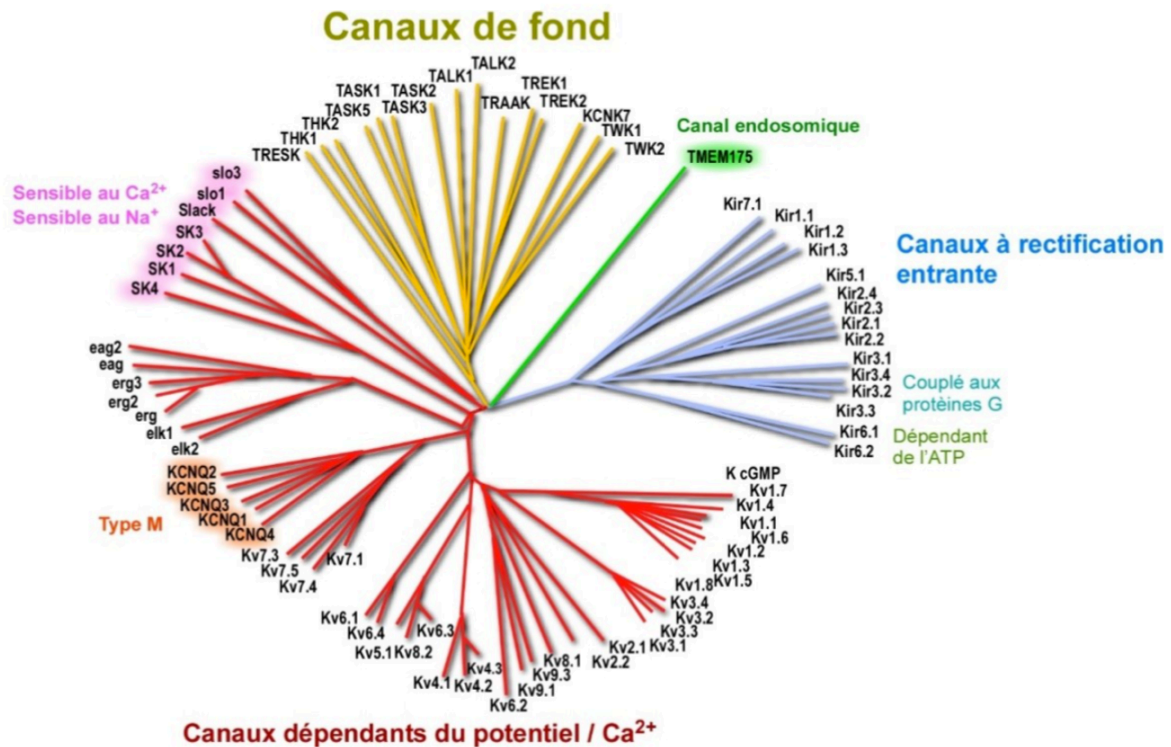
Parmi ces sous-classes, on distingue les canaux potassiques, une large famille de plus de 80 gènes codant les différentes sous-unités  $\alpha$  des canaux  $\text{K}^+$  chez les mammifères (Fig. 9). Ils disposent de la plus grande variabilité structurale et fonctionnelle parmi les canaux ioniques. Ils suivent typiquement le profil des canaux voltage-dépendants en s'assemblant par



l'intermédiaire du domaine T1 situé dans l'extrémité N-terminale autour d'un pore central pour former une structure en forme de « tipi inversé ». Ces canaux sont hautement sélectifs pour le potassium grâce à la séquence consensus TxGY(F/L)G contenue dans le cœur du filtre de sélectivité de la boucle P, signature typique des canaux potassiques. Ils permettent aux ions  $K^+$  de traverser la membrane de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule en suivant le gradient électrochimique. L'ouverture de ces canaux entraîne la diminution du potentiel membranaire (hyperpolarisation) des cellules par sortie de charges positives.

La famille des canaux potassiques voltage-dépendants est elle-même sous divisée en différents groupes basés sur des critères structuraux. On distingue principalement 3 grandes familles selon la topologie des domaines transmembranaires de leurs sous-unités :

- Les canaux possédant 2TMs, dits canaux à rectification entrante, composés de sous-unité  $\alpha$  avec 2 domaines transmembranaires flanquant une boucle formant le pore. Il s'agit principalement des canaux à rectification entrante dits «  $K^+$  inward rectifiers en anglais ou KiR ».
- Les canaux possédant 4TMs, dont les canaux « K2P » à deux domaines pore sont les chefs de file. Ces canaux sont composés de deux sous-unités  $\alpha$ , elles-mêmes composées de 4 domaines transmembranaires et de 2 boucles P. Ils sont responsables de la génération de courants dits « de fuite ». Ces canaux, à la différence des canaux purement voltage-dépendants, s'assemblent plutôt sous forme de dimères et non de tétramères pour former des canaux TWIK, THIK, TREK, TASK, TALK et TRESK.
- Les canaux possédant 6TMs composés des canaux purement voltage dépendants dits « KV » et des canaux activés par les ions « KCa » sensibles au calcium et « KNa » sensibles au sodium.

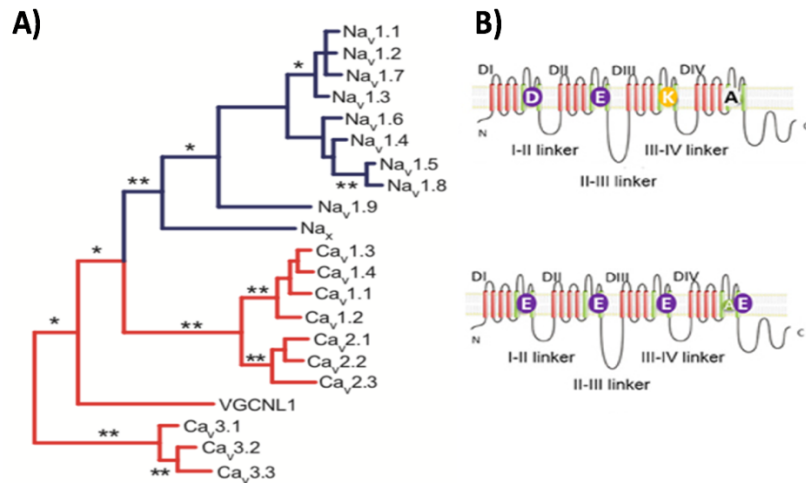


**Figure 9 :** Arbre phylogénétique des différentes sous-unités  $\alpha$  des canaux potassiques voltage-dépendants (Yannick, n.d.).

### 1.2.3.2 Les canaux calciques et sodiques voltage-dépendants

Ces deux sous-classes comprennent les sous familles des canaux CaV et NaV qui sont très similaires d'un point de vue structural et fonctionnel. Ils sont formés de quatre répétitions homologues en tandem d'une structure à 6 TMs, liés entre elles par des boucles intracellulaires dites linker (L1, L2 et L3) (Fig. 10). Ces structures s'assemblent en formant des pores perméables aux ions Na<sup>+</sup> « NaV » et Ca<sup>2+</sup> « CaV », avec une différence de sélectivité de l'ordre de 1000 entre sodium et calcium. Comme tous les canaux purement voltage-dépendants, les segments S4 sont sensibles au voltage. Les régions S5 et S6 avec la boucle P à l'interface sont situés face à la lumière du pore. Sur la base de leur similarité structurale et de séquence, les canaux NaV et CaV sont très proches d'un point de vue phylogénétique et disposent d'un ancêtre commun : le canal sodique bactérien NachBac. Au niveau du pore, les boucles P des deux familles sont très similaires. Pourtant, seuls quelques acides aminés permettent de générer des profils de sélectivité très différents. En effet, les résidus DEKA des NaV localisés sur les boucles P à l'interface avec le pore forment le filtre de sélectivité des canaux NaV aux ions Na<sup>+</sup>. À l'inverse, ces résidus responsables de la sélectivité au calcium des canaux CaV sont une tétrade de résidus Glutamates. Fonctionnellement, ces deux familles de canaux interviennent

principalement dans la genèse des potentiels d'action cardiaques et neuronaux. Les canaux NaV intervenant principalement dans la phase dépolarisante des potentiels d'action et les canaux CaVs ont un rôle prépondérant dans la forme typique des potentiels d'action cardiaques (Stephens et al., 2015).



**Figure 10 :** A) Arbre phylogénétiques et B) structure des sous-unités  $\alpha$  des canaux sodiques et calciques voltage-dépendants montrant les résidus importants pour la génération du profil de sélectivité (Stephens et al., 2015).

#### 1.2.4 Rôles physiopathologiques des canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines ubiquitaires, qui régulent une multitude d'étapes physiologiques de la vie cellulaire. Il est ainsi fréquent de constater leur implication dans de nombreuses pathologies notamment les troubles neuropsychiatriques, les maladies cardiovasculaires et métaboliques, les maladies immunologiques, les maladies néphrologiques, les maladies gastro-intestinales, les maladies respiratoires et de nombreux cancers. Les maladies qui résultent de la défaillance d'un ou plusieurs canaux ioniques sont regroupées sous le terme de « canalopathies », et font depuis de nombreuses années l'objet d'investigations poussées pour chercher et mettre en œuvre de nouvelles thérapies.

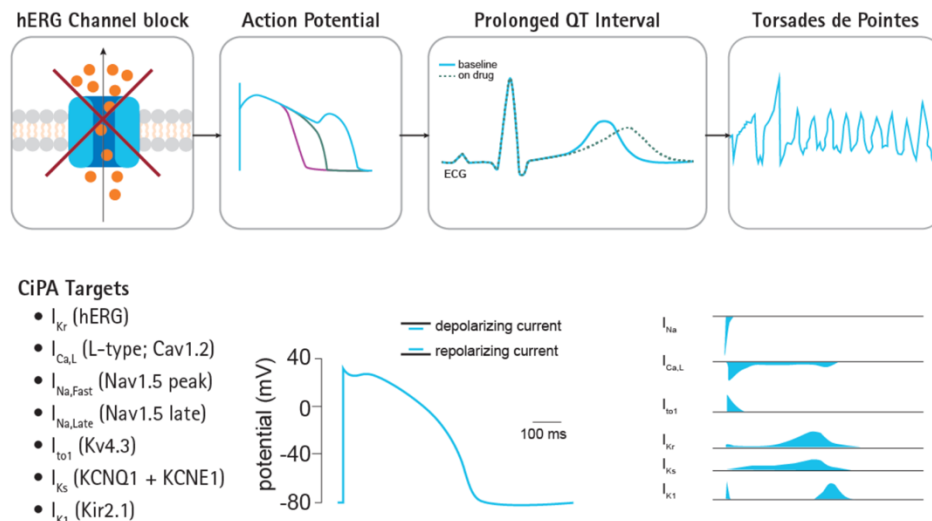
#### 1.2.5 Applications pharmaceutiques

Les canaux ioniques sont des cibles courantes pour de nombreuses toxines, des venins, des produits naturels et thérapeutiques dont la plupart ont été découverts durant l'âge d'or de la pharmacologie des canaux ioniques entre 1970 et 1990. La plupart de ces premières thérapies ciblant les canaux ioniques ont été développées sans connaissances précises des mécanismes moléculaires en jeu entre les composés et les canaux cibles. Comme par exemple, les

benzodiazépines, des modulateurs des canaux ioniques adoptés dans les années 1960. Durant des années, ils ont été utilisés sans savoir qu'ils agissaient par l'intermédiaire des récepteurs ionotropiques GABAA (Cheng et al., 2018). Néanmoins, cette période a permis de faire émerger une multitude de nouveaux agents thérapeutiques comme des anesthésiques locaux et de mettre en œuvre des nouveaux traitements pour des pathologies comme le diabète, l'hypertension, l'épilepsie, l'anxiété et la douleur. Ces découvertes ont constitué un réel moteur dans la volonté de chercher de nouvelles thérapies impliquant ces cibles.

Pourtant, depuis les années 1990, le nombre de nouveaux médicaments ciblant les canaux ioniques mis sur le marché ne cessent de diminuer. Ces médicaments ne représentent plus que 2,8 % du total sur les nouveaux médicaments découverts entre 2010 et 2015. Aujourd'hui, 18 % du marché des médicaments à petites molécules approuvés par la FDA se compose de médicaments ciblant les canaux ioniques alors que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) représentent 33 % de ce marché. Un constat contradictoire étant donné que les canaux ioniques représentent à eux seuls 19 % de l'ensemble des cibles protéiques humaines, soit la 1<sup>ère</sup> cible pharmacologique devant les RCPG (Santos et al., 2017).

Au-delà d'être une cible pharmacologique importante, les canaux ioniques sont d'une importance cruciale pour évaluer la sécurité et l'innocuité des médicaments avant que ces derniers ne soient mis sur le marché. À titre d'exemple, au début des années 2000, de nombreux médicaments ont été retirés du marché en raison d'effets secondaires, principalement cardiaques impliquant des canaux ioniques. Par exemple, des composés comme la Terfenadine, un anti-histaminique ou la Thiorodazine, un antipsychotique, entraînent le blocage du canal ionique humain KV11.1 connus sous le nom « hERG » (Hondeghe et al., 2011). Ce blocage retarde la repolarisation du potentiel d'action cardiaque qui est à l'origine du « syndrome du QT long » (Fig. 11). Ce syndrome est caractérisé par un phénomène de torsades de pointes qui peut conduire à une arythmie potentiellement mortelle (Vandenberg et al., 2012). Par conséquent, lors du processus de recherche de nouveaux médicaments, les composés peu importe leur cible, sont évalués sur ces canaux d'une importance vitale avant d'entrer en phase d'essais cliniques lors d'une phase dite d'évaluation sanitaire.



**Figure 11 :** Certains canaux ioniques comme hERG sont importants pour la génération des potentiels d'action cardiaques. Une défaillance de ces canaux est susceptible de provoquer des problèmes dans la régulation du rythme cardiaque. Lors des phases d'essais cliniques, les effets des nouveaux médicaments sont ainsi évalués par « sécurité » sur ces cibles. Lorsqu'un composé cible l'un des canaux présentés ci-dessus, il peut affecter l'intervalle QT du potentiel d'action cardiaque et entraîner des torsades de pointes « TdP » d'après <sup>1</sup>.

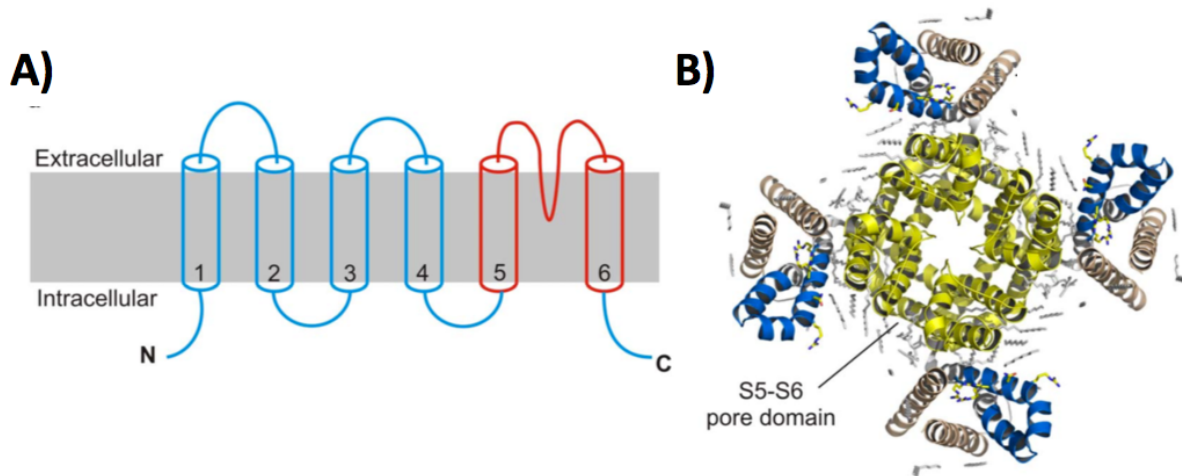
Progressivement, de plus en plus de dysfonctionnements des canaux ioniques sont identifiés et désignés comme responsables de pathologies. Ces protéines font ainsi l'objet de nombreuses études fondamentales dans la recherche publique et au sein des entreprises pharmaceutiques. Avec le temps, ils sont devenus des cibles pharmacologiques incontournables. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles techniques d'investigation adaptées, sensibles et rapides pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces pathologies et effectuer des campagnes de criblage pour identifier de nouvelles molécules thérapeutiques.

### 1.3 Les canaux à récepteur de potentiel transitoire

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude des canaux TRPs. Parmi la grande famille des canaux voltage-dépendants, la sous-famille des canaux TRP est celle qui a le moins de point commun avec les autres VGIC. Même si d'un point de vue structural, les unités de base composées de 6 TMs sont similaires aux canaux KV (Fig. 12), les TRPs sont décrits comme des canaux cationiques non-sélectifs qui ne

<sup>1</sup> <https://www.eurofinsdiscovery.com/services/in-vitro-assays/ion-channels/cardiac-safety>

sont que très faiblement voltage-dépendant. Ces différents aspects ont constitué des critères de choix pour établir les caractéristiques structurales et fonctionnelles des protéines appartenant à la famille des canaux ioniques TRP.



**Figure 12 :** Structure de base des sous-unités des canaux TRP. **A)** Les monomères sont très similaires aux canaux de type KV, et constitués d'un domaine pore (en rouge) et un domaine de type VSD like. **B)** Vue architecturale de la structure cristalline du canal KV1.2 qui a été utilisé pour déduire la structure des canaux TRP avec le domaine S4 en bleu et le domaine pore en jaune. (Latorre et al., 2007)(Kalia and Swartz, 2013)

### 1.3.1 Historique des canaux TRP

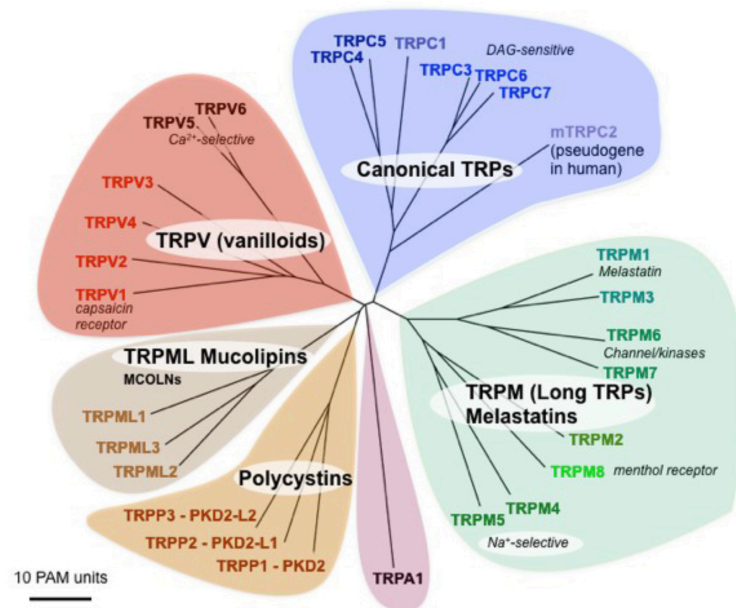
En 1969, Cosens et Manning identifient un mutant de la drosophile présentant une anomalie de détection de la lumière (Cosens and Manning, 1969). À la différence de son homologue sauvage qui répond de façon soutenue et continue à la lumière prolongée, le mutant entraîne une réponse transitoire des cellules photo-réceptrices. Cette réponse transitoire du mutant résulte de l'absence d'une copie fonctionnelle d'un gène qui fut ainsi renommé récepteur de potentiel transitoire. En 1975, Minke conduit l'identification moléculaire du gène responsable de cette réponse transitoire, qui sera ainsi dénommé TRP pour « Transient Receptor Potential » (Minke and al, 1975). Quatorze ans plus tard, Montell et Rubin montrent que le remplacement du gène TRP mutant par celui d'une lignée sauvage d'origine rétablit le signal soutenu et continue à la lumière prolongée chez la drosophile. Ils ont ensuite cloné la séquence de ce gène TRP responsable du phénotype chez la drosophile pour effectuer les premières études sur une protéine TRP. Ils montrent, qu'en absence de  $Ca^{2+}$  remplacé par  $La^{3+}$ , la protéine TRP sauvage pouvait imiter le phénotype trp mutant. Ils proposent donc que la protéine TRP

soit un canal calcique qui, contrairement à ce que sa dénomination indique, ne présente pas de réponse transitoire, et qui sera confirmé plus tard par un enregistrement voltage-clamp en cellule entière (Montell and Rubin, 1989). À partir des années 1990 et jusqu'au début des années 2000, de nombreux nouveaux canaux dits TRP-like, présentant des homologies de séquence avec les canaux TRP de drosophile, furent identifiés et répartis au sein de 6 nouvelles sous-familles de canaux TRP (Phillips et al., 1992). Depuis leur découverte, les canaux TRP ont été identifiés dans un large éventail d'organismes vivants allant des mammifères jusqu'aux champignons et aux algues vertes, preuve que ces canaux remplissent un rôle essentiel pour le vivant. Chez l'homme, l'existence des canaux TRP a été mise en évidence pour la première fois en 1997, grâce aux travaux de Caterina réalisés au sein du Laboratoire de David Julius (Caterina et al., 1997). Ces chercheurs ont, en particulier, mis en évidence le rôle de TRPV1, nommé « VR1 » comme récepteur périphérique à la capsaïcine (CAPS), une molécule responsable de la sensation de chaleur et de picotement provoquée par les piments, et à la chaleur nocive (>42°C). TRPV1 fut le premier membre de cette sous-famille à être cloné et caractérisé. Ces travaux ont depuis fait l'objet du prix Nobel de physiologie et médecine de 2021 dont David Julius et Ardem Patapoutian sont co-récepteurs.

### 1.3.2 Phylogénie des canaux TRP

À ce jour, la super famille des canaux TRP compte 28 membres dont 27 sont présents chez l'homme (Fig. 13). À la différence des autres familles de canaux, les membres de cette famille TRP ne présentent que 20 % d'homologie entre eux. Ils remplissent des fonctions diverses, peu redondantes et disposent d'un niveau élevé de sélectivité du ligand. La famille des canaux TRP est ainsi principalement caractérisée selon les homologies de structure de ses membres. Les protéines de cette famille présentent une topologie commune avec une structure quaternaire tétramérique où chaque sous-unité  $\alpha$  est constituée de six hélices transmembranaires (TM) « S1 à S6 » séparés par des boucles. La boucle située entre le cinquième et le sixième segment transmembranaire est impliquée dans la formation des pores. Les extrémités N- et C-terminales des monomères des canaux TRP sont cytoplasmiques. En ce sens, les canaux TRP présentent certaines similitudes avec les canaux potassiques « KV » voltage-dépendants dans la topologie transmembranaire globale, la séquence du filtre de sélectivité et l'organisation des sous-unités  $\alpha$  (Palovcak et al., 2015). Toutefois, contrairement à ces derniers qui sont voltage-dépendants, les canaux TRP ne disposent pas des acides aminés chargés positivement dans leur

domaine S4 et sont donc très faiblement sensibles au voltage (Nilius et al., 2005; Wu et al., 2010).

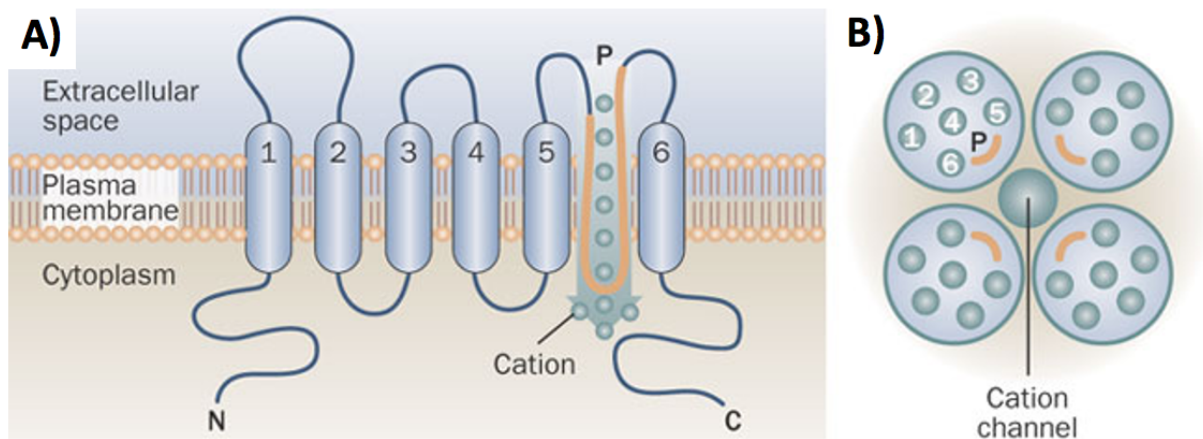


**Figure 13 :** Arbre phylogénétique des 6 différentes sous-familles des canaux TRP. D'après (Clapham, 2003).

### 1.3.3 Structure et fonctions des canaux TRPs

Comme la plupart des canaux voltage-dépendants, les TRPs sont des tétramères de sous-unités  $\alpha$ . Dans le plan des membranes biologiques, les quatre sous-unités TRP s'assemblent autour d'un pore, dont les PDs, issus des domaines S5, de la boucle P et S6 de chaque sous-unité constituent l'interface (Fig. 14). Lors de leur assemblage, les canaux TRPs adoptent une conformation non-conductrice. Dans cette conformation, la moitié cytosolique de la voie de passage des ions est obstruée par les hélices S6 à l'interface des pores. Cette région est la mieux conservée en termes d'homologie de séquence au sein de la famille TRP, ce qui, associé aux données structurales obtenues sur l'ensemble des membres de la famille des TRP, suggère que le mécanisme général d'ouverture et de fermeture des pores est conservé dans toute la famille TRP.





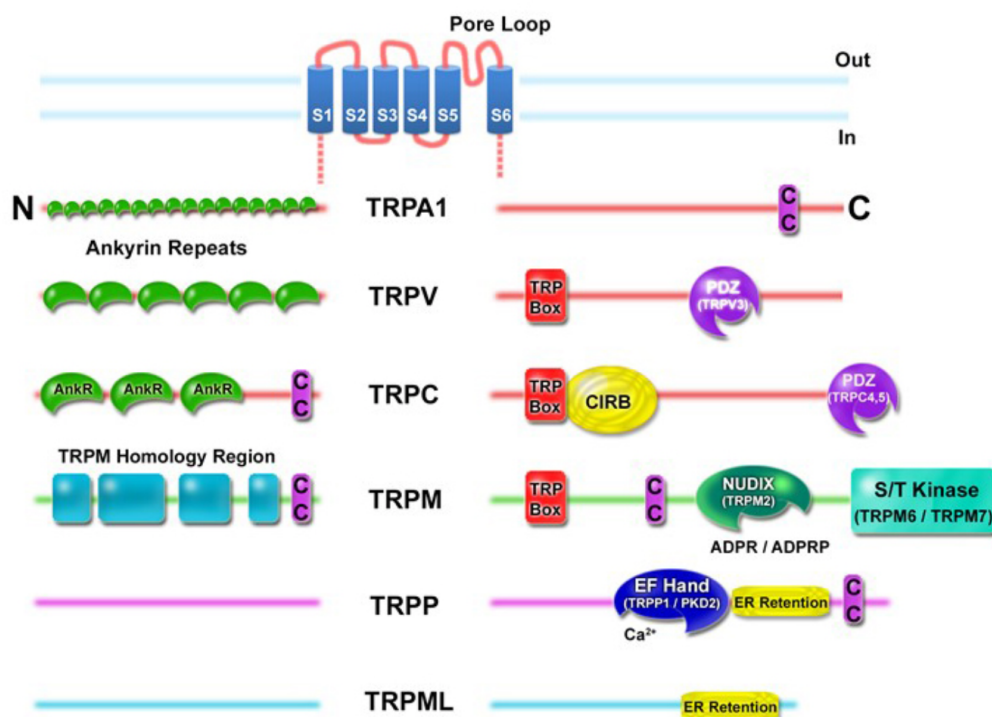
**Figure 14 :** Structure d'un canal TRP. **A)** Représentation schématique d'une sous-unité. La boucle P entre les domaines 5 et 6 est impliquée dans la formation du pore perméable aux cations. Les extrémités N- et C- terminales sont cytoplasmiques. **B)** Représentation schématique de la structure quaternaire d'un canal TRP formé de 4 sous-unités formant le pore au centre de la structure. D'après (Woudenberg-Vrenken et al., 2009).

Chez l'humain, les canaux TRPs ont deux fonctions principales. Les TRPs sont des canaux cationiques non-sélectifs et des récepteurs polymodaux de l'environnement cellulaire. Grâce à ces deux fonctions, ils permettent aux cellules de détecter une myriade de stimuli physico-chimiques environnementaux tels que les changements de température, de la pression, l'acidité, l'osmolarité, ainsi qu'une grande variété de ligands. Face à ces stimuli, les canaux TRPs (i) subissent un changement de leurs conformations tertiaires et quaternaires, (ii) s'ouvrent pour faciliter la diffusion des cations et (iii) assurent la transduction de signaux extracellulaires en cascade de signalisation calcique intracellulaire. Ils font partie des principaux récepteurs et transducteurs de signaux moléculaires et physiques environnementaux. Ils sont donc particulièrement présents dans les neurones somato-sensoriels au niveau des terminaisons neuronales situées dans la peau et en lien direct avec le système nerveux. Les TRPs sont ainsi le plus grand groupe de récepteurs qui fonctionnent comme des détecteurs de stimuli nocifs parmi les nocicepteurs.

#### 1.3.4 Sous-familles de TRP

La plupart des 28 membres des canaux TRPs ont peu de fonctions en commun. Leurs différences fonctionnelles tiennent principalement à la différence de composition de leurs extrémités N- et C- terminales cytoplasmiques, qui présentent des profils de tailles et de compositions variées. Ces extrémités sont composées de multiples motifs et séquences

consensus pour permettre (i) la multimérisation, (ii) l'interaction avec des protéines partenaires comme la calmoduline, (iii) la liaison à des protéines régulatrices comme les kinases, et iv) le déclenchement des canaux (Fig. 15). Ces différences ont ainsi constitué la base pour subdiviser la superfamille des canaux TRPs humains en sous-familles selon l'homologie, la topologie et le rôle fonctionnel des séquences contenues dans leurs extrémités N- et C- terminales. Les canaux TRPs des mammifères sont ainsi répartis en six sous-familles : TRPC (canonique), TRPV (vanilloïde), TRPM (mélastatine), TRPP (polycystine), TRPML (mucolipine) et TRPA (ankyrine) dont nous allons présenter les caractéristiques.



**Figure 15** : Topologie des sous-unités  $\alpha$  des canaux TRP composés des 6 domaines transmembranaires et composition des extrémités N et C terminal cytoplasmiques des différentes sous-familles de TRP et permettant la constitution des sous familles (d'après Clapham 2003).

#### 1.3.4.1 TRPM (Melastatine)

Les canaux TRPM (pour « mélastatine ») ont été nommés en rapport avec le premier membre découvert de cette sous-famille, TRPM1, qui joue un rôle important dans la progression des métastases des mélanosomes. Depuis, 8 membres « M1 à M8 » avec des fonctions très différentes ont été identifiés sur la base de leurs extrémités N- et C- terminales

communes. Les canaux TRPM partagent une longue extrémité N- terminale d'environ 700 acides aminés composée de quatre régions d'homologie élevée et d'un motif de type « super hélice ». En C- terminal, juste après le dernier segment transmembranaire, les TRPM disposent de la boîte TRP ou « TRP box », une séquence de 25 acides aminés conservée en forme d'hélice alpha parallèle à la membrane, qui interagit avec les domaines S4-S5 et joue un rôle critique comme modulateur allostérique (Liao et al., 2013). Cette TRP box est présente chez la majorité des canaux TRP à l'exception des sous-familles TRPA qui disposent d'un domaine TRP like et TRPP qui n'en ont pas. Ce domaine TRP est composé sur les 5 premiers acides aminés, d'une séquence consensus hydrophobe « WKFAR » et se termine par une région riche en proline. En C-terminal, les TRPM contiennent un autre domaine de type « super hélice ». Fonctionnellement, les protéines TRPM sont impliquées dans un large éventail de processus biologiques, tels que les réponses au stress oxydatif (TRPM2), l'activation des cellules T (TRPM4), le goût (TRPM5), l'homéostasie du magnésium (TRPM6 et TRPM7) et la sensation de la température comme TRPM8 qui est activé par des températures « froides » (8 à 25 °C) et des agents « rafraîchissants » tels que le menthol, l'eucalyptol et l'iciline (Kraft and Harteneck, 2005; Phelps and Gaudet, 2007).

#### 1.3.4.2 TRPA (Ankyrine)

Composé uniquement du canal TRPA1, cette sous-famille est nommée ainsi par la présence caractéristique dans son extrémité N- terminale d'un très grand domaine répété de 14 motifs ankyrine. Les domaines ankyrine sont de longs motifs de 33 acides aminés impliqués dans les interactions protéiques et l'adressage vers la membrane plasmique. A l'autre extrémité il contient dans son domaine C- terminal un motif de type super hélice et un domaine dit TRP-like, critique pour la liaison des ligands. Comme tous les TRP, c'est un canal polymodal. Il est capable de ressentir de nombreux stimuli comme l'étirement de la membrane, le stress oxydatif, les canabinoïdes, le menthol, l'iciline et des lipides endogènes. Il est également activable par des températures chaudes et froides. Il est donc thermo-sensible et joue à ce titre un rôle prépondérant dans la thermosensation (Laursen et al., 2015).

#### 1.3.4.3 TRPP (Polycystine) et TRPML (Mucolipine)

Ces deux sous-familles sont parmi les moins représentées et les moins étudiées chez les TRPs. Les TRPP dits polycystine sont ainsi nommés car certains de leurs mutants sont

impliqués dans la polykystose rénale. On peut également les retrouver sous le nom PDK pour *polycystic kidney disease*. Dans cette famille, on peut retrouver des canaux avec une structure TRP typique comme les TRPP2, TRPP3 et TRPP5 faisant partis du sous-groupe PKD2. D'autres canaux de cette sous-famille forment un sous-groupe très atypique et très éloigné des TRP conventionnels, les PKD1. Les PKD1 sont des protéines beaucoup plus grosses avec 11 segments transmembranaires, dont 6 ont un niveau d'homologie élevé avec les autres TRPs, confirmant qu'ils sont bien apparentés (Bezares-Calderón et al., 2018; Hanaoka et al., 2000; Wang et al., 2019).

Les TRPML (pour mucolipines) tirent leur nom de la mucopolidose IV. Une maladie neurodéveloppementale dans laquelle un mutant du gène qui code pour le canal TRPML1 est impliqué. Cette sous-famille est constituée de 3 membres (TRPML1–3) encore mal caractérisés et dont les fonctions sont à l'heure actuelle encore floues.

Ces deux familles TRPP et TRPML sont des canaux TRP particuliers. A la différence des autres membres, ils disposent dans leurs extrémités C- terminales d'un domaine de rétention dans le réticulum endoplasmique. Ils sont donc principalement exprimés dans les compartiments intracellulaires et sont de ce fait peu étudiés.

#### 1.3.4.4 TRPC (Canonique)

Les canaux TRPC (pour « canoniques ») sont des analogues du canal TRP d'origine photosensible découvert chez la drosophile (cf chapitre 1.3.1). Ils sont également connus sous le nom de « TRP courts ». Ils sont composés de 7 membres (TRPC1 à 7) qui furent parmi les premiers canaux TRPs identifiés. Ils restent cependant, la sous-famille la moins bien caractérisée à ce jour. Ils diffèrent des autres TRPs de par la composition de leurs extrémités N- et C- terminales. Ils disposent ainsi de 3 à 4 motifs ankyrine répétés près de l'extrémité N-terminale et d'un motif de type « boîte TRP » à l'extrémité C- terminale proximale. Chez les mammifères, les canaux TRPC présentent des propriétés distinctes et interagissent entre eux pour former des canaux homomériques ou hétéromériques possédant des modes de régulation et des fonctions physiologiques différentes (Putney, 2004). Ils sont en partie localisés et régulés dans des micro-domaines de signalisation  $Ca^{2+}$ , où ils fonctionnent comme des canaux opérant principalement dans le stockage des ions calciques. Ils limitent ainsi les effets de surcharge en ions calciques cytoplasmiques susceptibles de déclencher des cascades d'événements cellulaires comme l'apoptose. Ils sont activés par des ligands et des mécanismes dépendant de la phospholipase C (PLC), comme la génération d'IP3 et de Diacylglycérol (DAG) par

l'hydrolyse de PIP2. Ceci est particulièrement important dans le système nerveux des mammifères où les canaux TRPC sont soumis à une forte modulation par l'interaction  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (Lucas et al., 2003).

Les canaux codés par les gènes TRPC sont cationiques et non sélectifs, permettant le passage de cations monovalents et divalents. Tous les TRPC, à l'exception de TRPC6, s'activent par épuisement des sites de stockage des ions calciques, indépendamment de la formation d'IP3 ou de DAG. Ce mode d'activation nécessite que le TRPC étudié soit exprimé à de faibles niveaux. (Kiselyov K et al., 1999)

#### 1.3.4.5 TRPV

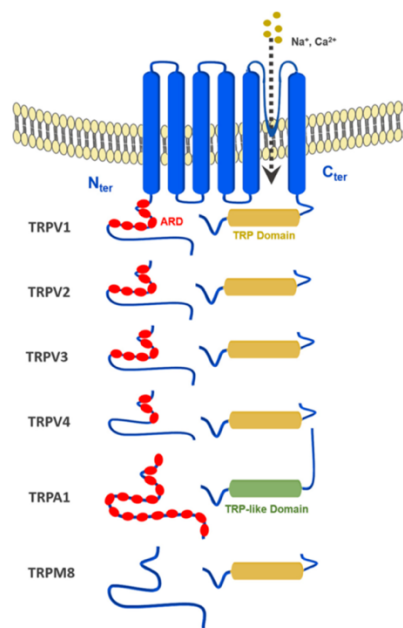
Les canaux TRPV (pour « vanilloïde ») sont ainsi dénommés en raison de leurs ligands activateurs dont la plupart sont des vanilloïdes, produits composés du groupe chimique vanillyle. Également connu sous le nom de canal TRP sous-famille V, ils sont composés de 6 membres « TRPV1-6 ». Ils sont généralement divisés en deux groupes : les thermoTRPs (TRPV1-4), sensibles à la température, et les canaux TRPV5-6 qui présentent une sélectivité élevée pour le calcium avec une perméabilité  $\text{PCa/PNa} > 100$ . Les canaux TRPV5 et 6 sont très exprimés dans les reins et les intestins pour la réabsorption du calcium. Les TRPV contiennent dans leur extrémité N-terminale 6 domaines répétés d'ankyrine (ARD) essentiels aux interactions fonctionnelles de ces canaux. À l'opposé, ils disposent en C-terminal de la TRP box et des motifs d'interactions pour des protéines comme la calmoduline et le domaine PDZ impliqués dans l'adressage aux différents compartiments (Pumroy et al., 2020).

Parmi eux, le canal TRPV1 est à l'heure actuelle le membre le plus connu. Il est à l'origine de nombreuses découvertes fondamentales majeures sur la thermo- et la mécanosensation, et est un élément central de cette thèse. Il est un représentant majeur des thermoTRPs avec TRPV2, 3 et 4 qui, au-delà de leur rôle central dans la sensation thermique, sont également impliqués dans de nombreux autres mécanismes essentiels comme le contrôle de l'osmolarité et l'homéostasie calcique.

#### 1.3.5 Structures et fonctions des thermoTRPs

Comme nous avons pu le voir précédemment, il existe au sein des différentes sous-familles une classe particulière de récepteurs TRPs dont l'activité est extrêmement sensible à la température. On parle de la sous-famille des « thermoTRPs » (Fig. 16) (Ferrandiz-Huertas et

al., 2014; Ferrer-Montiel et al., 2012). Les canaux thermoTRPs regroupent ainsi 6 acteurs majeurs « historiques » à savoir TRPM8, TRPA1 et TRPV 1 à 4, parfois accompagnés de TRPM2, M4 et M5. Ce sont des capteurs polymodaux répondant à une large gamme de stimuli physiques et chimiques, tels que la tension transmembranaire, les ligands, l'acidité et donc la température. Chaque membre possède ainsi son propre seuil d'activation à la température (Kashio, 2021; Voets et al., 2004) pour couvrir tout le spectre de température s'étalant du froid nocif (< 15 °C) à la chaleur nocive (> 42 °C). Ils sont également activés par des composés naturels ou synthétiques spécifiques, entraînant des sensations thermiques et douloureuses pertinentes chez l'humain.



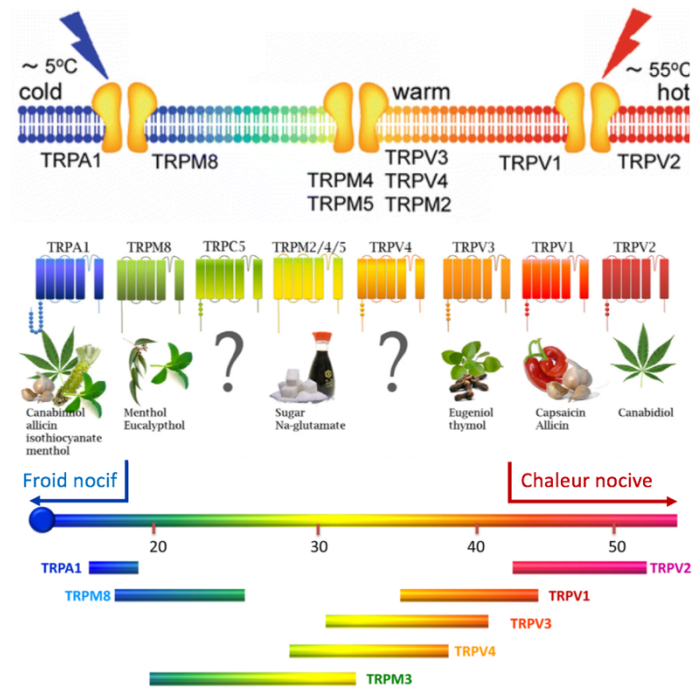
**Figure 16 :** Topologie des sous-unités  $\alpha$  des canaux thermo-TRPs

La thermosensation est une fonction sensorielle essentielle à la survie des espèces. Elle permet d'éviter d'endommager les tissus cellulaires de façon irréversible en entraînant une réaction d'évitement lorsque le corps se retrouve exposé à une température extrême. Cette thermosensation est un processus qui s'exerce en permanence par l'intermédiaire des canaux thermo-TRPs exprimés dans les fibres nerveuses de type A et C des neurones sensoriels ganglionnaires de la racine dorsale dits « DRG » et trijumeaux innervant la peau, ainsi que dans les cellules de la peau comme les kératinocytes pour TRPV3 et 4 (Peier et al., 2002). Les thermoTRPs donnent ainsi la capacité aux organismes vivants de percevoir les conditions thermiques environnementales. Par l'intermédiaire de cette fonction, ils jouent également un rôle prépondérant dans les mécanismes de thermorégulation des organismes pour maintenir la température corporelle humaine autour de 37 °C en régulant l'homéostasie thermique. Par

conséquent, les thermoTRPs servent de thermomètres moléculaires dans différentes populations cellulaires du système sensoriel périphérique (Fig. 17). Classiquement, chaque canal TRP thermiquement sensible présente un seuil d'activation unique in vitro ; par exemple, TRPV1, 2, 3 et 4 sont activés à des températures supérieures à ~43 °C, ~50 °C, 33 °C et 27 °C respectivement, alors que TRPM8 et TRPA1 sont activés par des températures inférieures à ~25 °C et ~17 °C, respectivement (Caterina, 2007). Grâce à leurs différents seuils de détection de la température et leur expression hétérogène, les thermo-TRPs sont les thermomètres biologiques de notre corps.

En plus de leur rôle de thermomètre biologique, les thermo-TRPs s'activent en réponse à de nombreux autres stimuli comme des composés chimiques naturels (menthol, camphre, « piment »), des stimuli mécaniques ou des changements dans la composition de la bicouche lipidique. Lorsqu'ils sont ciblés par des médiateurs et ligands chimiques, les flux d'ions s'activent entraînant des dépolarisations et des potentiels d'action dans les neurones qui excitent les nerfs sensoriels, un phénomène connu sous le nom de « chemesthésie ». Lors du traitement par le cerveau, ces potentiels d'action sont interprétés comme des sensations de chaleur piquante (capsaïcine) ou de froid rafraîchissant (menthol) en agissant par exemple par le biais du canal TRPV1 sensible à la chaleur et du canal TRPM8 sensible au froid, respectivement.

Les canaux thermoTRP sont des biocapteurs biologiques répandus dans de nombreuses autres cellules où ils servent de détecteur de stimuli variés autre que la température. Selon le type cellulaire, ils permettent divers processus physiologiques comme la photoréception, la détection des phéromones, la perception du goût, la perception de la douleur et la mécanosensation. En tant qu'intégrateurs de cette large gamme de stimuli, ils sont régulièrement qualifiés de récepteurs polymodaux de stimuli environnementaux et des voies de signalisation. Le dysfonctionnement de ces canaux contribue à l'hyperalgésie thermique et à l'allodynie dans des conditions pathologiques douloureuses telles que l'inflammation ou le cancer. Pour toutes ces raisons, les thermo-TRPs sont des cibles intéressantes pour le développement de composés à visée thérapeutique.



**Figure 17 :** Les canaux thermoTRPs des thermomètres moléculaires (Baez et al., 2014).

### 1.3.6 TRPV1

Parmi l'ensemble des canaux TRPs, le canal Transient receptor potential vanilloid 1 « TRPV1 » fut le premier membre fondateur de la famille des TRPV (vallinoids). Il a été caractérisé, il y a 25 ans dans les cellules humaines au sein du laboratoire de David Julius qui reçut le prix Nobel de physiologie et médecine 2021 pour ces travaux (Caterina et al., 1997). Depuis, TRPV1 est devenu le membre de la famille TRP le plus étudié et un modèle d'étude pour de nombreux laboratoires académiques comme privés.

#### 1.3.6.1 Structure

Le canal TRPV1 fonctionnel est composé d'un tétramère de sous-unités  $\alpha$  de 838 acides aminés, qui présente des caractéristiques similaires à celles des canaux voltage-dépendants comme les Shaker (KV), les canaux K1 activés par hyperpolarisation (HCN) et le canal voltage-dépendant bactérien ancestral KcsA. Mais contrairement aux VGICs comme les canaux KV, l'activité de TRPV1 n'est pas fortement dépendante du potentiel membranaire en raison de l'absence des résidus chargés positivement dans le domaine S4 (Zheng, 2013). Les sous-unités  $\alpha$  contiennent 6 domaines transmembranaires reliés par des boucles intra- et extra- cellulaires. Les boucles situées entre les domaines S5 et S6 sont responsables de la formation des pores

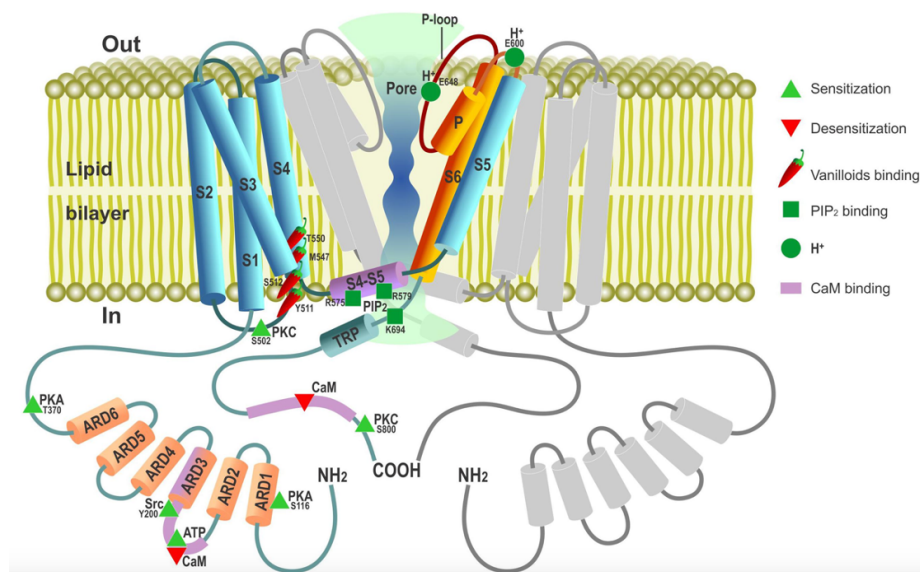


plus large vers l'extérieur et du filtre de sélectivité plus court qui conduit les cations au sein du tétramère.

Les deux extrémités N- et C- terminales de chaque sous-unité sont cytoplasmiques et contiennent de très grands domaines importants pour les fonctionnalités du canal. Ils servent de site de liaison à certains ligands régulateurs comme les lipides endogènes et maintiennent la structure du tétramère. L'extrémité N- terminale contient 6 domaines de répétitions ankyrine capable de lier à la fois l'ATP et la calmoduline, ainsi que de nombreux sites de phosphorylation (Lishko et al., 2007). De l'autre côté, l'extrémité C- ter contient des sous domaines impliqués dans différentes fonctions des canaux :

1. Les déterminants favorisant la tétramérisation des sous-unités (Latorre et al., 2007),
2. Le domaine TRP impliqué dans le gating du canal (Valente et al., 2008),
3. Un domaine de liaison à la calmoduline qui joue un rôle critique dans les mécanismes de désensibilisation du canal après des stimulations répétées (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004),
4. Des séquences consensus pour les phosphoinositides et les kinases (Caterina et al., 1997; Shuba, 2021).

Les stimuli activateurs de TRPV1 sont nombreux : capsaïcine, vallinoïdes, température, pH. Ces stimuli ciblent des sites dans toute la protéine (Fig. 18). Ils sont détectés par des régions précises de la protéine et entraînent un remodelage structural important de la région située à proximité, lequel se répercute ensuite sur l'ensemble de la conformation du pore, provoquant son ouverture. De cette manière, TRPV1 catalyse un afflux localisé d'ions sodium et d'ions calcium qui dépolarise la membrane jusqu'à atteindre le seuil d'activation du potentiel d'action des canaux voltage dépendant comme les canaux NaVs.



**Figure 18 :** Représentation schématique de la structure secondaire détaillée de TRPV1 dans la membrane plasmique comprenant les régions importantes pour la régulation fonctionnelle de l'activité de TRPV1 comme les sites de liaison pour ses ligands. L'extrémité N-terminale contenant 6 domaines répété d'ankyrine avec des sites de liaison pour la calmoduline et l'ATP. L'extrémité C-terminale contient le domaine TRP ainsi que des sites de liaison pour la PIP2 et la CaM. Plusieurs sites de phosphorylation pour la PKA, la PKC et la CaMKII, en plus des sites de liaisons de la capsaïcine et des protons ont été décrits. CaM : calmoduline, ATP : adénosine triphosphate, PIP2 : phosphoinositide 4,5-bisphosphate, PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, CamKII :  $\text{Ca}^{2+}$ /kinase II dépendante de la calmoduline. D'après (Shuba, 2021).

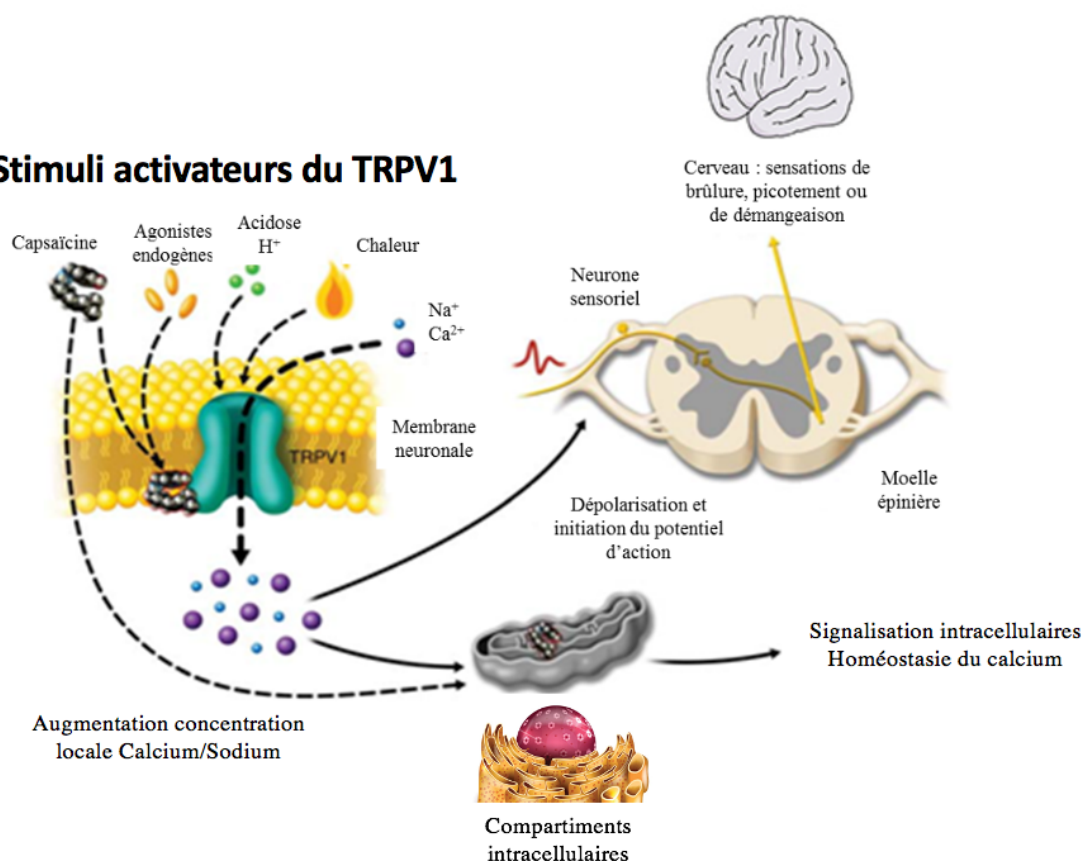
### 1.3.6.2 Expression et fonctions

TRPV1, comme tous les thermoTRP est un canal cationique dit « non-sélectif », mais présentant une sélectivité préférentielle pour le calcium avec un ratio de perméabilité  $P(\text{Ca})/P(\text{Na})$  d'environ 10 (Ahern, 2005; Caterina et al., 1997). Il est exprimé de façon prépondérante dans les nocicepteurs, des neurones primaires spécialisés dans le traitement des informations à caractère douloureux comme les DRGs et les neurones trijumeaux. Ils sont principalement présents au niveau des terminaisons nerveuses contenues dans la peau. Il est ainsi en première ligne pour remplir son rôle de capteur multimodal de stimuli nociceptifs et d'intégrateur moléculaire de la douleur. Grâce à ce rôle, il induit des mécanismes de défense comme certains réflexes d'évitement de la douleur, des blessures et de dommages aux tissus. L'expression de TRPV1 est également observée dans des régions spécifiques du SNC (Menigoz,

A et Boudes, M 2011), des sites non-neuronaux tels que le système vasculaire (Sand et al., 2015), l'épithélium de la vessie et des poumons et dans les cellules ciliées de la cochlée. Sur ces sites, l'activation de TRPV1 a été associée à des pathologies comme les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, la cystite, l'asthme et la perte auditive. Dans certaines pathologies comme le diabète, la suractivité du canal TRPV1 a été associée à des syndromes de douleurs inflammatoires chroniques et à une neuropathie périphérique, laissant penser à un rôle important de TRPV1 dans ce type de pathologie (Brito et al., 2014). Les études pharmacologiques et knock-out qui ont suivi, ont confirmé son rôle pivot dans la physiologie de la douleur.

Par conséquent, TRPV1 fait l'objet de nombreuses études fonctionnelles, de biologie structurale et de pharmacologie dans le but d'identifier des composés qui régulent son activité (Fig. 19). TRPV1 est donc le membre le mieux caractérisé de la famille des TRPs, du fait de son rôle et des applications pharmacologiques potentielles que cela implique. Aujourd'hui encore, il est toujours considéré comme une cible pharmacologique importante, pour les médicaments analgésiques, les hyperalgésies, l'allodynie et l'ostéoporose. À terme, trouver des médicaments qui modulent spécifiquement l'activité du canal TRPV1 pourraient permettre de traiter des affections allant de la douleur chronique à la perte auditive.

## Stimuli activateurs du TRPV1



**Figure 19 :** Principaux événements activateurs de TRPV1 entraînant la nociception. Les stimuli nociceptifs induisent l'activation des canaux TRPV1 entraînant une dépolarisation de la membrane pouvant générer des potentiels d'actions. L'information est envoyée jusqu'au cerveau pour être traitée et traduite en une sensation de douleur (Anand et Blzy, 2011 ; Dai, et al, 2016).

### 1.3.6.3 Thermosensation et thermorégulation

Dans les cellules, les canaux TRPV1 servent principalement de capteurs de chaleur. Ils sont activés par des températures dont le seuil a été déterminé expérimentalement à 43 °C et provoque l'induction de la douleur in vivo. Lors d'une exposition à des températures supérieures à 40 °C, la chaleur augmente les courants de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules exprimant TRPV1 et entraîne une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> (Caterina, 2000). Cette augmentation peut être bloquée par un prétraitement avec des antagonistes sélectifs du canal TRPV1 (Gavva, 2008). Dans les DRG TRPV1 knock-out, le seuil de sensibilité à la température est décalé à plus de 50°C confirmant le rôle essentiel de TRPV1 dans la thermo-sensation (Yonghak et al., 2020).

En parallèle de son rôle de thermo-senseur, TRPV1 joue un rôle indépendant dans la régulation de la température corporelle (Montell and Caterina, 2007). Il a été montré, que certains agonistes spécifiques de TRPV1 entraînent une diminution générale de la température corporelle (Holzer, 2008). La capsaïcine son ligand spécifique diminue de façon transitoire, la température corporelle chez différentes espèces, dont l'homme (Romanovsky et al., 2009). À l'inverse, en étudiant la capacité des antagonistes de TRPV1 à inhiber l'hypothermie induite par la capsaïcine, il a été observé que certains d'entre eux provoquaient une hyperthermie (Gavva, 2008; Gavva et al., 2007, 2005). Cette hyperthermie provoquée par les antagonistes hautement puissants et sélectifs de TRPV1, comme l'AMG-517, serait due à une vasoconstriction qui (i) minimise la perte de chaleur par la peau, et (ii) entraîne une augmentation de la production de chaleur métabolique par thermogénèse (Yonghak et al., 2020).

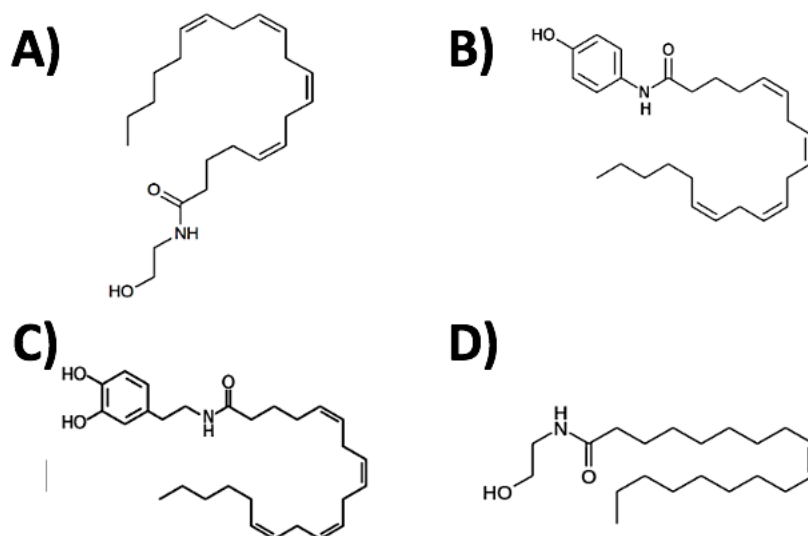
Ces résultats sont surprenants, d'autant plus que les souris knock-out TRPV1, n'ont montré aucune différence de température corporelle centrale par rapport aux souris de type sauvage. De plus, l'antagoniste sélectif de TRPV1 AMG517, n'a pas produit d'hyperthermie chez les souris knock-out pour TRPV1, suggérant que cette hyperthermie médiée par l'antagoniste de TRPV1 est bien TRPV1-dépendante (Steiner et al., 2007; Vay et al., 2012).

Malgré les évidences expérimentales de l'implication de TRPV1 dans la détection de la température et la régulation de la température corporelle, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces fonctions sont dans l'état actuel de nos connaissances encore inexplicés. La localisation précise du domaine sensible à la chaleur n'est toujours pas connue et impliquerait plusieurs domaines très éloignés dans la structure du canal (Gregorio-Teruel et al., 2014).

#### *1.3.6.4 Molécules chimiques endogènes*

TRPV1 peut être activé par un grand nombre de molécules endogènes naturellement produites par nos cellules. Régulièrement appelé endovanilloïdes (anandamide, lisophosphatidique acide « LPA », acide arachidonique et linoléique), ces agonistes sont synthétisés et libérés de manière dépendante de l'activité en quantités adéquates pour entraîner des réponses médiées par TRPV1 (Fig. 20). La plupart de ces composés sont issus du réservoir d'acides gras contenu dans les lipides de la membrane plasmique (Matta and Ahern, 2007; Prescott and Julius, 2003). Parmi eux l'anandamide (N-arachidonoyl éthanolamine), qui est le ligand endogène des récepteurs cannabinoïdes, active TRPV1 en se liant au même site que la capsaïcine mais avec une puissance 5 à 10 fois inférieure à ce dernier. Il existe de nombreux

autres métabolites endogènes dérivés de l'acide arachidonique tels que la N-arachidonoyldopamine (OLDA), la N-oléoyldopamine, l'oléoyléthanolamide (OLEA) et l'acide 12-(S)-hydroperoxyeicosatétraénoïque, qui sont connus pour lier TRPV1 (Szallasi et al., 2007). Lorsqu'ils activent TRPV1, ils provoquent des augmentations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Néanmoins, la puissance de ces composés pour activer TRPV1 est très faible et sujette à débat, car pour pouvoir constater un effet significatif *in vivo*, ces composés nécessiteraient des conditions bien particulières.



**Figure 20 :** Structure chimique des composés agonistes endogènes modulateurs de l'activité de TRPV1 A) Anandamide B) AM-404 dérivé de l'anandamide, mais avec un hydroxyphényl C) OLDA D) OLEA.

#### 1.3.6.5 Molécules chimiques exogènes (xénobiotiques)

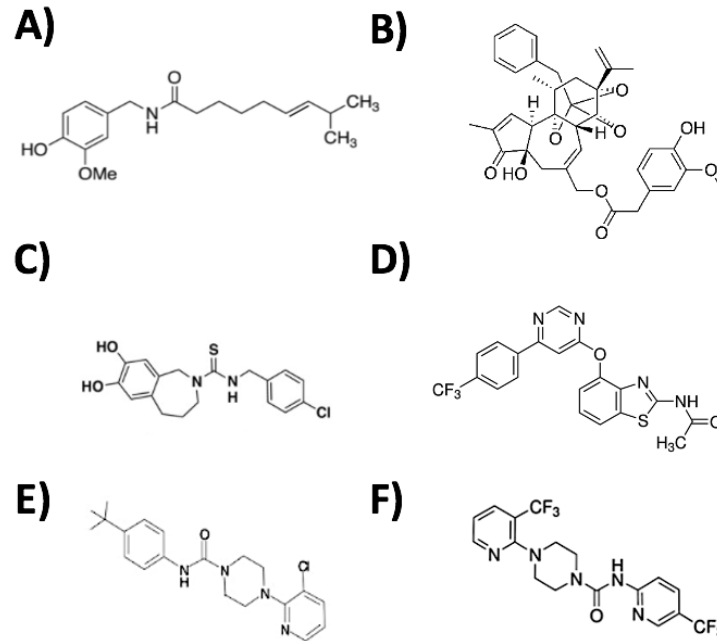
TRPV1 dispose d'une large gamme d'agents pharmacologiques bien caractérisés. Parmi eux, un grand nombre de composés naturels présent dans notre alimentation sont des activateurs de TRPV1 comme les capsaïcinoïdes dont la capsaïcine issue du piment, la pipérine qui vient du poivre et l'eugénol qui provient du clou de girofle. Il peut également être activé par la résinifératoxine dits « RTX », une toxine issue d'un cactus (*euphorbia resinifra*) qui présente une puissance 3 à 4 fois supérieure à la capsaïcine (Fig. 21). A l'inverse, sa forme iodée, l'iodo-résinifératoxine (I-RTX), est un puissant antagoniste. D'autres molécules issues du venin d'araignées (DkTx) et de méduses activent également TRPV1 (Bohlen et al., 2010). Toutes ces molécules produisent le même effet, à savoir la production d'une sensation de brûlure persistante au moment où elles activent TRPV1 (Szallasi, 2015; Szallasi et al., 2007).

Au niveau moléculaire, la capsaïcine est l'agoniste le plus connu de TRPV1. Il est composé d'un noyau aromatique issu d'une vanilline associée à une longue chaîne hydrocarbonée lipophile par une liaison urée. Au contact de TRPV1, la capsaïcine se lie aux niveaux des résidus Y511, S515, M547 et T550 des régions transmembranaires 3 et 4 (TM3 et TM4) de TRPV1 (Fig. 18) (Gavva et al., 2004). Comme lorsque le canal est activé par la température, l'interaction CAPS/TRPV1 ouvre le canal pour entraîner un courant calcique et sodique entrant.

A l'inverse, le canal TRPV1 peut être inhibé par de nombreux antagonistes naturels ou synthétiques. Il existe de nombreux antagonistes compétitifs synthétiques de TRPV1 comme iRTX cité précédemment, la capsazépine et l'AMG517. Ces antagonistes compétitifs se fixent sur les mêmes sites que la capsaïcine pour bloquer le canal dans un état fermé imperméable aux ions (Messeguer et al., 2006).

Il existe également d'autres composés qui inhibent TRPV1 mais de façon non compétitive, comme la thapsigargine et le Ruthénium Red (RuR). À la différence des antagonistes cités précédemment, ceux-ci ne vont pas empêcher l'ouverture du canal. Ils vont bloquer le canal en utilisant des mécanismes secondaires. À titre d'exemple, le RuR va bloquer l'entrée de calcium en bouchant l'entrée du pore.

Bien qu'il existe de nombreux ligands de TRPV1, peu de molécules ciblant ce canal ont franchi la barrière des essais cliniques. Ceci est principalement dû aux propriétés pharmacologiques des molécules testées et à l'apparition d'effets secondaires nocifs comme l'augmentation de la température corporelle, un phénomène qui reste encore inexplicé à ce jour.



**Figure 21 :** Structure chimique des xénobiotiques agonistes A) capsaïcine B) résinifératoxine et antagonistes C) capsazépine D) AMG517 E) BCTC F) JNJ-17203212 de TRPV1.

#### 1.3.6.6 pH

Les protons dont la concentration augmente lors de l'acidification de l'environnement du canal, peuvent activer directement les canaux TRPV1 (Caterina et al., 1997) et contribuer à améliorer la sensibilité de ces canaux à la capsaïcine et à la chaleur lorsque la valeur de pH extracellulaire diminue de 7.6 à 6.3 (Jordt et al., n.d.; Jordt and Julius, 2002). Les acides aminés extracellulaires E600 et E648 près de la région des pores au niveau de TM5 et TM6 sont impliqués directement dans le déclenchement de l'activité du canal médié par les protons (Fig. 18) (Ahern, 2005). Dans des conditions légèrement acides, les protons agissent plutôt comme des modulateurs allostériques de TRPV1 et augmentent considérablement leur sensibilité à la chaleur et à la capsaïcine. Un mécanisme moléculaire qui est détaillé dans le chapitre suivant.

#### 1.3.6.7 Notion de sensibilisation

Grâce à sa polymodalité, l'activité de TRPV1 est contrôlée par une multitude de mécanismes de régulation. Lorsque les stimuli sont légers, en deçà d'un certain niveau, ils peuvent provoquer une sensibilisation. Dans le cas contraire, un fort stimulus peut entraîner une désensibilisation du canal. Par conséquent, TRPV1 présente des seuils d'activations dynamiques à ses différents modes d'activations. Ils sont interdépendants et susceptibles d'être



modulés selon la tension de la membrane, les températures en deçà de son seuil d'activation, le pH et les lipides endogènes (Cao et al., 2013). D'autres mécanismes exogènes peuvent conduire à la sensibilisation des canaux TRPV1, comme la composition en lipide (phosphoinositides) de la membrane dans laquelle le canal est contenu, ou une inflammation localisée (Chuang et al., 2001).

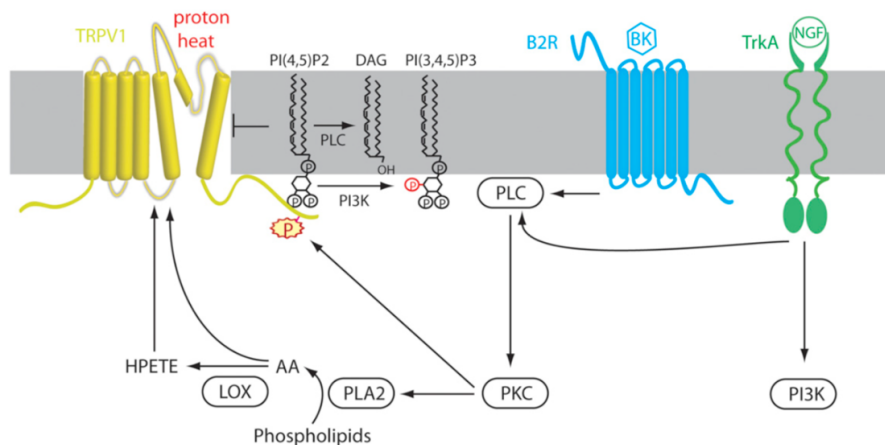
Lors d'une inflammation, la libération d'agents pro-inflammatoires extracellulaires tels que les facteurs de croissance nerveux « NGF », la bradykinine « BK » ou l'ATP entraîne une sensibilité accrue des cellules aux stimuli nociceptifs légers, tels qu'une augmentation modérée de la température connue sous le nom d'« hyperalgésie thermique » (Zhang et al., 2005). Ces agents chimiques inflammatoires modulent les seuils d'activation du canal TRPV1 vers des températures ou des concentrations plus faibles en ligands activateurs. On parle de potentialisation de TRPV1, une fonctionnalité qui s'exerce par l'intermédiaire de différents mécanismes de régulation de l'activité du canal.

Le premier mécanisme repose sur des facteurs moléculaires comme la phosphorylation du canal TRPV1. Pour moduler ses seuils d'activation, TRPV1 dispose dans sa structure de nombreux sites de phosphorylation. Les kinases comme la PKC phosphoryle TRPV1 au niveau des résidus S502 et S800 et la PKA phosphoryle au niveau des résidus S116 et T370 pour abaisser les seuils d'activation à la température ou à la capsaïcine (Vay et al., 2012). De la même manière, les protons qui se lient aux résidus E600 et E648, potentialisent l'activité de TRPV1 de telle sorte que même dans des conditions modérément acides avec un pH proche de 6, le canal s'active même à température ambiante (Jordt et al., 2000).

Le second mécanisme implique une augmentation de la densité de nocicepteurs fonctionnels présents à la surface de la membrane plasmique. À l'état de base, les canaux TRPV1 sont constamment renouvelés par un transport antérograde et rétrograde grâce à un pool de canaux présents dans les compartiments de stockage comme le réticulum endoplasmique. Par exemple, certains facteurs inflammatoires activent la protéine cycline dépendante kinase 5 « Cdk5 » qui favorise le transport antérograde de TRPV1 en agissant via la protéine 13B de la famille kinésine-3 (KIF). De cette manière, l'adressage de TRPV1 vers la membrane plasmique est favorisé (Xing et al., 2012). Ce mécanisme peut être empêché par un antagoniste des Cdk comme la roscovitine ou par le blocage de l'exocytose régulée.

À l'inverse, d'autres facteurs inflammatoires comme la BK, l'IL-1 et l'artémisine sont insensibles à ce type de blocage, car ils n'impliquent pas une augmentation de la densité de surface des canaux TRPV1, mais une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Bujak et al., 2019). Certaines de ces molécules pro-inflammatoires se lient directement à

TRPV1 via les motifs ankyrine comme l'ATP qui exercent ainsi une compétition avec la calmoduline son partenaire fonctionnel. D'autres produisent leur effet via la phospholipase C (PLC) comme l'ATP et la BK pour promouvoir la production de diacylglycérol (DAG), un activateur de la PKC qui, comme on a pu le voir, phosphoryle des résidus sérines dans les domaines cytosoliques de TRPV1 (Fig. 22) (Numazaki et al., 2002). Tous ensemble ces mécanismes de sensibilisation, lorsqu'ils deviennent aberrants comme en conditions pathologiques, sont responsables de la douleur inflammatoire dites « chronique » médiée par TRPV1. Ces constats ont été confirmés à l'aide de souris TRPV1 knock-out dont le seuil de tolérance à la douleur est plus élevé.

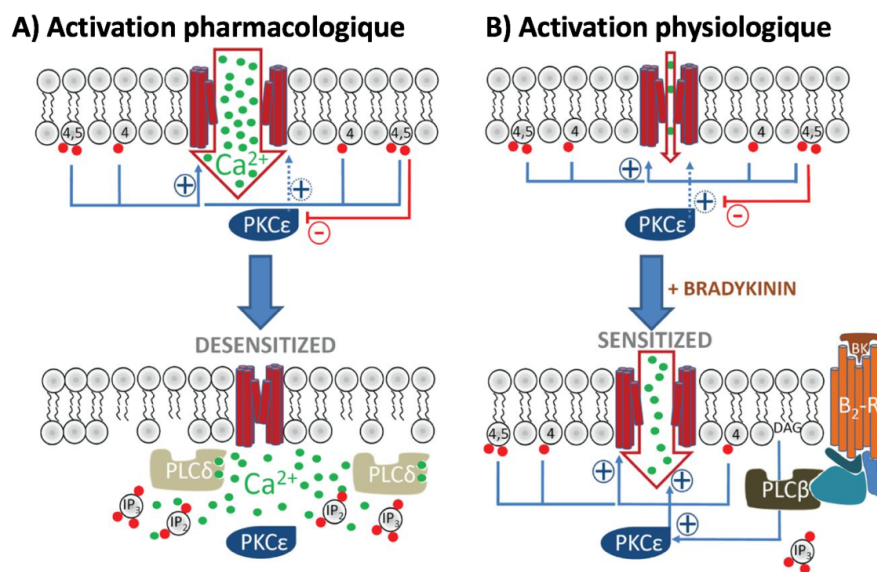


**Figure 22 :** Schéma résumant les principaux mécanismes de sensibilisation du canal TRPV1, d'après (Cao et al., 2013).

#### 1.3.6.8 Notion de désensibilisation

Les caractéristiques de l'activation de TRPV1 par la capsaïcine sont très bien connues. L'activation prolongée de ce canal avec ce composé entraîne une désensibilisation aiguë diminuant son activité et sa sensibilité à la chaleur (Fig. 23)(Vay et al., 2012). De la même manière, une stimulation répétée de TRPV1 entraîne un phénomène dit de « tachyphylaxie » qui abaisse le taux d'activation de TRPV1 (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004). Ce mécanisme de boucle de rétroaction négative implique la calmoduline « CaM », une protéine de 15kDa ultra-conservée, qui joue le rôle de capteur de calcium ubiquitaire au sein des cellules. De par sa configuration, la CaM est capable de lier les ions calcium libres grâce à quatre structures de type « EF-hand », composées d'une boucle centrale flanquée de deux hélices alphas, dont chaque paire d'affinité différente est présente à chaque extrémité de la protéine. En effet, les motifs EF-hand placés en C- terminal de la CaM possèdent un Kd de 0,2 $\mu$ M, alors

que ceux en N- terminal ont un Kd de 2 $\mu$ M (Vetter and Leclerc, 2003). Une fois activé, TRPV1 permet le transit d'ions calcium qui vont se lier à la CaM et former des néo complexes CaM/Ca<sup>2+</sup> dont la structure change drastiquement. Ce remodelage lui permet de se lier à des motifs de liaison présents sur diverses protéines dont TRPV1. La liaison des néo-complexes CaM/Ca<sup>2+</sup> module l'activité des protéines avec lesquels elles interagissent. Sur TRPV1, la CaM peut se lier au niveau de deux sites situés en N- terminal entre les résidus 189 et 223 et en C-terminal entre les résidus 768 et 799. Au niveau de TRPV1, la CaM et le flux d'ions calcium coopèrent pour diminuer la probabilité d'ouverture du canal via une boucle de rétrocontrôle. Ceci contribue à désensibiliser le canal, mais le fonctionnement exact de ce mécanisme moléculaire reste encore flou. Il a néanmoins été montré que le canal désensibilisé se retrouve en grande partie internalisé dans les compartiments intracellulaires, perdant ainsi sa faculté de transduire les stimuli nocifs extracellulaires comme la hausse de température. Cependant, une étude approfondie de cette coopération calmoduline / TRPV1, et de sa fonctionnalité au cours de la physiologie et de la pathologie, revêt un intérêt majeur pour concevoir de nouvelles approches pharmacologiques contrôlant l'activité de TRPV1.



**Figure 23 :** Modélisation du mécanisme de sensibilisation / désensibilisation de TRPV1. **A)** Au cours de l'activation pharmacologique maximale de TRPV1, un fort afflux de calcium active la CaM et entraîne une désensibilisation. **B)** Au cours d'une activation physiologique de TRPV1, les afflux d'ions et les signaux transduits sont faibles. En présence de bradykinine, TRPV1 est sensibilisé par divers mécanismes moléculaires qui augmentent l'activité du canal, d'après (Lukacs et al., 2013).

#### 1.3.6.9 Applications physiopathologiques de TRPV1

Comme nous avons pu le voir précédemment, les conditions inflammatoires entraînent la sur-activation de TRPV1 contenu dans les extrémités des fibres nerveuses de type C et A $\delta$ , provoquant douleur, picotements et neuropathie périphérique mettant en exergue son rôle prépondérant dans la douleur inflammatoire et chronique. Par conséquent, il n'est pas rare de constater l'implication plus ou moins directe de TRPV1 dans diverses affections à composante inflammatoire. Parmi elle, nous pouvons citer la migraine, la rhinite, l'asthme, le diabète et les infections de la vessie (Danigo et al., 2013).

Dans les poumons, TRPV1 est densément exprimé dans l'épithélium et les fibres nerveuses innervant les voies respiratoires où il stimule le réflexe de la toux. Ainsi, l'activation de TRPV1 par inhalation de capsaïcine induit la toux et l'éternuement (Kaneko and Szallasi, 2014). Cette toux peut être bloquée de manière dose-dépendante par un prétraitement avec des antagonistes sélectifs de TRPV1 comme la iodo-résinifératoxine (I-RTX), le JNJ-17203212 et la capsazépine. Les patients souffrant de toux chronique ou asthmatiques ont une expression accrue de TRPV1 dans les fibres nerveuses et les cellules musculaires des voies respiratoires. Ils sont de fait plus sensibles aux agonistes de TRPV1 que les patients sains (Groneberg et al., 2004).

TRPV1 est également impliqué dans les troubles de la vessie, comme la cystite. La cystite est une inflammation de la vessie qui produit une douleur viscérale intense. Cette pathologie est associée à une activité et une expression accrue de TRPV1 dans l'épithélium et les neurones innervant la vessie expliquant de fait les douleurs viscérales. Ce phénomène douloureux peut être antagonisé par un prétraitement avec un antagoniste sélectif de TRPV1 comme le SB-366791, et n'est pas observée chez les souris TRPV1 knock-out. TRPV1 joue ainsi un rôle central dans le développement de la douleur liée à la cystite (Danigo et al., 2013).

Toutes ces pathologies montrent le potentiel thérapeutique d'une approche visant à trouver de nouveaux agents pharmaceutiques ciblant TRPV1. De toute évidence, les applications thérapeutiques de TRPV1 sont nombreuses et le potentiel clinique des ligands ciblant TRPV1 va bien au-delà de la douleur chronique.

#### 1.3.6.10 TRPV1 une cible pharmacologique

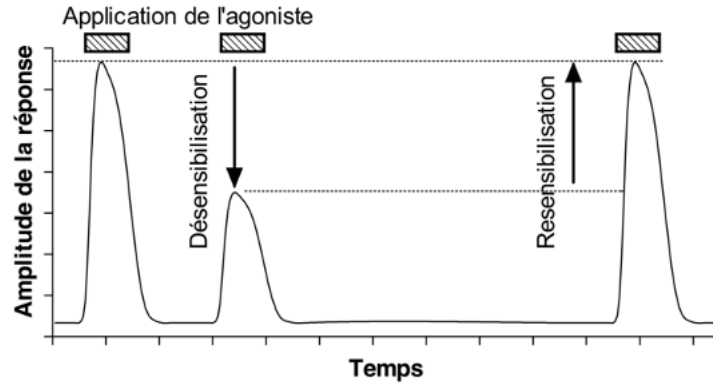
L'expression et l'activité de TRPV1 sont directement liées à des phénomènes douloureux. TRPV1 est donc une cible extrêmement prometteuse pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques analgésiques. Dans une optique thérapeutique, plusieurs approches différentes ont été utilisées.

La première stratégie classiquement utilisée dans la recherche de médicament est l'antagonisation du canal TRPV1. Pendant des années, les laboratoires académiques et les sociétés pharmaceutiques ont investi des millions de dollars dans des programmes de criblage de médicaments pour identifier des antagonistes sélectifs et puissants de TRPV1. Il existe deux classes d'antagonistes ciblant ce récepteur :

1. Les antagonistes compétitifs comme la CPZ qui se lient au site de liaison de l'agoniste CAPS appelé site orthostérique et verrouille le canal TRPV1 dans un état fermé et non conducteur.
2. Les antagonistes non compétitifs, souvent des bloqueurs de pores comme le RuR qui interagissent avec des sites de liaison distants du site de liaison de l'agoniste (sites allostériques) et empêchent les transitions de conformation menant à l'ouverture du canal par l'agoniste ou bloquent son pore aqueux.

De nombreux antagonistes de TRPV1 ont fait l'objet d'essais cliniques pour des applications visant à apaiser la douleur chronique des patients. Malheureusement, les effets positifs constatés sont faibles et varient drastiquement à cause de la variabilité entre les patients et du polymorphisme de TRPV1. Les effets secondaires constatés de ces composés sont souvent rédhibitoires pour une utilisation à grande échelle (Moran et al., 2011).

La seconde stratégie couramment utilisée consiste à induire une désensibilisation de TRPV1 par des fortes doses d'agonistes pour provoquer une surcharge calcique qui aurait la capacité de détruire les extrémités des neurones exprimant TRPV1 par un phénomène de surcharge calcique, ou « calcium overload » en anglais. Cette stratégie à base de capsaïcine est traditionnellement utilisée pour réduire la douleur produite par l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde et la neuropathie diabétique périphérique. Une stratégie similaire consiste à donner des faibles doses régulières de capsaïcine pour produire une désensibilisation sans détruire les extrémités nerveuses et maintenir les autres capacités sensorielles (Fig. 24).



**Figure 24 :** Une approche thérapeutique ciblant TRPV1 consiste à tirer profit du phénomène de désensibilisation pour diminuer l'amplitude de la réponse et limiter l'impact lié à une sur-activation de ce canal (Szymaszkiewicz et al., 2020).

#### 1.3.6.11 Bilan

Bien que TRPV1 soit une cible d'intérêt thérapeutique et l'un des canaux les plus étudiés, très peu de thérapies avec des effets bénéfiques ciblant ce récepteur ont réussi à passer le barrage des essais cliniques. Ces essais ont permis de mettre en exergue de très nombreux effets secondaires nocifs qui laissent à penser que nous ne connaissons vraisemblablement pas toutes les fonctions moléculaires et implications physiologiques de ce canal. Ce manque de connaissance résulte en partie des techniques d'études de ce canal. Comme nous l'exposerons dans les chapitres suivants, nous pouvons facilement constater que ces études utilisent majoritairement des approches indirectes qui manquent de précision. Elles sont donc non adaptées à la réalisation d'essais de criblage de médicament à haut débit robustes ciblant TRPV1 bien que ces approches aient permis des avancées majeures pour comprendre la fonction des canaux TRP. Le manque de données structurales sur les transitions de conformation lors du gating des canaux TRP et les techniques d'étude de leur fonctionnalité est un obstacle évident pour les progrès futurs de ce domaine.

## 1.4 Techniques d'études des canaux ioniques pour la recherche de médicaments

Longtemps considérés comme des cibles médicamenteuses attrayantes pour des applications thérapeutiques, la recherche de nouveaux médicaments ciblant les canaux ioniques patine. Les canaux ioniques restent pourtant des cibles intéressantes pour traiter un large spectre de maladie. Malgré ce constat, 80 % d'entre eux ne sont pas encore exploités pour le développement de médicaments (Yu et al., 2016). Actuellement, les approches de recherche de médicament à très haut débit dits « criblage HTS » (pour « High Throughput Screening » en anglais) consistent à utiliser des formats miniaturisés de tests pour mesurer l'activité des canaux à des formats de 96 à 1536 puits, tout en gardant un niveau de résolution et de robustesse élevé. Par conséquent, le développement de nouveaux tests fonctionnels miniaturisés, résolutifs et robustes pour suivre l'activité des canaux représente un intérêt majeur pour la recherche de médicament. À terme, l'avènement de ces nouvelles techniques de haut débit rapides et robustes devrait faciliter l'identification de nouveaux modulateurs spécifiques ciblant les canaux ioniques et faire émerger de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce chapitre, les approches couramment utilisées pour l'étude et la recherche de médicament ciblant les canaux ioniques sont présentées.

### 1.4.1 Principe du criblage de molécules à très haut débit HTS

Une orientation récente de la recherche pharmacologique s'appuie sur la réutilisation de médicaments existants ou de molécules déjà connues, ce qui stratégiquement, représente une économie de temps et d'argent. En principe, certains médicaments déjà commercialisés pour une autre indication peuvent ainsi être réaffectés pour traiter des affections ciblant les canaux. Cette réutilisation des médicaments déjà commercialisés présente un réel avantage car elle évite la nécessité d'employer de nouveaux essais pour évaluer la sécurité du composé testé (comme lors du syndrome de QT long impliquant le canal hERG cf chapitre 1.2.5). Si des résultats positifs sont obtenus dans des modèles cellulaires et animaux, ces médicaments seront inscrits directement dans des essais cliniques de phase II. Une seconde approche consiste à identifier les redondances dans les structures des molécules qui ont montré des résultats positifs, pour construire chimiquement de nouveaux ligands sélectifs pour la cible d'intérêt.

Ces deux stratégies sont intéressantes pour orienter la recherche de candidats-médicaments et découvrir des ligands sélectifs des canaux ioniques. Ce processus passe par la construction d'une banque de composés appelé « chimiothèque » avec une large diversité de structures à partir de molécules déjà commercialisées. Il est ensuite, possible d'orienter ces banques en utilisant les molécules citées sur les bases de données de la pharmacovigilance pour sélectionner des molécules induisant un effet secondaire approuvé. Comme par exemple, celle de la FDA-AERS (Food and Drug Administration-Adverse Effects Reporting System) qui recueille des rapports spontanés d'événements indésirables concernant tous les médicaments autorisés aux États-Unis par les fournisseurs, les travailleurs de la santé et le public. A titre d'exemple, cette stratégie a permis d'identifier des médicaments comme les sulfonylurées, responsables du blocage du canal KATP et qui ont des applications dans la prise en charge du diabète (Mele et al., 2014; Velasco et al., 2016).

Une fois construite, ces chimiothèques peuvent être constituées de plusieurs millions de composés. Afin de prendre en charge ces immenses de banques de molécules, il est nécessaire de mettre en œuvre des tests de criblage HTS. Ces approches HTS utilisent des appareillages hautement sensibles et des formats de tests miniaturisés qui sont aidés de la robotique et de systèmes informatiques pour automatiser les dispositifs de manipulation et de traitement des données. Avec ce processus, nous pouvons significativement augmenter le débit de donnée en effectuant rapidement des millions de tests pharmacologiques. Il est ainsi plus aisé d'identifier des composés d'intérêt pharmaceutiques qui pourront ensuite intégrer les étapes plus en amont du processus.

#### 1.4.2 Techniques d'études HTS des canaux ioniques

Actuellement, les tests de criblages de molécules ciblant les canaux ioniques mettent en œuvre différentes techniques. Traditionnellement, les étapes de criblage initiales privilégient des approches indirectes mais à très haut débits. La plupart du temps, ces techniques s'appuient sur des analyses fluorescentes pour mesurer les changements du potentiel membranaire ou les concentrations cytoplasmiques d'ions (Terstappen et al., 2010; Yu et al., 2016). Cependant, les tests basés sur les sondes fluorescentes ne donnent qu'une lecture indirecte de l'activité des canaux. Les signaux générés reflètent effectivement des événements moléculaires distants temporellement ou spatialement du canal. De fait, de multiples étapes dans les voies de signalisation entre le canal et l'évènement mesuré à l'aide de la sonde fluorescente sont également susceptibles d'être modulées à la hausse ou à la baisse par les composés de criblage.



Ces essais sont donc sujets à une fréquence élevée de faux positifs (Obergrussberger et al., 2021).

La technique de référence pour évaluer l'activité des canaux ioniques est la méthode d'électrophysiologie « patch-clamp », une technologie qui permet de mesurer les propriétés électriques des cellules et des canaux ioniques. Bien que cette technologie présente un niveau de résolution exceptionnel, c'est une approche chronophage qui nécessite une certaine maîtrise technique avec un débit de données trop faibles et trop peu adaptés pour les larges campagnes de criblages de molécules. Avec le temps, les développements technologiques ont ouvert de nouvelles opportunités et ont permis d'automatiser la méthode d'électrophysiologie patch-clamp pour la rendre compatible avec le criblage des canaux ioniques à moyen débit. Bien que cette approche présente de nombreux avantages et un débit accru pour le criblage direct de médicament pour les canaux ioniques (Chambard et al., 2014). Ces appareillages restent chers et nécessitent une manipulation experte. Le principe de cette technique d'électrophysiologie sera décrit au chapitre 1.4.2.2.

#### *1.4.2.1 Test Fluorescents*

En ayant connaissance des limites énoncées préalablement, les tests fondés sur la fluorescence pour étudier les canaux ioniques représentent donc un bon compromis pour le développement de tests haut débit ciblant les canaux ioniques. Ils permettent des mesures du potentiel de membrane et des changements de concentration en ions intracellulaires grâce à de forts changements du signal fluorescent. Cette approche permet des mesures à très haut débit d'analyse (384 puits et plus) sur des populations entières de cellules vivantes à l'aide de protocoles simples à mettre en œuvre.

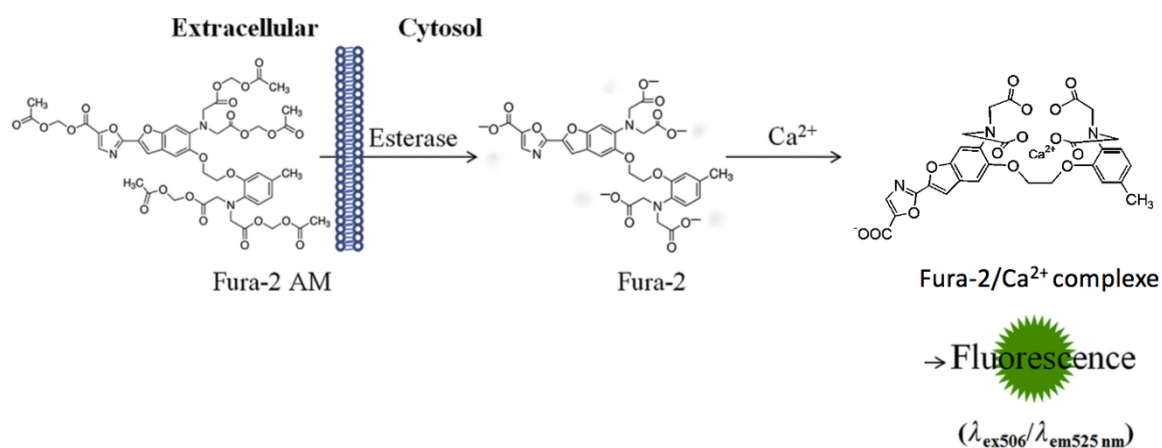
Afin de mesurer les signaux de fluorescence avec un niveau de débit et de résolution suffisant, la technologie Fluorescent imaging plate reader (FLIPR) est fréquemment employée. Il s'agit d'un lecteur de plaque à fluorescence qui permet de mesurer la cinétique de la réponse de chaque puits d'une microplaque en simultanément avec des intervalles inférieurs à la seconde. De plus, le dispositif dispose d'un système de pipetage intégré programmable.

Actuellement, c'est la technologie qui est financièrement la plus abordable. Elle est donc disponible dans la plupart des laboratoires de criblage à haut débit qui utilisent des méthodes de dosages à base de sondes fluorescentes. Elle est régulièrement privilégiée dans les campagnes de criblage primaire de médicament grâce à son coût relativement faible et son débit de données élevé. Néanmoins, le manque de résolution est problématique car elle implique des

surcoûts dans les étapes plus en amont de la recherche de médicament. Un compromis largement accepté par la communauté scientifique.

#### 1.4.2.1.1 Sondes chimiques à ions

Durant des années, la mesure des flux d'ions a joué un rôle important dans les applications de criblage HTS de médicaments et leur optimisation. Leur principe repose souvent sur l'intégration dans les cellules d'un fluorochrome sensible aux ions, dont le signal est mesuré puit par puit par un lecteur de plaque à fluorescence. La plupart du temps, ces indicateurs sont utilisés sous forme d'esters acétoxyméthyliques dits « AM » qui les rend à la fois perméables aux cellules et incapables de lier les ions dans le milieu extracellulaire (Fig. 25). De cette manière, ils ne deviennent photosensibles qu'après hydrolyse par certaines estérases intracellulaires. Après hydrolyse de l'extension AM, le fluorochrome ne peut plus sortir de la cellule et seules les sondes intracellulaires sont fluorescentes (Philippaert et al., 2018).



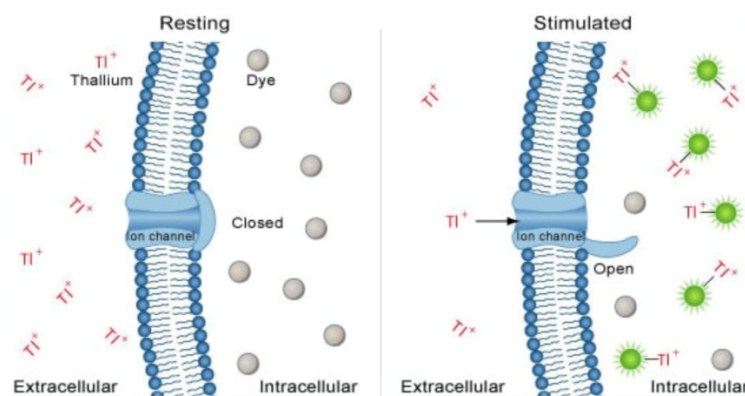
**Figure 25 :** Représentation schématique du mode de fonctionnement des sondes chimiques fluorescentes acétoxyméthyliques tirer de l'exemple du Fura-2 AM. Ces sondes entrent librement dans le cytosol puis sont déacétylés par des estérases intracellulaires. Elles deviennent ensuite libres de réagir avec les ions intracellulaires libres et deviennent fluorescentes après excitation à 340,380 nm.

#### 1.4.2.1.1.1 Sondes chimiques sensibles au potassium

A l'heure actuelle, la sonde la plus appropriée pour mesurer directement les ions potassium est la sonde potassium-binding benzofuran isophthalate dit « PBFI ». Ce composé est un indicateur fluorescent avec un pic d'émission à 500 nm après excitation à 340,380 nm.

Bien que ce composé permette des mesures des concentrations en ions potassiques intracellulaire, il ne dispose que d'un très faible  $K_d$  (entre 5 et 45mM) pour le potassium, et il n'est que 1,5 fois plus sélectif pour le  $K^+$  que le  $Na^+$ . En conditions physiologiques de solutions, même si les concentrations intracellulaires de  $K^+$  sont 10 fois supérieures aux concentrations de  $Na^+$ , les signaux sont souvent contaminés par le  $Na^+$ . Pour limiter les contaminations, des approches à base d'ions non-organiques sont utilisés, pour remplacer le  $Na^+$  dans le milieu comme le chlorure de choline et la N-méthylglucamine afin d'élargir « artificiellement » la fenêtre de lecture du signal (Yu et al., 2016).

Pour la mesure de l'activité des canaux potassiques, certains tests tirent profit de la perméabilité relative des canaux potassiques très élevée pour le thallium ( $PTI^+/PK^+ = 1,3$ ) pour mesurer l'activité de ces canaux (Mita et al., 2021). Dans le commerce, au moins quatre colorants disponibles sont appropriés pour réaliser des tests de flux  $Tl^+$  : BTC, FluoZin-2, Thallos et FluxOR. Parmi eux, FluxOR constitue la dernière génération de sonde la plus utilisée pour la mesure de l'activité des canaux potassiques (Fig. 26). Au contact du thallium, cette sonde possède un pic d'émission à 525 nm après excitation à 490 nm. Elle dispose d'une amplitude de signal large ce qui permet la mise en place de tests sensibles et robustes. Ce procédé implique cependant des étapes de lavages qui nuisent à la reproductibilité des résultats. Il est cependant compatible avec le criblage à haut débit (HTS) dans des formats de plaques à 96, 384 et 1 536 puits.



**Figure 26 :** Mode de fonctionnement du test FluxOR qui tire profit de la perméabilité relative élevée des canaux potassiques au thallium. Les sondes deviennent fluorescentes au contact du thallium après excitation à 490 nm. D'après (Beacham et al., 2010).

Cette approche s'est avérée efficace pour mesurer l'activité des canaux  $K^+$  (KCa3.1, Kir4.1) mais également certains canaux  $Na^+$  comme NaV1.7 (Beacham et al., 2010). Bien que

de transiter par les canaux sodiques et potassiques est susceptible d'introduire des biais. Pour charger le  $Tl^+$  dans les cellules, les tests  $Tl^+$  utilisent du  $SO_4^{2-}$  comme anion extracellulaire, pour éviter la précipitation de chlorure de thallium «  $TlCl$  » ce qui pose problème pour le contrôle du pH. De plus, des temps d'application trop longs entraînent une accumulation de  $Tl^+$  dans les cellules et la formation de cristaux de sel  $TlCl$  intracellulaires nocifs pour les cellules. Par conséquent, seuls les effets précoces et limités dans le temps des composés peuvent être étudiés.

#### 1.4.2.1.1.2 Sondes chimiques à Calcium

Pour les mesures de flux calciques, il existe deux types de tests différents utilisés pour des campagnes HTS de criblage de médicaments contre les canaux ioniques : (i) les tests utilisant des ionophores calciques fluorescents, et (ii) les tests à base de senseurs codés génétiquement.

Pour le dosage du calcium intracellulaire à l'aide de sondes fluorescentes, la plupart des essais utilisent du Fura-2 AM un acide aminopolycarboxylique qui se lie au calcium libre intracellulaire. Ce composé est un indicateur fluorescent ratio métrique dont le pic d'excitation se déplace de 380 nm en absence de calcium à 340 nm en présence de calcium libre intracellulaire. Après excitation, cette sonde fluorescente émet des photons dont le pic d'émission se situe à 510 nm, avec un rendement quantique élevé qui a permis les premières mesures en cellules vivantes et en temps réel du calcium intracellulaire. Grâce au ratio 510/340 nm, le rapport d'émission permet une mesure directe de la quantité de calcium intracellulaire et supprime les autres variables tel que la concentration de colorant ou l'épaisseur des cellules susceptibles d'influencer la mesure.

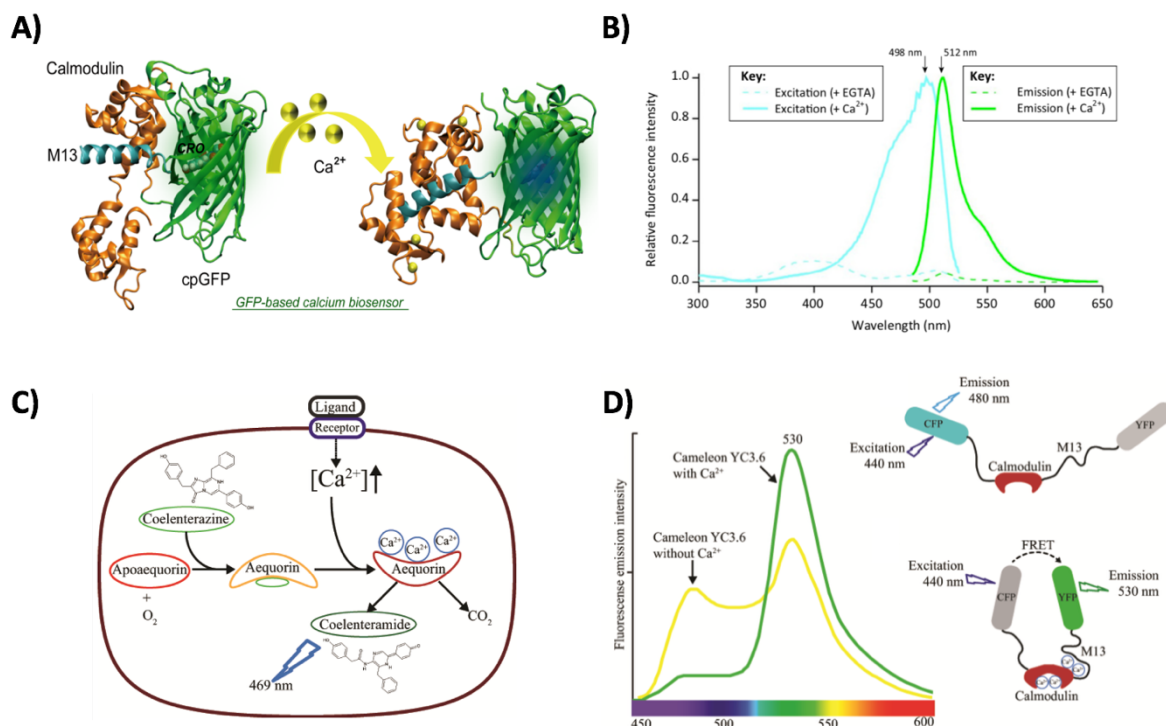
Pour des approches de criblage HTS de médicament sur des canaux calciques comme TRPV1, les étapes précoces utilisent la sonde Fluo4AM pour mesurer le calcium libre cytosolique. Néanmoins, ce test est non-ratiométrique et il est spatio-temporellement très éloigné de la cible d'intérêt. Le signal émit est ainsi facilement influencé par les multiples étapes intermédiaires, impliquant d'autres structures que les canaux étudiés. L'utilisation de sonde fluorescente implique d'autres problématiques comme la titration du calcium intracellulaire, le photobleaching et la nécessité de devoir réaliser un criblage de contrôle sur cellules non-transfectées pour identifier et éliminer les faux positifs des cribles primaires.

Pour mesurer le calcium intracellulaire, il existe d'autres alternatives qui consistent à utiliser des indicateurs de calcium codés génétiquement « GECI ». A ce jour, Il existe 3 indicateurs différents potentiellement capables de sonder l'activité des canaux calcique :

en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, l'enzyme change de conformation. En présence d'oxygène, elle catalyse une réaction d'oxydo-réduction qui convertit la coelenterazine en coelenteramide. Le complexe aequorin/coelenteramide de haute énergie retourne à l'état fondamental en libérant de la lumière bleue à 469 nm que l'on mesure avec un spectrophotomètre.

2. La sonde Caméléon (Fig. 27D)(Tsien and Miyawaki, 1998) est une sonde protéique dont le principe repose sur le FRET détaillé dans le chapitre 2.3. Elle est construite en fusionnant une protéine sensible au calcium composé de la calmoduline et du peptide M13. Ce dernier correspond au domaine de liaison de la Calmoduline dans la kinase à chaîne légère de la myosine. Ce complexe est ainsi pris en sandwich entre un donneur et un accepteur fluorescent d'une paire FRET compatible.
3. La GCaMP (Fig. 27A&B)(Nakai et al., 2001) est construite à partir de 3 structures protéiques différentes (i) une protéine verte fluorescente (EGFP) modifiée par permutation circulaire où les extrémités N- et C- terminales sont fusionnées au centre de la protéine, (ii) le peptide M13 fusionnée en N-ter et (iii) la séquence de la calmoduline (CaM) fusionnée en C-ter. La GCaMP émet une fluorescence verte avec une longueur d'onde d'excitation maximale de 480 nm et une longueur d'onde d'émission maximale de 510 nm lorsqu'elle est liée au  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique libre.

L'avantage de ces sondes réside dans leur codage génétique issu de protéines « naturelles ». On peut ainsi facilement les transduire ou les transfecter pour réaliser des essais sur cellules vivantes ou après infection virale, sur un animal vivant avec un équipement adapté. A ce jour, très peu de ces tests ont fait leur preuve en criblage HTS. Seule la sonde GCaMP a proposé des applications de ce type techniquement viable (Barnett et al., 2017; Kanchiswamy et al., 2014). Les deux autres tests manquent de résolution (rapport signal sur bruit) ce qui les rend incompatibles avec la miniaturisation. De plus, les défauts inhérents à ces techniques limitent la reproductibilité des résultats.



**Figure 27 :** Résumé des principaux tests calcium codé génétiquement (GECI). A) Représentation de la structure de la protéine GCaMP. B) Spectres d'excitation et d'émission de la GCaMP en solution en l'absence et en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  C) Schéma montrant le mode de fonctionnement de l'enzyme Aequorin. D) Schéma présentant les spectres d'excitation et d'émission de la protéine Caméléon en solution en l'absence et en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  avec leurs structures associées. D'après (Kanchiswamy et al., 2014).

#### 1.4.2.1.1.3 Sondes chimiques sensible au sodium

Pour la mesure de l'activité des canaux sodiques, il existe un certain nombre de colorants fluorescents sensibles au  $\text{Na}^+$  construit sur la base d'éther couronne comme par exemple, les colorants SBFI, Asante Natrium Green-2 (ANG-2) et CoroNa. Ces colorants ne sont cependant pas adaptés à la réalisation de test au format HTS, en raison des changements relativement faibles de la concentration intracellulaire de  $\text{Na}^+$  dans un tel dosage (faible sensibilité) et de leur faible rapport signal/bruit. Pour ces cibles, chercheurs et industriels spécialisés dans l'étude des canaux sodiques privilégient des tests de binding ou de flux d'ions. Ce sont des approches contraignantes utilisant des ions ou des ligands radioactifs avec la contrainte matérielle que cela implique. De plus, ces approches sont souvent incompatibles pour une utilisation en criblage à haut débit.

Pour étudier ces canaux sodium et effectuer des criblages HTS, la technique privilégiée repose sur l'utilisation de sondes chimiques fluorescentes sensibles à la tension comme par exemple, le Bis-(1,3-Acide Dibutylbarbiturique) Triméthine Oxanol dit « DiBAC ».

#### 1.4.2.1.2 Sondes chimiques à potentiel de membrane

Comme nous avons pu le voir précédemment, une alternative pour sonder l'activité des canaux ioniques en criblage HTS de médicament consiste à mesurer le potentiel de membrane à l'aide de colorants fluorescents sensibles à la différence de potentiel électrique transmembranaire. En réponse à des modification du potentiel membranaire, ces sondes changent leurs propriétés spectrales. Actuellement, deux sondes différentes compatibles avec cette application sont disponibles dans le commerce le DiBAC et le Fluorescent Membrane Potential « FMP » (Baxter D. F., et al. 2002).

Le DiBAC4 ou bis-oxanol est un colorant lipophile chargé négativement excitable qui émet à 516nm après excitation à 490nm. Il pénètre dans les cellules dépolarisées en se liant aux protéines intracellulaires ou à la membrane en augmentant au passage son rendement quantique. Les changements de signaux fluorescent du DiBAC4 sont relativement lents (de l'ordre de quelques secondes). Ils ne permettent pas de détecter l'activité instantanée de la plupart des canaux voltage-dépendants dont l'ouverture et les effets sont très brefs (de l'ordre de la milliseconde). Cette sonde est plus adaptée pour suivre des changements généraux du potentiel de membrane. De plus, elle ne permet pas de suivre les hyperpolarisations conduisant à des potentiels de membrane encore plus négatifs.

Le kit fluorescent membrane potential dit « FMP » de Molecular Device permet des mesures du potentiel de membrane beaucoup plus rapide de l'ordre d'une dizaine de secondes, pour la réalisation de mesures bidirectionnelles de l'activité des canaux plus rapides. Ce système breveté est une combinaison entre un colorant détecteur de potentiel de membrane capable de traverser la membrane plasmique et un « quencher » qui reste à l'extérieur des cellules. Lors de la dépolarisation, le signal fluorescent mesuré augmente en intensité de façon concomitante car le colorant suit les ions chargés positivement vers l'intérieur de la cellule ou le signal n'est pas bloqué par le quencher. A l'inverse, pendant l'hyperpolarisation de la membrane, le signal fluorescent diminue en intensité car le colorant suit les ions chargés positivement à l'extérieur de la cellule. Grâce à ce système avec quencher, cette sonde dispose d'un fort rapport signal sur bruit qui corrèle avec les technologies de référence comme le patch-clamp qui sera détaillé dans le chapitre 1.4.2.2.2. De fait, cette technologie est suffisamment

robuste pour la réalisation d'essais HTS en microplaques. Le problème majeur de la sonde FMP est son manque de sélectivité membranaire. Par conséquent, les variations de signal observé peuvent provenir à la fois de la membrane plasmique mais également des endomembranes. Bien que ces deux approches permettent d'étudier la fonctionnalité des canaux ioniques et la réalisation de campagne de criblage HTS de médicament (Terstappen et al, 2010), elles manquent de précision (Yu et al, 2016) car elles sondent les variations de potentiel membranaire de l'ensemble des membranes cellulaires, y compris les endomembranaires.

Malgré l'atout qu'ils représentent, ces colorants mesurent les changements de potentiel transmembranaire résultant du flux d'ions au lieu de mesurer directement le flux d'ions. Par conséquent, les colorants sensibles au potentiel électrique ont de nombreuses limitations par rapport aux colorants qui mesurent plus directement les flux d'ions : En raison de la relation courant/tension décrite par la loi d'Ohm ( $U = IR$ ), les colorants sensibles au potentiel électrique peuvent être très sensibles dans des situations où la résistance de la membrane cellulaire est élevée. Inversement, les colorants sensibles au potentiel électrique peuvent être insensibles aux inhibiteurs des canaux ioniques dans les situations où la résistance de la membrane cellulaire est faible. Dans ces conditions, une grande proportion de canaux ioniques doit être inhibée pour modifier le potentiel membranaire décalant vers la droite la puissance apparente des composés testés et entraînant potentiellement des taux de faux négatifs élevés (Yu et al., 2016). Lors de la mise en place d'un test utilisant ce type de sonde, il faut prendre certaines précautions. Il est nécessaire de contrôler précisément le niveau d'expression de la cible qui peut exacerber les signaux des sondes à potentiel membranaire. De plus, les colorants sensibles à la tension peuvent être modulés non seulement par la cible d'intérêt, mais également par tout événement qui modifie le potentiel de la membrane, les taux de faux positifs peuvent également être très élevés.

Dans l'ensemble, les tests HTS de criblage de médicaments ciblant les canaux ioniques utilisent des sondes fluorescentes indicatrices d'ions qui sont très limitées par la disponibilité d'indicateurs spécifiques aux ions de haute performance. Ces indicateurs sont généralement utilisés en conjonction avec un lecteur fluorescent cinétique de type FLIPR pour obtenir une détection à haut débit et à faible bruit de fond des changements des concentrations ioniques cytosoliques correspondantes. À ce jour, les indicateurs calciques sont les plus largement utilisés et fournissent une performance robuste compatible pour le HTS des canaux calciques ou des canaux cationiques non sélectifs, ce qui limite les applications de ce type de technologies à une certaine catégorie de canaux.



#### 1.4.2.2 *Électrophysiologie*

Au niveau des membranes cellulaires, les canaux ioniques agissent comme des transistors moléculaires. Alimentés par des gradients de concentration ionique, les canaux ioniques transforment une variété de signaux en flux ioniques transmembranaires générant au passage des signaux cellulaires comme des différences de potentiels ou de courants électriques. L'étude de ces phénomènes électrochimiques cellulaires a permis l'émergence d'une nouvelle discipline : l'électrophysiologie.

##### 1.4.2.2.1 Histoire de l'électrophysiologie

Dans les années 1940-50, (1952) les travaux de Hodgkin et Huxley ont permis de caractériser les signaux électriques générés par la membrane de l'axone de calamar géant, et notamment les potentiels d'action produit par des conductances sodique et potassique. Ces découvertes ont conduit à l'avènement d'une nouvelle branche de la physiologie : l'électrophysiologie. Cette discipline consiste en l'étude des propriétés électriques des cellules et des tissus. Depuis ces découvertes, nous savons que les ions jouent des rôles clé dans la physiologie cellulaire et impliquent des canaux ioniques comme régulateurs fonctionnels. Aussi, dans le but de mieux comprendre les phénomènes électriques mis en jeu dans le vivant, la mise en place de nouvelles techniques s'est avérée essentielle et a conduit à l'émergence de nouvelles approches comme le patch-clamp (Jain et al., 2009).

##### 1.4.2.2.2 Technique du patch-clamp

En 1976, Erwin Sakmann et Bert Neher inventent la technique du patch-clamp, une approche qui permet d'étudier les propriétés électriques des cellules et contribue à démocratiser l'électrophysiologie. Cette approche a permis d'effectuer les premiers enregistrements de courant unitaire des canaux ioniques et mis en exergue leur grande diversité et leur importance fonctionnelle.

Elle est principalement utilisée pour étudier l'activité électrique des cellules comme les potentiels d'actions des neurones ou des cellules musculaires. Au niveau de la cellule, un poste de patch-clamp mesure la différence de potentiel et/ou le courant transitant à travers la membrane d'une cellule grâce à des électrodes placées de part et d'autre de la membrane

cellulaire. On peut ainsi mesurer le potentiel électrique membranaire dans une cellule qui se situe typiquement aux alentours de -60 à -80 mV.

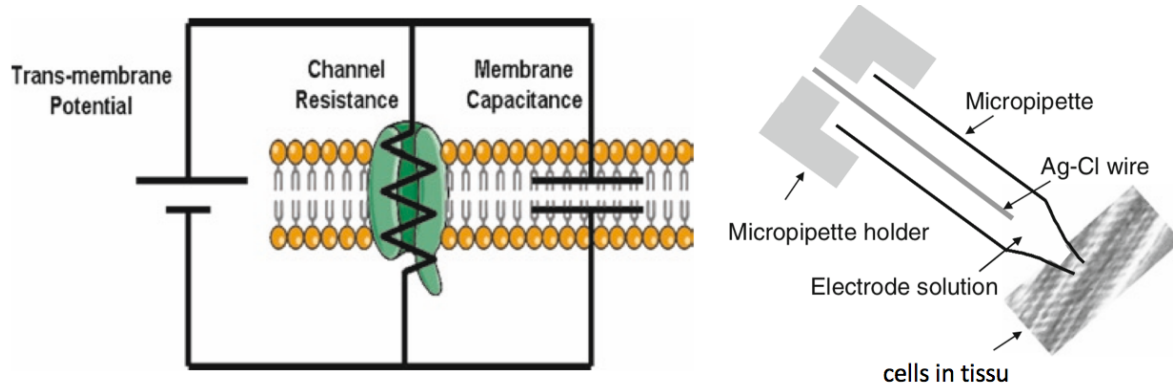
Pour mesurer la tension et/ou le courant cellulaire, cette technique repose sur le principe de la loi d'Ohm  $U=RI$  où  $U$  est le potentiel (ou la tension),  $R$  la résistance et  $I$  le courant (Conforti, 2012). De cette manière, si l'on assimile une cellule à un circuit électrique de type résistance condensateur (R/C), où les membranes contenant les lipides jouent le rôle du condensateur et les canaux ioniques contrôlant la diffusion des ions à travers la membrane jouent le rôle de résistance, on peut mesurer directement l'impact de l'activité des canaux ioniques sur les propriétés électriques des cellules (Fig. 28).

Sur ce principe de mesure simple, le patch-clamp est capable de mesurer en temps réel l'activité électrique d'un canal ionique unique au niveau de la membrane. Pour sa mise œuvre, elle nécessite l'utilisation d'une micropipette en verre se jointant à la membrane cellulaire avec une résistance de l'ordre du giga-ohm. On peut ainsi mesurer les changements de voltage et ou de courant sur des unités biologiques aussi petites qu'un canal ionique unitaire (qui fait environ 100nm de diamètre) situé directement sur la cellule, ou à partir d'un fragment de membrane. Cette technique s'est ainsi rapidement imposée comme la technique de référence pour l'étude des canaux ioniques et l'évaluation d'agents pharmacologiques ciblant ces canaux. Le développement du patch-clamp a ainsi permis aux scientifiques de mesurer et de caractériser l'activité de nombreux canaux ioniques grâce à son excellent pouvoir de résolution et à sa flexibilité. Néanmoins, la technique du patch-clamp est un processus laborieux et extrêmement lent. Le faible débit du patch-clamp et du voltage-clamp à deux électrodes, utilisé pour mesurer l'activité des canaux exprimés dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, a considérablement limité l'utilité de ces techniques pour la recherche de médicament ciblant les canaux ioniques (Jain et al., 2009).

#### 1.4.2.2.3 Approche technique et modes de mesure

La mesure de l'activité électrique d'une cellule ou d'un canal s'effectue par le biais d'une électrode de chlorure d'argent que l'on vient placer à proximité d'une cellule de quelques microns de large. Cette approche se fait via une micropipette de verre contenant l'électrode et une solution d'électrolyte conductrice. Grâce à la solution conductrice, le signal ionique est converti en signal électrique au niveau du fil d'AgCl via une réaction électrochimique. La pipette permet ainsi de sonder les mouvements d'ions transitant par les membranes (Fig. 28).

Pour sonder l'activité des canaux, les méthodologies utilisées seront différentes selon l'application et le but de l'étude. Dans la partie suivante, je vais vous détailler les différentes approches de patch-clamp couramment utilisées pour sonder l'activité des canaux ioniques.

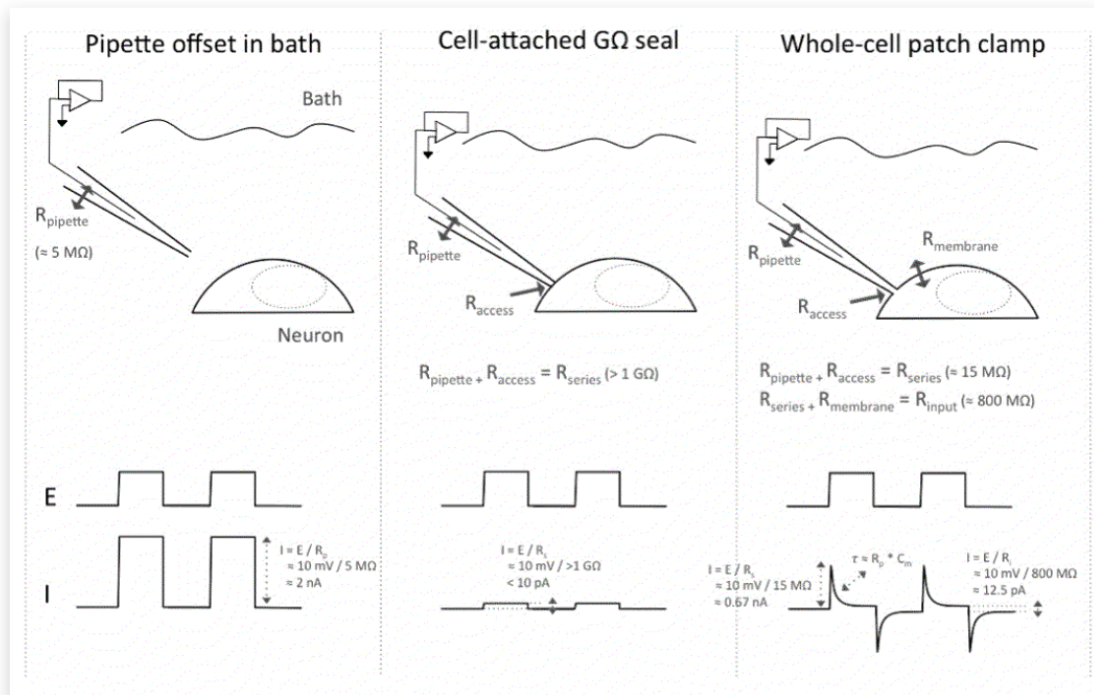


**Figure 28 :** Model d'un circuit électrique simplifié d'un canal dans la membrane plasmique et schéma montrant le montage d'une pipette de patch-clamp (Conforti, 2012).

La configuration « cellule attachée » correspond à l'approche initiale où l'orifice de la pipette est placé à proximité puis scellé sur une cellule grâce à une aspiration. Dans ce système, on peut enregistrer le courant en imposant un potentiel électrique transmembranaire tout en maintenant l'intégrité de la membrane plasmique. On peut ainsi mesurer les signaux électriques cellulaires sans perturber de manière invasive la membrane cellulaire ou les courants des canaux ioniques unitaires. Une approche similaire consiste à utiliser des détergents ou des antibiotiques pour « perforer » la membrane contenue dans la pipette du patch. De cette manière, les pores permettent l'équilibrage des petits ions monovalents entre la pipette de patch et le cytosol, tout en maintenant des niveaux endogènes d'ions divalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$  et des molécules de signalisation telles que l'AMPc. Cette configuration est idéale pour étudier les canaux ioniques tout en maintenant l'intégrité des cascades de signalisation des messagers secondaires.

La configuration de patch en cellule entière s'effectue en 3 étapes distinctes (Fig. 29). Elle commence par la configuration attachée. Dans cette configuration, au moment où une résistance de l'ordre du GigaOhm est atteinte (Gigaseal), le patch est brisé par une forte aspiration, permettant à la solution contenue dans la pipette de patch, d'entrer en contact direct avec l'intérieur de la cellule. Cette approche permet d'enregistrer le courant transitant à travers la totalité de la surface membranaire qui sera dépendant de la taille de la cellule et de l'ensemble des canaux inclus dans cette membrane. Avec le patch-clamp, on mesure les courants ioniques en appliquant de façon séquentielle, des sauts de potentiels à durée fixe et de valeur variable.

Cette approche est particulièrement adaptée pour étudier des canaux purement voltage-dépendants.

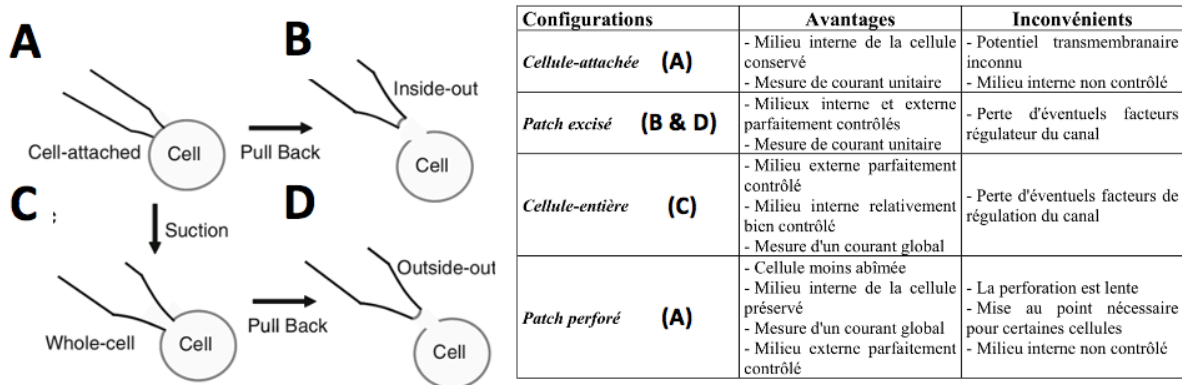


**Figure 29 :** Schéma décrivant les 3 étapes nécessaires à l'obtention du patch-clamp en cellule entière avec en dessous l'évolution des signaux d'intensité du courant (I) en fonction du stimulus de voltage imposé (E).

La configuration de patch excisé s'obtient en séparant la pipette de la cellule entière au moment de la rupture (aspirer/tirer), entraînant lors de la manœuvre le patch de la membrane bloqué dans la pipette (Fig. 30). Dans cette approche, deux configurations sont possibles pour permettre la mesure des courants unitaires des canaux :

- Configuration « outside-out » avec la face extracellulaire de la membranaire dirigée vers l'extérieur. Cette configuration est principalement utilisée pour étudier les canaux ligand-dépendants. On peut de cette manière imposer une tension (un potentiel) et mesurer le courant à l'échelle du canal unitaire. Cette technique de potentiel imposé permet de soumettre la membrane à des stimuli de dépolarisation et d'hyperpolarisation. Ces stimuli artificiels sont efficaces pour déclencher des potentiels d'actions et suivre l'évolution de la perméabilité de la membrane aux ions. Une autre approche est celle du courant imposé ou current clamp, où dans cette configuration, on mesure les changements de potentiel de membrane.

- Configuration « inside-out » avec la face intracellulaire de la membrane dirigée vers l'extérieur. Cette configuration est plus simple à obtenir que le « outside-out », et est utilisée pour mesurer les courant unitaires des canaux voltage-dépendants.



**Figure 30 :** Représentation schématique des différentes configurations de patch que l'on peut obtenir, accompagnée d'un tableau présentant leurs principaux avantages et inconvénients. Notons que l'obtention d'un patch perforé se fait en configuration cellule attachée avec un ionophore ou un détergent dans la pipette de patch.

Grâce à la technique du patch-clamp, nous avons accès à une large gamme de paramètres. En utilisant le patch en mode potentiel imposé, nous pouvons évaluer la sélectivité d'un canal à partir du potentiel d'inversion. Cette valeur s'obtient en mesurant le courant à différentes valeurs de potentiel selon un  $V_m$  imposé, pour générer un graphique appelé courbe IV. Sur cette courbe, la valeur du potentiel d'inversion est donnée par le point d'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses et correspond à la valeur de potentiel de membrane pour laquelle le flux ionique net est nul correspondant à un état d'équilibre électroosmotique où la quantité d'ions entrant est égale à la quantité d'ions sortant.

Grâce à ces différents modes de mesure nous pouvons mieux comprendre le comportement ionique d'une cellule ou d'un canal en état physiologique ou pathologique et comment différentes molécules sont susceptibles de modifier ces états. Cependant, ce sont des approches chronophages qui requièrent un équipement lourd avec des contraintes techniques nécessitant les compétences d'un expérimentateur confirmé.

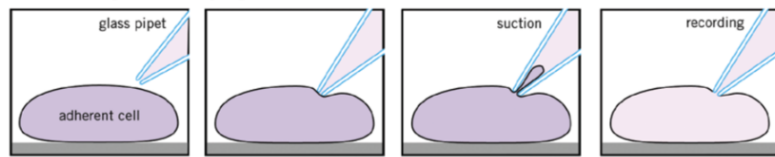
#### 1.4.2.2.4 Automatisation

Bien que le patch-clamp permette des mesures très qualitatives de l'activité des canaux ioniques, les meilleurs expérimentateurs arrivent à « patcher » 15 à 30 cellules par jour. Cette approche souffre, de fait, d'un rendement trop faible, incompatible avec une approche de criblage d'agents pharmacologiques à très haut débit (Dunlop et al., 2008; Terstappen et al., 2010).

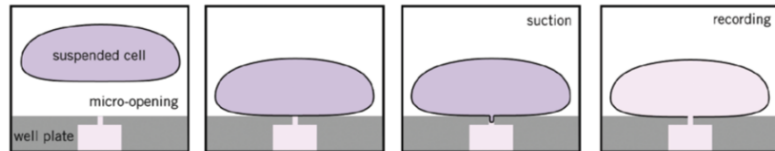
Dans le but de surmonter ces difficultés techniques, un nouveau format d'exploitation du patch-clamp a été développé au début des années 2000 : le patch-clamp planaire, ou patch-clamp sur puce (Fig. 31) (Korsgaard et al., 2009). Dans ce format, la micropipette est remplacée par un plan correspondant au fond du puits de culture dans lequel sont percés des trous micrométriques (Perkel, 2010). Sous ces trous, la micropipette de patch favorise l'aspiration des cellules en imposant une dépression. De cette manière, les cellules en suspension introduites dans les puits se positionnent juste au-dessus de la micropipette de patch facilitant l'étape de scellage. Ce nouveau format associé au progrès des techniques de microfluidique et de la microélectronique a ouvert la voie vers la parallélisation et l'automatisation des tests pour créer une nouvelle approche appelée patch-clamp automatisé dits « APC ». Ce format automatisé a permis la miniaturisation des essais et la réalisation de plusieurs enregistrements en parallèle pour obtenir des milliers de point de données par jours (Obergrussberger et al., 2016). L'APC a ainsi significativement amélioré le débit des données, tout en maintenant un niveau de qualité élevé des données générées très proche de celles obtenues avec le patch-clamp manuel (Janzen and Bernasconi, 2009).

Malgré ces améliorations, plusieurs problèmes subsistent. La capacité des appareils automatisés reste bien en deçà des besoins des grands industriels pharmaceutiques qui possèdent des banques de plusieurs millions de composés. À l'heure actuelle, très peu d'instruments ont les capacités d'atteindre des niveaux de performance permettant un débit suffisant au criblage de telles banques. Sur l'aspect économique, le coût d'exploitation de l'APC reste un frein non négligeable. Avec un cout d'achat initial avoisinant les 300 k€ (Bell and Dallas, 2018), les instruments actuels représentent un investissement considérable. De plus, les coûts de fonctionnement et de consommables peuvent vite s'avérer prohibitifs. C'est pourquoi une approche complémentaire réduisant les coûts est privilégiée lors des étapes précoces de criblage de médicament.

### A) Patch clamp Manuel



### B) Patch clamp sur puce



**Figure 31 :** Comparaison des approches A) de patch-clamp manuel et B) Patch-clamp sur puce. D'après (Perkel, 2010).

#### 1.4.2.2.5 Bilan

Le nombre de situations physiopathologiques impliquant les canaux ioniques n'ont cessé de croître depuis leur découverte jusqu'à aujourd'hui. Par effet de levier, les besoins en technologie d'analyse à haut débit pour ces cibles augmentent pour combler des besoins de recherche et de développement de médicaments ainsi que pour des applications de test sécurité des médicaments. Malgré l'émergence au cours des 15 dernières années des techniques de patchs automatisés ayant permis de réaliser un bon en avant dans les capacités d'analyse, aucune technologie n'est à l'heure actuelle, capable de combler l'ensemble de ces besoins. En effet ces technologies n'offrent pas un débit suffisant pour être utilisées comme outils principaux pour le criblage à haut débit, et le coût des instruments et des consommables est élevé. Par conséquent, des techniques à base de sondes fluorescentes sont souvent privilégiées dans les étapes précoces de développement de médicament.

## 2 Nouvelle approche pour l'étude des canaux ioniques et de leur pharmacologie à l'aide du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence

---

Actuellement, environ 650 médicaments ciblant les canaux ioniques sont en phases actives d'essais cliniques. Malgré ces succès majeurs portés par les nouvelles approches expérimentales de criblage HTS qui ont permis l'identification de ces nouvelles molécules, seul une quinzaine de molécules dont deux nouveaux médicaments ciblant des canaux ioniques ont été approuvés par la FDA depuis le début des années 2000 (Santos et al., 2017). Pour le moment, les espoirs et les attentes portées par ces nouvelles approches expérimentales de criblage HTS n'a pas abouti au résultat escompté (Hutchings et al., 2019). Pourtant, les applications thérapeutiques potentielles des canaux ioniques ne cessent de croître. En l'état, il reste intéressant de développer de nouvelles stratégies pharmacologiques pour identifier de nouvelles molécules et permettre le ciblage de nouveaux canaux ioniques.

Au cours des quinze dernières années, les approches fondées sur le transfert d'énergie par résonance (RET) ont offert de nouvelles opportunités pour mesurer l'activité d'une liste toujours croissante de protéines dans les cellules vivantes, en temps réel (Miyawaki and Niino, 2015). Ces techniques s'appuient sur le transfert d'énergie non-radiatif entre un donneur d'énergie et un accepteur d'énergie fluorescent compatible. Compte tenu de la stricte dépendance du transfert d'énergie en résonance à la distance et à l'orientation entre les dipôles donneurs et accepteurs d'énergie (environ 100 Å), les techniques de RET représentent un système de choix lorsqu'il est besoin de mesurer les interactions inter- et intra- moléculaires de manière dynamique. Parmi les différentes techniques RET, le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) est une méthode populaire, largement applicable et de plus en plus largement utilisée pour étudier l'activité des protéines dans les systèmes vivants. L'élimination du besoin d'une source de lumière externe pour l'excitation des groupes donneurs d'énergie donne au BRET certains avantages par rapport aux techniques connexes telles que le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Grâce à ces avantages, la technique du BRET a été largement utilisée pour étudier les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les kinases dans un contexte académique ou industriel (Ayoub, 2016; Kocan and Pflieger, 2011).



## 2.1 Construction du test biologique

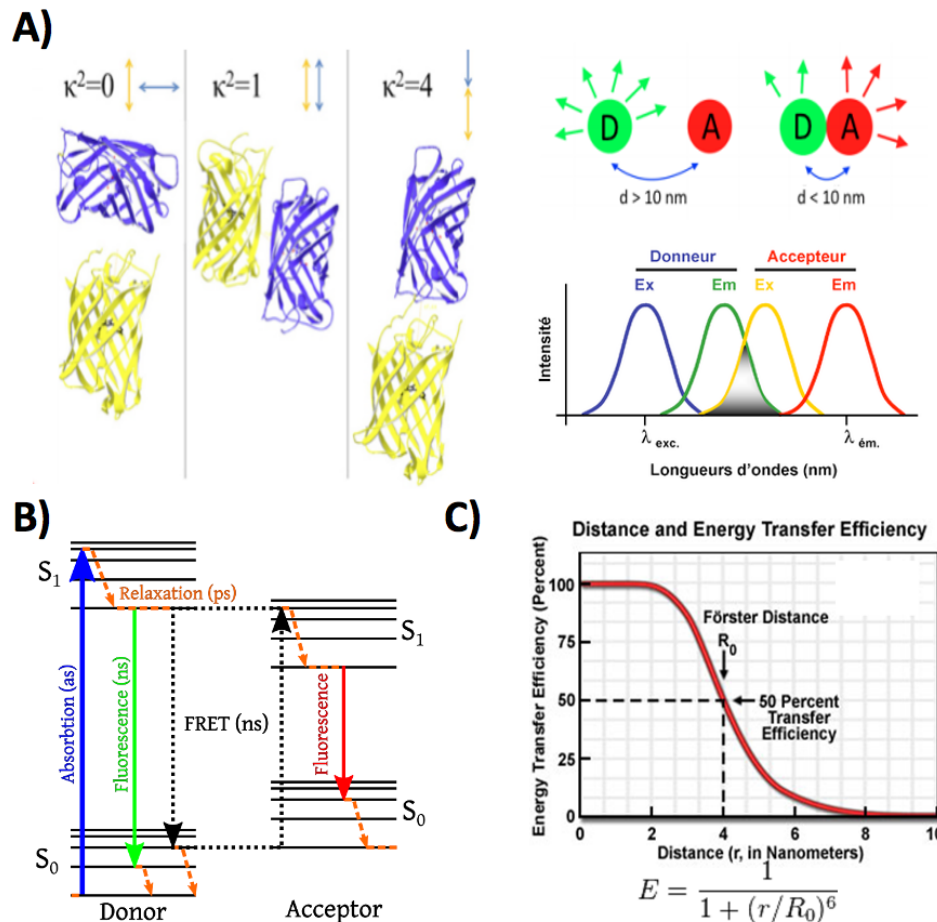
À ce jour, il n'existe qu'un petit nombre d'outils pharmacologiques sélectifs disponibles pour étudier la large gamme diversifiée de canaux ioniques. Contrairement à d'autres familles de récepteurs comme les RCPGs qui partagent des similitudes structurelles significatives, les canaux ioniques présentent une diversité structurale plus importante, ce qui représente à la fois un avantage pour mettre en œuvre des thérapies plus ciblées et un inconvénient, car cela démultiplie les cibles thérapeutiques potentielles et les tests à construire. Cette grande diversité de structures et de fonctions des canaux ioniques complexifie la mise au point d'un test fonctionnel uniforme. La mise en place d'un test qui puisse s'adapter aux différents types de canaux serait donc souhaitable. Aussi, pour construire un test de criblage, plusieurs paramètres doivent être pris en compte. Un test idéal doit :

1. Permettre une meilleure compréhension de la fonctionnalité du canal,
2. Cibler un large échantillon de canaux sans se limiter à une seule catégorie de canaux,
3. Permettre une richesse qualitative et quantitative des données,
4. Permettre d'obtenir des informations variées et complémentaires facilitant l'identification de la cible médicamenteuse (dysfonctionnements des protéines régulatrices altérant les propriétés biophysiques des canaux ioniques, la synthèse, le trafic membranaire et/ou des modifications post-traductionnelles et/ou peuvent moduler la variabilité phénotypique observée dans les familles affectées)

Dans le cadre d'une campagne de criblage à haut débit, le but est de mettre en place un test biologique qui convertit un processus biologique en un signal quantifiable représentant le dit processus. Nous pouvons observer les variations de ce signal à la suite de différents traitements (chimiques, physiques, stress...). Classiquement, la qualité d'un test se définit par la robustesse et la reproductibilité du signal mesuré. Qu'il soit biologique ou biochimique, le format du test doit permettre d'obtenir des données pertinentes se rapprochant le plus possible du contexte physiologique, le tout étant réalisé en plaque 384 puits au minimum pour disposer d'un débit d'analyse suffisant eu égard à la taille des banques à cribler.

## 2.2 Le principe du transfert d'énergie en résonance (RET)

Initialement décrit par Théodore Förster en 1948, le RET est un processus photophysique de transfert d'énergie sans émission de photon, dits non-radiatif, reposant sur une interaction dipôle/dipôle entre une molécule donneuse d'énergie et une autre acceptrice d'énergie compatible. Ce phénomène quantique est strictement dépendant de la distance et de l'orientation entre les deux dipôles donneurs et accepteurs d'énergie (Förster, 1948) (Fig. 32A). Ainsi, lorsque les conditions idéales d'orientation et de proximité des dipôles sont réunies, cette théorie stipule que, la désactivation par transfert d'énergie de la molécule donneuse d'énergie, placée dans un état excité, vers une molécule acceptrice, ne peut se faire qu'entre niveaux iso-énergétiques (Fig. 32B). Cette propriété implique que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (Fig. 32A). Le transfert non radiatif de l'énergie du donneur vers l'accepteur provoque alors le passage à l'état excité de ce dernier, lequel retournera à l'état fondamental en émettant un photon à sa longueur d'émission propre selon son rendement quantique. Förster a pu montrer que l'efficacité de ce transfert d'énergie est inversement proportionnelle à la puissance six de la distance séparant le dipôle donneur du dipôle accepteur d'énergie, ce qui rend le RET sensible à de petites variations de distance typiquement inférieures à 10 nm (Prasher et al., 1992) (Fig. 32C).



**Figure 32 :** Transfert d'énergie par résonance. A) Différentes configurations d'orientation des dipôles donneur et accepteurs et représentation du recouvrement spectral entre le donneur et l'accepteur d'énergie permissifs au RET. B) Diagramme de Jablonski représentant un transfert d'énergie non radiatif entre un donneur et un accepteur d'énergie fluorescent. C) Représentation schématique de l'efficacité de transfert d'énergie en fonction de la distance donneur-accepteur  $r$  et équation de l'efficacité du transfert d'énergie  $E$ .  $R_0$  est la distance de Förster définie, pour un couple accepteur-donneur donné, comme la distance permettant 50% de l'efficacité maximale du transfert.

### 2.2.1 La Green Fluorescent Protein « GFP »

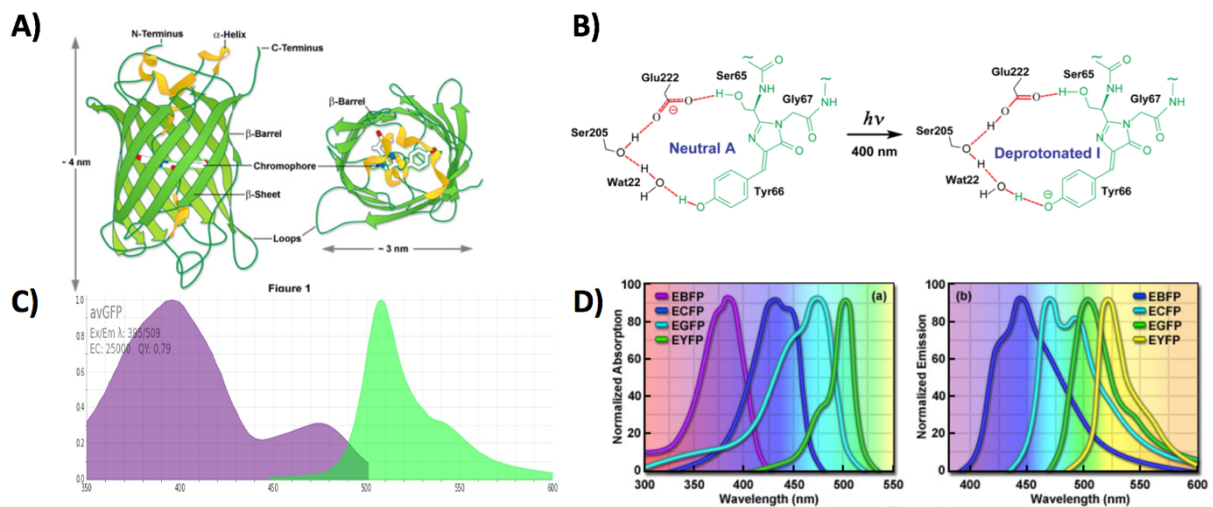
Les applications biotechnologiques modernes de la théorie du RET n'ont vu le jour qu'à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. Ces applications sont devenues possibles grâce la découverte et à la caractérisation de la Green Fluorescent Protein « GFP ». Elle fut la première protéine fluorescente à avoir permis ce type d'applications. La GFP fut découverte chez la méduse *Aequorea victoria* un organisme marin bioluminescent. Ses propriétés résultent d'un RET entre

une protéine aux propriétés bioluminescentes calcium dépendante « l'aequorine » et la protéine fluorescente GFP.

La GFP est une protéine composée de 238 acides aminés qui s'organise selon une structure quaternaire particulière appelée « tonneau Béta ». Ce tonneau Béta est constitué de 11 feuillets Béta contenant en son centre une hélice alpha et un chromophore (Fig. 33A). Ce chromophore se forme suite à la cyclisation oxydative spontanée des chaînes latérales des trois résidus Ser 65, Tyr 66 et Gly 67 (Fig. 33B). La formation de ce chromophore est essentielle à la maturation et à la fonction de cette protéine qui, grâce à lui, possède un rendement quantique d'émission de photon élevé. La GFP sauvage possède deux pics d'excitation, un majoritaire situé à 395 nm et un second situé vers 475 nm. Après excitation, la GFP réémet de la lumière à 509 nm (Fig. 33C) (Heim et al, 1994). La stabilité extrême de cette protéine la rend très résistante à la chaleur jusqu'à 65 °C, aux détergents, aux solvants organiques, aux sels chaotropiques, aux protéases communes (sauf à la pronase) et aux pH alcalins de 7 à 11,5 (Tsien, 1998).

La GFP fut ainsi la première protéine de ce type à avoir été cloné en 1992 par le groupe de Cormier (Prasher et al., 1992). Malgré une thermostabilité remarquable, la formation du chromophore de la GFP native est sensible à la température. Exprimée dans les cellules mammifères, la GFP native possède une fluorescence plus importante entre 30-33 °C plutôt qu'à 37 °C (Tsien, 1998). Ainsi, dans l'optique de développer des tests biologiques basés sur l'utilisation de la GFP chez les mammifères, les premiers mutants comme la EGFP « Enhanced Green Fluorescent Protein » du groupe de Falkow ont été développés. A la différence de la GFP sauvage, le mutant EGFP S65T et F64L dispose d'une plus grande thermostabilité à 37 °C et un seul pic d'excitation à 480 nm, ceci sans modifier la longueur d'onde d'émission produisant un signal fluorescent 4 à 35 fois supérieur à la forme sauvage (Cormack et al., 1996). Dans la EGFP, les mutations augmentent l'efficacité de repliement et de formation du chromophore. De la même manière, de nombreux autres mutants de la GFP en ont découlé. En 1996, différentes variantes spectrales de la GFP ont été publiées (Heim and Tsien, 1996), en ciblant le chromophore, des protéines avec des propriétés spectrales différentes sont générées conduisant la formation de nouvelles protéines fluorescentes de couleurs différentes qui émettent de la lumière sur un spectre qui s'étale du bleu (mutant Y66H pour BFP « Blue Fluorescent Protein ») au jaune (mutant T203Y pour YFP « Yellow Fluorescent Protein ») (Fig. 33D). Aujourd'hui, les techniques d'études fluorescentes reposent principalement sur l'utilisation de protéines de fusions mettant en œuvre une protéine d'intérêt fusionnée avec une protéine fluorescente issue des améliorations de la GFP (Tsien, 1998; Wang et al., 2008). La

découverte de la GFP et ses développements ont valu le prix Nobel de chimie à ses codécouvreurs Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien en 2008.



**Figure 33 :** A) Structure quaternaire de la GFP principalement composé de feuillet Béta. B) Structure du chromophore de la GFP permettant l'excitation et l'émission de photon. D'après (Fang, 2009 ; Tang et Fang, 2019). Spectres d'excitation et d'émission C) de la GFP sauvage d'après le site FPbase.org (Cormack et al., 1996) D) et de l'EGFP et des différentes variantes de couleur issues des mutants de la EGFP.<sup>2</sup>

### 2.2.2 La DsRed « RFP »

Bien que la GFP et ses mutant aient permis de couvrir une large palette de couleurs, elles n'ont pas permis d'obtenir des fluorophores pour les couleurs à variante orange et rouge. Pour les obtenir une autre protéine similaire à la GFP fut utilisée comme la DsRed issue du corail *Discosoma striata* Isolé par Matz et al. (Matz et al., 1999). La DsRed est un fluorophore qui émet dans le rouge à une longueur d'onde d'émission maximale de 583 nm après excitation à une longueur d'onde dont le pic est situé à 558 nm (lumière jaune). Contrairement à la GFP, la DsRed est un tétramère de tonneau bêta. Chaque tonneau bêta est constitué comme la GFP de 11 feuillets Béta. De plus, la maturation de la DsRed conduisant à la formation du chromophore composé de Gln66, Tyr 67 et Gly 68 est un phénomène beaucoup lent que pour la GFP (>24h). Durant cette maturation, la DsRed passe par différentes étapes intermédiaires ou le chromophore émet dans le vert, ce qui peut être problématique pour l'observation de certains phénomènes biologiques. De fait, de nombreuses améliorations lui ont été apportées.

<sup>2</sup> <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>

Des expériences de mutagenèse ont ainsi permis de créer des variantes monomériques comme la « Red Fluorescent Protein dit RFP » plus simple d'utilisation et avec des propriétés photophysiques améliorées, comme un meilleur rendement quantique proche de celui de la GFP et la création de variantes de couleurs. En tirant profit de la couleur rouge, qui pénètre mieux les tissus, d'autres sondes ont été créées comme mScarlet qui s'est avérée plus adaptée pour réaliser des approches d'imagerie optique in vivo que l'EGFP (Bindels et al., 2017).

### 2.2.3 La mNeonGreen

Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé la mNeonGreen, qui n'est pas une variante de la GFP, comme accepteur fluorescent. Publiée en 2013 par Shaner et al, mNeonGreen se compose de 237 acides aminés avec un poids moléculaire de 26,6 kDa (Shaner et al., 2013). Sa taille et sa structure sont très similaires à l'EGFP. Elle comprend 239 acides aminés et a un poids moléculaire de 26,9 kDa. Par contre, ce fluorochrome ne partage que 20 à 25 % d'identité de séquence avec les dérivés courants de la GFP. Un constat qui n'est pas étonnant étant donné que mNeonGreen est dérivé de la protéine de fluorescence jaune multimère de l'organisme *lancelet Branchiostoma lanceolatum*. Cette protéine fluorescente dispose d'un meilleur rendement quantique que la EGFP, qui la rend 3 fois plus brillante. mNeonGreen est également beaucoup plus brillant, mature beaucoup plus rapidement et est bien moins sensible aux variations de pH notamment acide (Clavel et al., 2016).

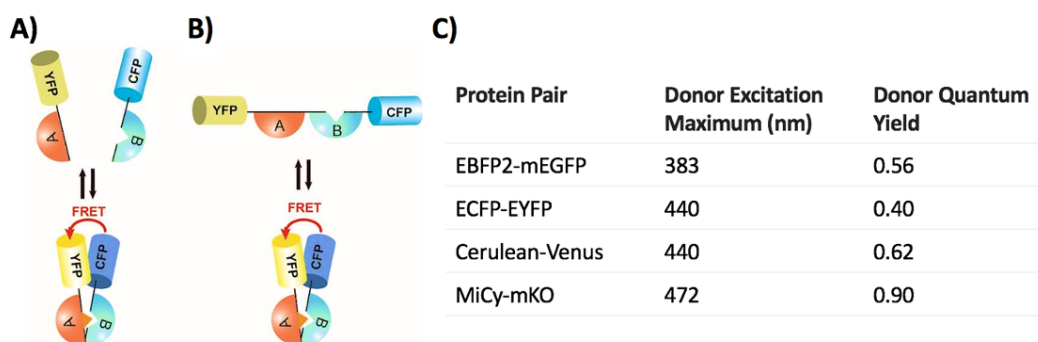
## 2.3 Le FRET

L'émergence des protéines fluorescentes a permis les développements technologiques et les applications du FRET « Florescence Resonance Energy Transfer » fondées sur le principe physique du RET décrit précédemment. Ces applications sont particulièrement utiles car elles permettent d'étudier les changements de conformation d'une protéine ou l'interaction entre deux protéines. Pour ce faire, il est nécessaire de créer des protéines de fusion avec la protéine d'intérêt et le fluorochrome en fusionnant leurs ADNc grâce à la biologie moléculaire. Généralement, les protéines fluorescentes ont un poids moléculaire relativement important. Dans le but de limiter leur impact sur la structure de la protéine, les couples de fluorochromes donneur et accepteur compatibles sont fusionnés sur les extrémités N- et C- terminales de la protéines pour éviter de perturber leur structure et fonction. On peut ainsi construire deux types de sondes FRET : les sondes intermoléculaires pour étudier l'association de deux protéines,

chacune portant un marqueur et les sondes intramoléculaires pour étudier les changements de conformation d'une protéine qui porte deux marqueurs qui se déplacent l'un par rapport à l'autre lorsque la conformation de la protéine change (Fig. 34A et B).

En pratique, une paire appropriée de fluorophores donneurs et accepteurs avec un bon chevauchement spectral est d'abord choisie pour marquer la ou les protéines d'intérêt. Comme par exemple la CFP qui possède un spectre d'émission avec des pics d'excitation à 433nm et 475nm qui recouvrent partiellement le spectre d'excitation de la YFP, qui réémet à un pic dont le maximal est situé à 528nm. De cette manière, un transfert d'énergie peut avoir lieu entre un couple CFP/YFP si les conditions d'orientation et de distance sont réunies. Le couple CFP/YFP est la première paire donneur/accepteur à avoir été décrite et sa version améliorée (ECFP/EYFP) est encore une des plus populaires à ce jour (Fig. 34C) (Miyawaki and Niino, 2015).

Dans le cas du FRET, l'excitation des fluorophores donneurs nécessite un laser d'excitation, ce qui permet des intensités d'émission élevées. Il est par conséquent facile d'observer des changements de structure ou de détecter des interactions même très faibles. Inversement, l'utilisation du laser pour irradier le donneur d'énergie est problématique car il peut (i) irradier l'accepteur (ii) induire le photo-blanchiment du donneur et de l'accepteur (iii) produire une auto-fluorescence cellulaire générant un important bruit de fond (Jares-Erijman and Jovin, 2003). Malgré leur grande utilité, il est important de garder à l'esprit que ces protéines fluorescentes se composent de 230 acides aminés et sont donc des protéines assez grosses (27 kDa) qui sont attachées aux protéines d'intérêt. Par conséquent, il est important de démontrer que l'activité de la protéine de fusion n'est pas altérée du fait de l'addition du ou des groupes impliqués dans le RET (Hoffmann et al., 2005).

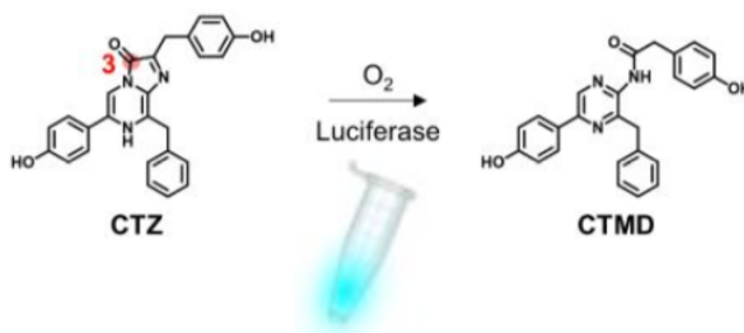


**Figure 34 :** Représentation schématique de sondes FRET **A)** intermoléculaires et **B)** intramoléculaire. Le groupement donneur d'énergie est schématisé en bleu, l'accepteur en jaune, les protéines d'intérêts étant schématisées en cyan et orange (Bajar et al., 2016; Miyawaki and Niino, 2015).

## 2.4 Le BRET

### 2.4.1 La Bioluminescence

Les principes de base du BRET sont globalement similaires à ceux du FRET, à la différence près que le BRET est basé sur l'utilisation de la luciférase, une enzyme bioluminescente, comme donneur d'énergie (Fig. 35). La bioluminescence est la production et l'émission de lumière par un organisme vivant via une réaction chimique au cours de laquelle de l'énergie biochimique est convertie en énergie lumineuse. La bioluminescence est un phénomène naturel largement répandu, notamment chez les vertébrés et les invertébrés marins, ainsi que chez certains champignons, micro-organismes, comme certaines bactéries bioluminescentes, et des arthropodes terrestres tels que les lucioles. Généralement, la bioluminescence met en jeu une réaction biochimique d'oxydo-réduction où un enzyme appelé luciférase, catalyse l'oxydation d'un substrat appelé luciférine correspondant à une famille de composés chimiques, chacun étant spécifique d'une luciférase.



**Figure 35 :** Représentation de la réaction biochimique de bioluminescence catalysée par la luciférase (Ikeda et al., 2020).

### 2.4.2 Bioluminescence et transfert d'énergie en résonance

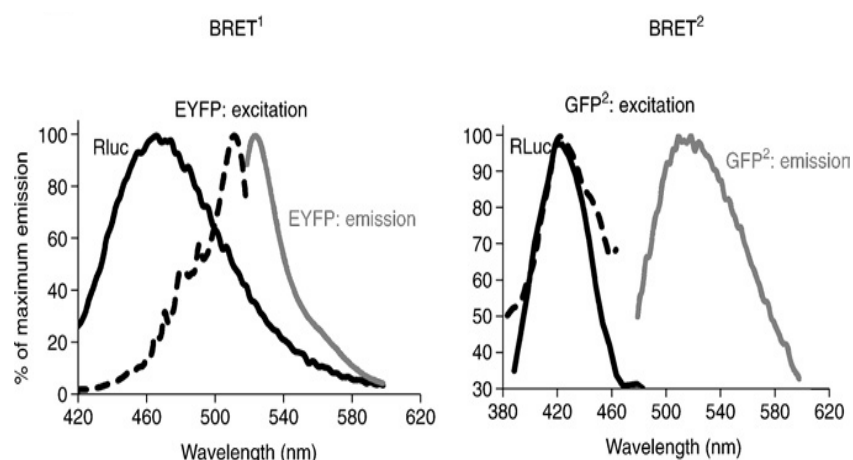
Dans le cas du BRET, l'enzyme donneur d'énergie bioluminescente catalyse l'oxydation d'un substrat la coelenterazine en coelenteramide. Lors de la catalyse, il y a formation d'espèces excitées dont l'énergie, une fois libérée au cours de la catalyse, est transférée vers un accepteur fluorescent compatible, comme des protéines dérivées de la GFP et dont le spectre d'excitation est compatible. L'avantage majeur de cette approche repose sur l'absence d'une source d'excitation externe susceptible de provoquer divers biais comme l'auto fluorescence cellulaire et le photo-blanchiment. De plus, les faibles niveaux d'émission par le



donneur d'énergie limitent la contamination des signaux accepteurs et permettent des rapports signaux sur bruit 10 fois plus intéressants avec le BRET comparé au FRET. De la même manière, la qualité du signal obtenu n'est limitée que par la capacité du luminomètre à capter suffisamment de signal. Avec cette stratégie BRET, on peut par conséquent utiliser des niveaux d'expression de protéines très faibles, proches des conditions physiologiques (El Khamlichi et al., 2019).

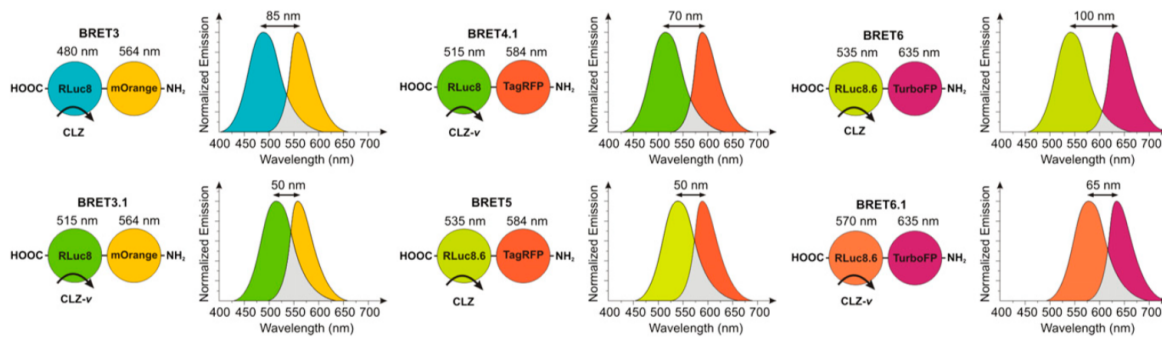
Le système d'origine appelé BRET1 utilisait eYFP et la Luciférase de l'organisme *Renilla reniformis* « rLuc » avec la benzyl-coelenterazine dite coelenterazine h ou « CoeH » comme substrat dans la réaction d'oxydation pour générer de la lumière avec un pic d'émission à 480 nm. La eYFP de son côté possède un maximum d'excitation à 512 nm. Par conséquent, le recouvrement des spectres du donneur et de l'accepteur n'est pas optimal, mais permet un transfert moyennement efficace d'énergie non radiative et le suivi de signaux BRET jusqu'à 1 h après injection de la coelenterazine (Griesbeck et al., 2001).

Depuis, de nombreuses améliorations ont été apportées à la technique pour la rendre plus fiable et plus résolutive (Fig. 36). La génération suivante dite BRET 2 a utilisé une variante GFP différente appelée GFP2, qui émet de la lumière à la même longueur d'onde que la GFP normale mais dont le maximum d'excitation est situé à 400 nm. Son utilisation a nécessité un nouveau donneur compatible en utilisant de la DeepBlueCoelenterazine à la place de la CoeH avec la rLuc. Par conséquent, la nouvelle variante GFP2 est caractérisée par un grand décalage de Stokes (Abs de 400nm et Em de 515) limitant la superposition des deux spectres donneurs et accepteur mais avec une décroissance du signal BRET plus faible et un rendement quantique 100 fois inférieur à celui de la coelenterazine h (Hamdan et al., 2007).



**Figure 36 :** Spectres d'absorption et d'émission de la Luc et de la YFP en BRET1 et de la Luc et de la GFP2 en BRET2 (d'après (Hamdan et al., 2007)).

Plus tard, de nouvelles variantes de la Luciférase avec des propriétés améliorées ont vu le jour comme Rluc2 et Rluc8 (Loening et al., 2006 ; De et al., 2007) caractérisées par une plus forte émission de lumière et un meilleur rendement quantique du transfert d'énergie en BRET2. De nombreux autres systèmes avec différentes couleurs ont suivi (BRET 3 à 6) élargissant les applications du BRET permettant par exemple des mesures au sein de tissus ou sur des modèles animaux (Fig. 37).



**Figure 37 :** Différentes variantes de tests BRET permettant d'élargir ses applications. La Luciférase utilise soit la Coelenterazine H (CLZ), soit la coelenterazine synthétique (CLZ-v), qui accroît encore plus le décalage bathochrome du pic d'émission de la rLuc 8.6 d'après (Dragulescu-Andrasi et al., 2011).

Mais très récemment, la découverte de nouvelles luciférases tel que la Gaussia Luciférase et la nanoLuciférase plus petites et avec un meilleur rendement quantique ont permis l'émergence de la génération dite « NanoBRET ». Cette génération NanoBRET est la dernière à avoir vue le jour et celle, qui a tendance à se démocratiser le plus. Ce système utilise la nanoLuciférase de 19kDa optimisée à partir de la OLuc de la crevette *Oplophorus gracilirostris*, dont le spectre d'émission est décalé dans le bleu (465nm). En utilisant un nouveau substrat imidazopyrazinone appelé furimazine, la nanoLuc produit un signal 150 fois plus élevé et plus stable que la Luciférase de *Renilla reniformis*, dont le signal peut durer plus de 2 heures. Grâce à sa petite taille et son fort rendement, elle limite les encombrements stériques et a permis le développement de nouveaux biocapteurs BRET hautement sensibles.

#### 2.4.3 Technique de marquage et clonage

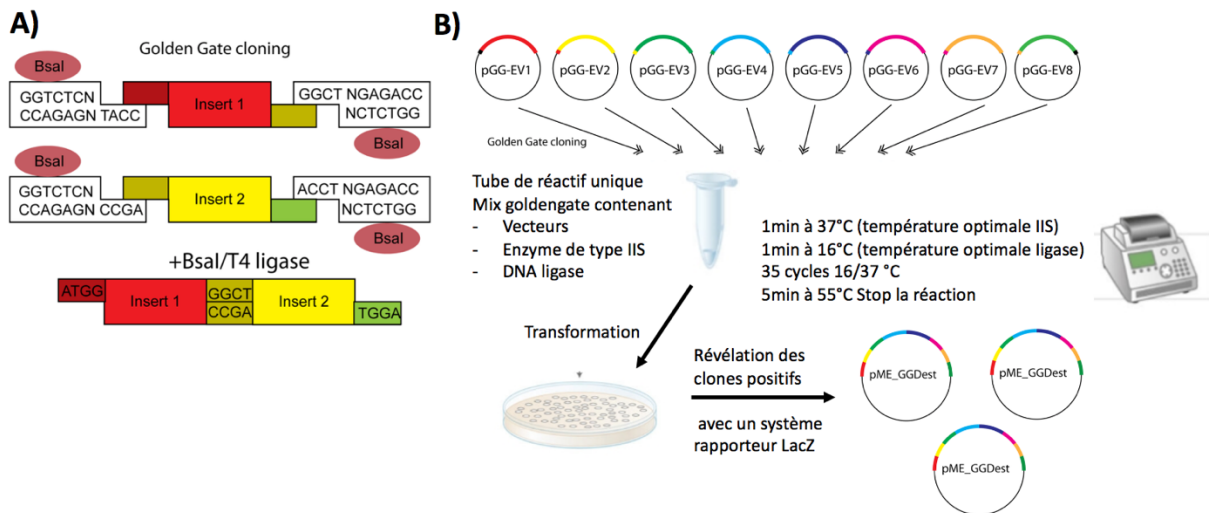
Les techniques de BRET nécessitent l'utilisation de protéines de fusion entre les protéines d'intérêt et soit la luciférase, soit une protéine fluorescente ou une séquence de fixation d'un composé fluorescent compatible. Dans notre cas, afin de limiter l'impact du

marquage sur les fonctions des protéines étudiées, nous avons restreint le marquage à un strict étiquetage des extrémités N- et C- terminales. Pour atteindre ce but et faciliter les étapes de clonage, nous avons développé une approche utilisant le principe du GoldenGate pour construire l'ensemble des sondes qui ont été utilisées dans ce projet.

La technologie de clonage GoldenGate repose sur l'utilisation des enzymes de restriction de type IIS, découvertes pour la première fois en 1996. Les enzymes de restriction de type IIS se distinguent des enzymes de restriction classique, car elles ont la capacité de cliver en dehors de leur séquence de reconnaissance en N+1/2, au lieu de couper à l'intérieur d'une séquence consensus palindromique. De fait, les enzymes de type IIS génèrent des séquences flanquantes débordantes de 4 acides nucléiques (Fig. 38A). En tirant profit de ces séquences débordantes que l'on peut personnaliser à souhait, nous pouvons réaliser des assemblages de « briques d'ADN » de manière orientée dans le plasmide final (qui ne contient plus les sites de type IIS). Cette approche permet d'effectuer des assemblages précis et ordonnés de différentes séquences d'ADN, le tout dans un seul et unique mélange réactionnel contenant les brins d'ADN, le tampon de ligation, l'enzyme de restriction IIS et la T4 DNA ligase. Grâce au GoldenGate, le clonage des sondes est ainsi grandement facilité en termes de temps, de débit et contraintes de manipulation (une réaction prend 1h en moyenne). Grâce à cette technique, l'obtention de colonies ne prend que 24h (Fig. 38B)(Engler and Marillonnet, 2014).

L'utilisation de cette approche présente un certain nombre d'avantages. Bien que les vecteurs de destination d'origine et ceux contenant les inserts puissent spontanément se reformer, cette construction ne sera que transitoire car elle conserve les sites de restriction de type IIS et sera donc à nouveau re-digérée par l'enzyme de restriction de type IIS toujours présente dans le mélange réactionnel. La réaction de GoldenGate est donc une réaction unidirectionnelle qui tend vers la formation des produits finaux. L'efficacité de clonage tend ainsi vers 100%, bien qu'elle soit dépendante du nombre et de la taille des fragments générés.

Un autre avantage tient en la taille des séquences débordantes générées, à la fois suffisamment grande pour permettre 256 combinaisons différentes ( $4^4$ ) et petite pour éviter de trop fortes contraintes réactionnelles pour réaliser l'assemblage. Bien qu'il y ait 256 combinaisons différentes, des séquences qui ne diffèrent que d'une base peuvent entraîner des produits de ligation involontaires. Cette stratégie de clonage m'a permis de construire un grand nombre de sondes différentes et un gain de temps et d'argent par la réutilisation des briques d'ADN préalablement synthétisées.



**Figure 38 :** A) Représentation de base du système de clonage en assemblage ordonné GoldenGate utilisant des enzymes de restriction de type IIS. B) étapes expérimentales permettant l'obtention des produits finaux. D'après (Engler and Marillonnet, 2014).

# RESULTATS

## 3 Étude des canaux ioniques voltage-dépendants à l'aide du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence

---

### 3.1 Développement des tests BRET intramoléculaires

Les réarrangements conformationnels sont des événements couramment observés dans les protéines membranaires. Ils constituent la base des mécanismes moléculaires par lesquels ils contribuent à la transduction du signal. Lors d'un stimulus électrique ou chimique, un canal ionique s'active en subissant des changements de conformation qui entraînent l'ouverture du pore ionique, et la diffusion des espèces ioniques sélectionnées au travers de celui-ci. Ces informations sur les changements structurels des canaux ont principalement été déduites d'études structurales et fonctionnelles. Une alternative pour étudier les canaux consiste à mesurer ces changements conformationnels, qui interviennent de façon concomitante lors de l'ouverture du pore, et peuvent se répercuter jusqu'aux extrémités N- et C-terminales. En se basant sur ce principe et sur la technologie BRET détaillée précédemment, l'équipe de Yann Percherancier, dans laquelle j'ai effectué ma thèse, a pu montrer qu'il était possible de mesurer l'activation des canaux TRPV1, TRPV3 et TRPV4 par des ligands agonistes à l'aide de sondes BRET intramoléculaires où la luciférase et la YFP sont fusionnés aux extrémités N- et C-terminales de ces canaux (Ruigrok et al., 2017). Ces chercheurs ont pu montrer que les variations du signal de BRET mesuré à partir de ces sondes intramoléculaires rendaient parfaitement compte de l'activation des canaux de type TRPs dans les modes thermiques et chimique. Ces résultats valident le fait que les changements de conformation concomitant à l'ouverture du canal se répercutent effectivement sur la distance et/ou l'orientation entre les extrémités N- et C-terminal.

Ces expériences ont positionné le BRET comme une technique potentiellement d'importance pour l'étude des canaux ioniques dans un contexte académique, mais également dans un contexte industriel. Il devenait alors important d'étudier comment les sondes BRET ciblant les canaux ioniques se positionnaient, en termes d'efficacité et de sensibilité, par rapport aux techniques actuelles de criblage de médicaments à haut débit ciblant les canaux ioniques. Dans cette optique, nous avons évalué la pertinence d'utiliser la technique de transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET) avec les sondes BRET intra- et inter- moléculaire comme nouvelle méthode de criblage à haut début d'analyse pour étudier les canaux ioniques et leur pharmacologie.

### 3.2 Article 1 : Criblage haut débit des ligands de TRPV1 à la lumière du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence

# 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>.

[S] 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* DH5α 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-Calmoduline 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 mNeon-Green 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:

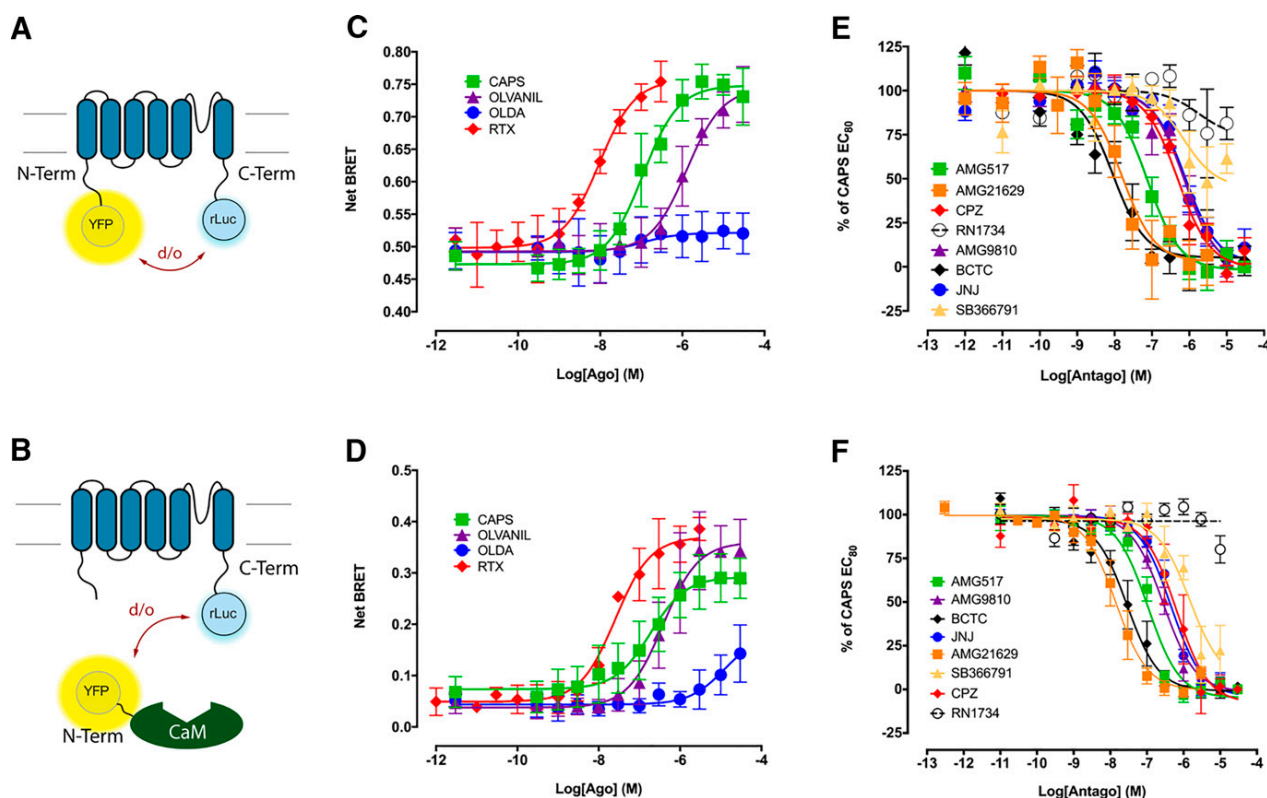
$$\text{normalized Current} = 100 - \left( \frac{I_{\text{comp}} - I_{\text{base}}}{I_{\text{ref}} - I_{\text{base}}} \times 100 \right) \quad (8)$$

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].

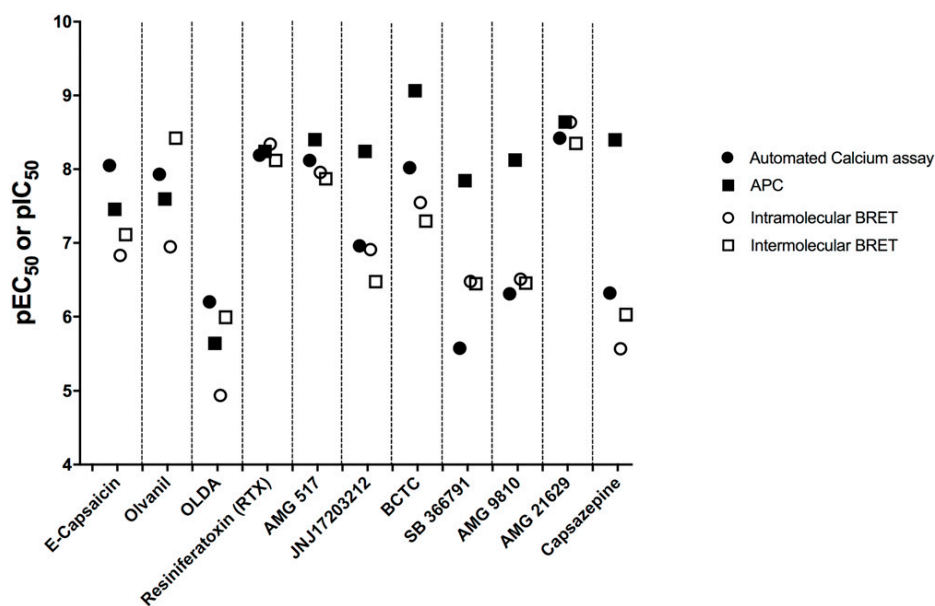
**The Primary Screen of the Prestwick Chemical Library for TRPV1 Activation and Inhibition.** Based on this conclusion, we used HTS experimental conditions with ACA and both intra- and intermolecular BRET probes to screen the Prestwick chemical library for both activation (Fig. 4) and inhibition (Fig. 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>Olvanil</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>Antagonists</b>	<b>AMG 517</b>	7.12 ± 0.10	7.95 ± 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	(Gunthorpe 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)





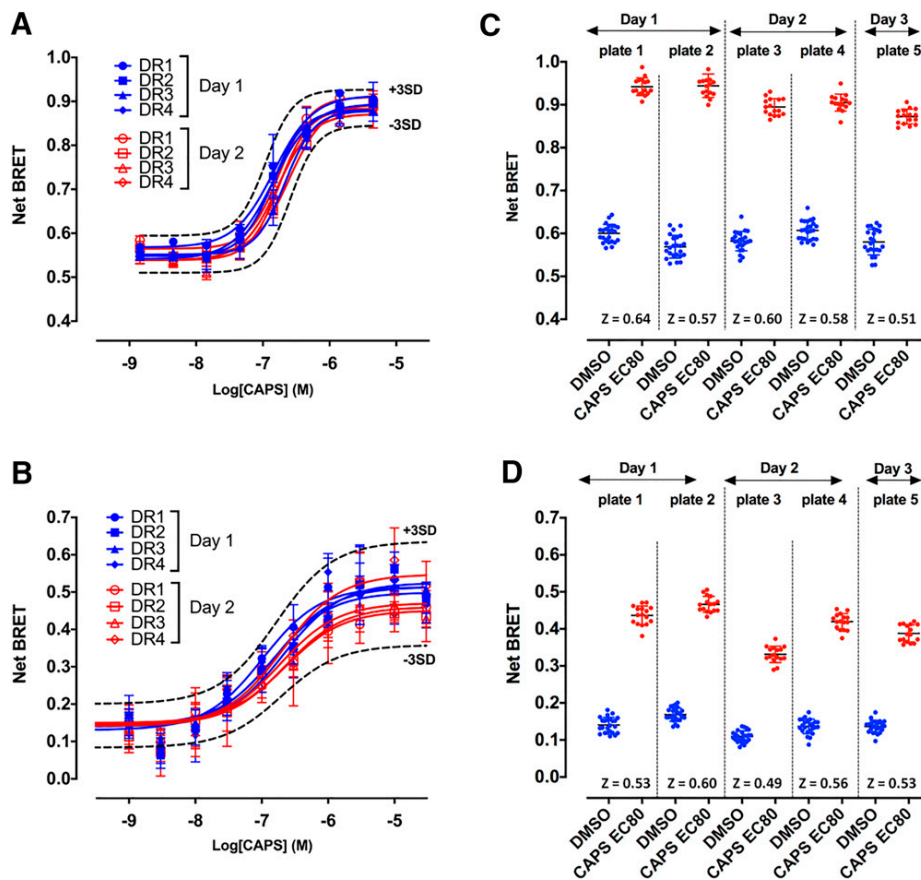
**Fig. 2.** Comparison of the reference agonist and antagonist potencies when measured in HTS conditions using either the intramolecular BRET probe, the intermolecular BRET probe, APC, or ACA.

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



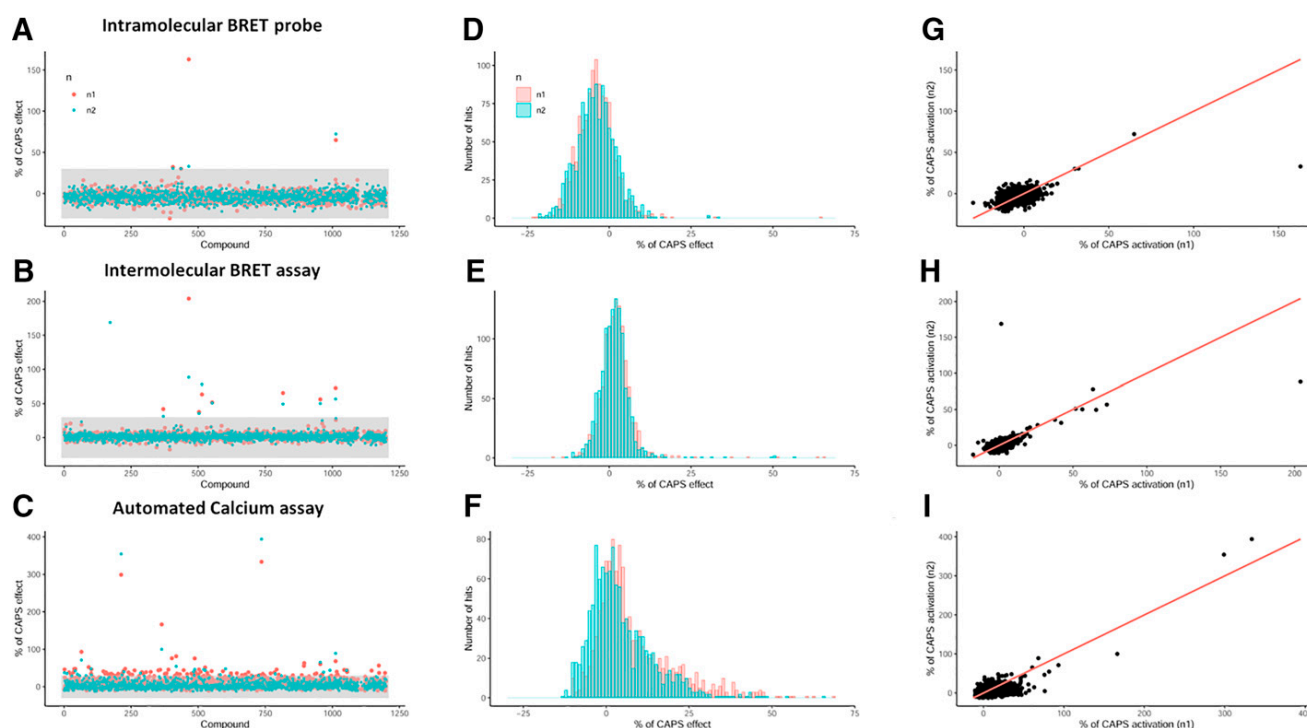
**Fig. 3.** Validation of the suitability of the intramolecular and intermolecular BRET assays targeting TRPV1 for HTS. (A and B) Assessment of the technical and biological reproducibility to measure CAPS-induced dose-dependent increase of the BRET signal measured with intramolecular (A) and intermolecular (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





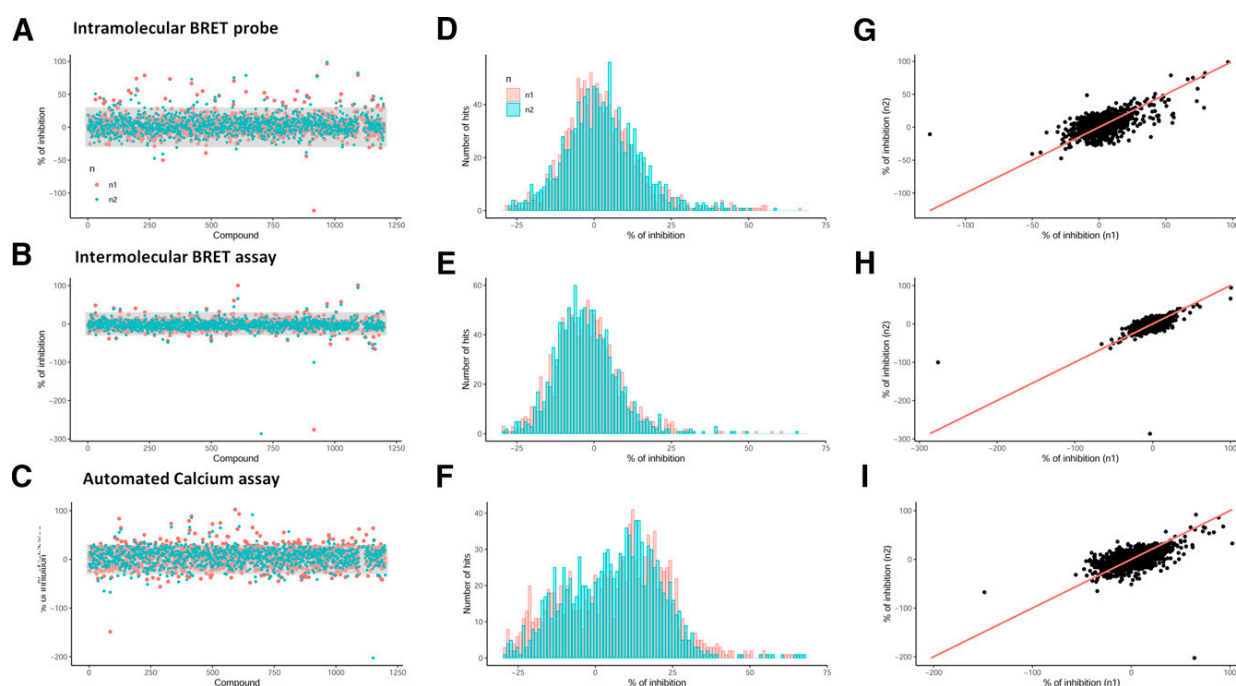
**Fig. 4.** Screening of the Prestwick Chemical Library for identification of TRPV1 activators. “n1” and “n2” stand to the first and second screens. (A, B, C) Identification of candidate compounds activating TRPV1 in the primary screen of the Prestwick chemical library using the intramolecular BRET probe (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.

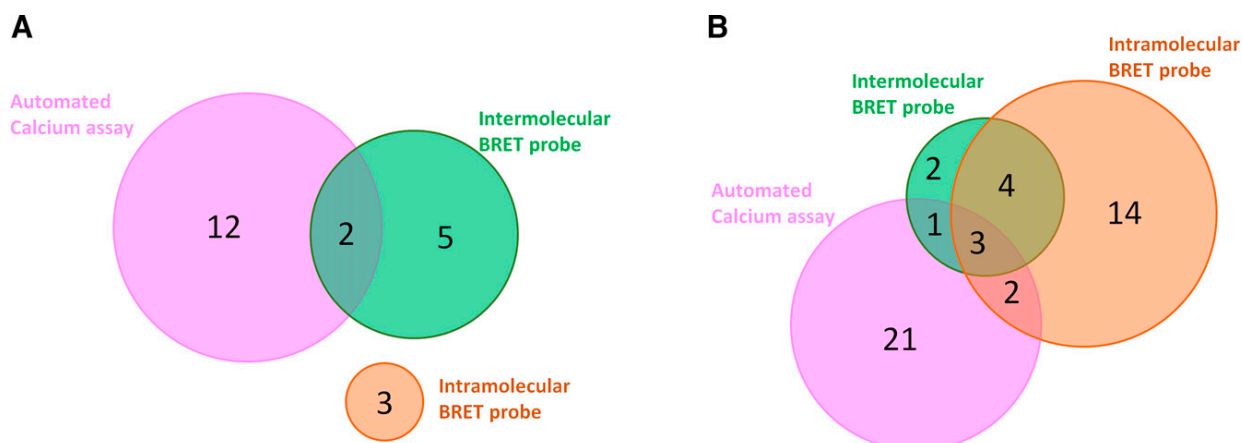
The most important correlation arising from this multi-parametric analysis points to a significant enrichment of drugs belonging to clusters E, G, and J into group 7 of the dendrogram (Supplemental Fig. 4). This prompted us to perform an in-depth analysis of the literature focusing on these clusters. 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.

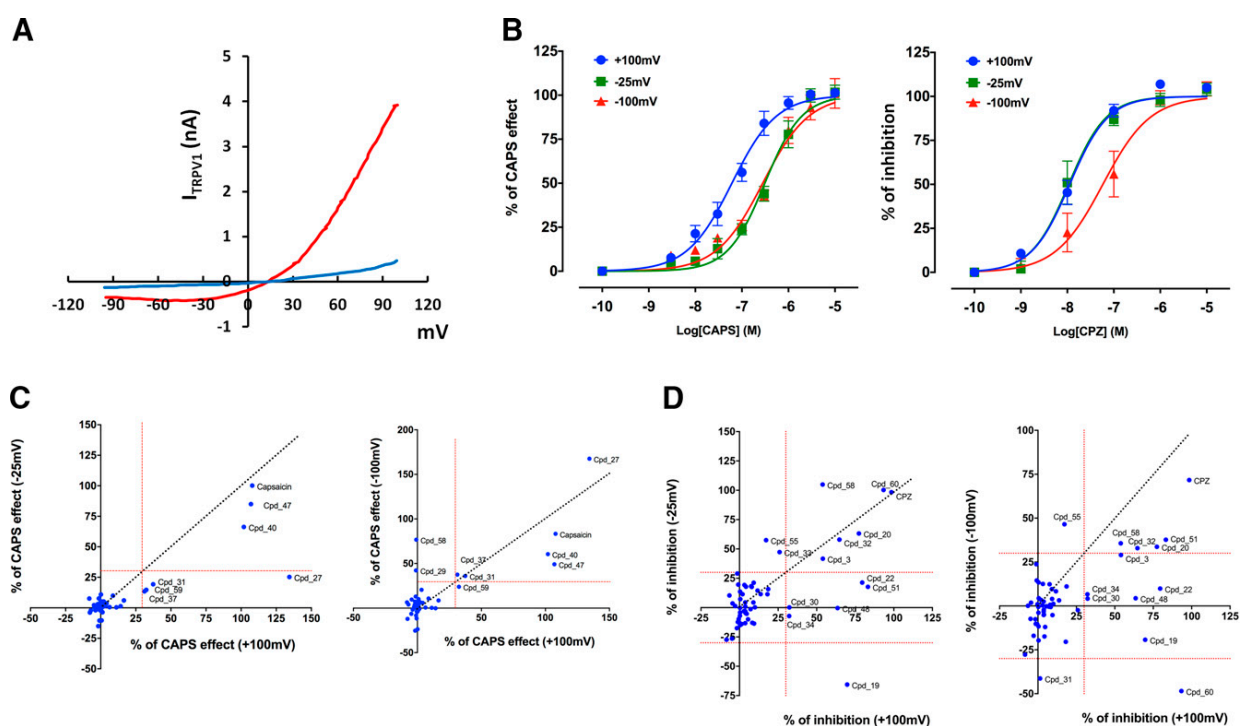
	Intramolecular BRET Probe	Intermolecular BRET Probe	Calcium Assay
Agonist mode	100% (3)	87.5% (7)	18.1% (16)
Antagonist mode	42.6% (23)	58.8% (10)	31.2% (28)



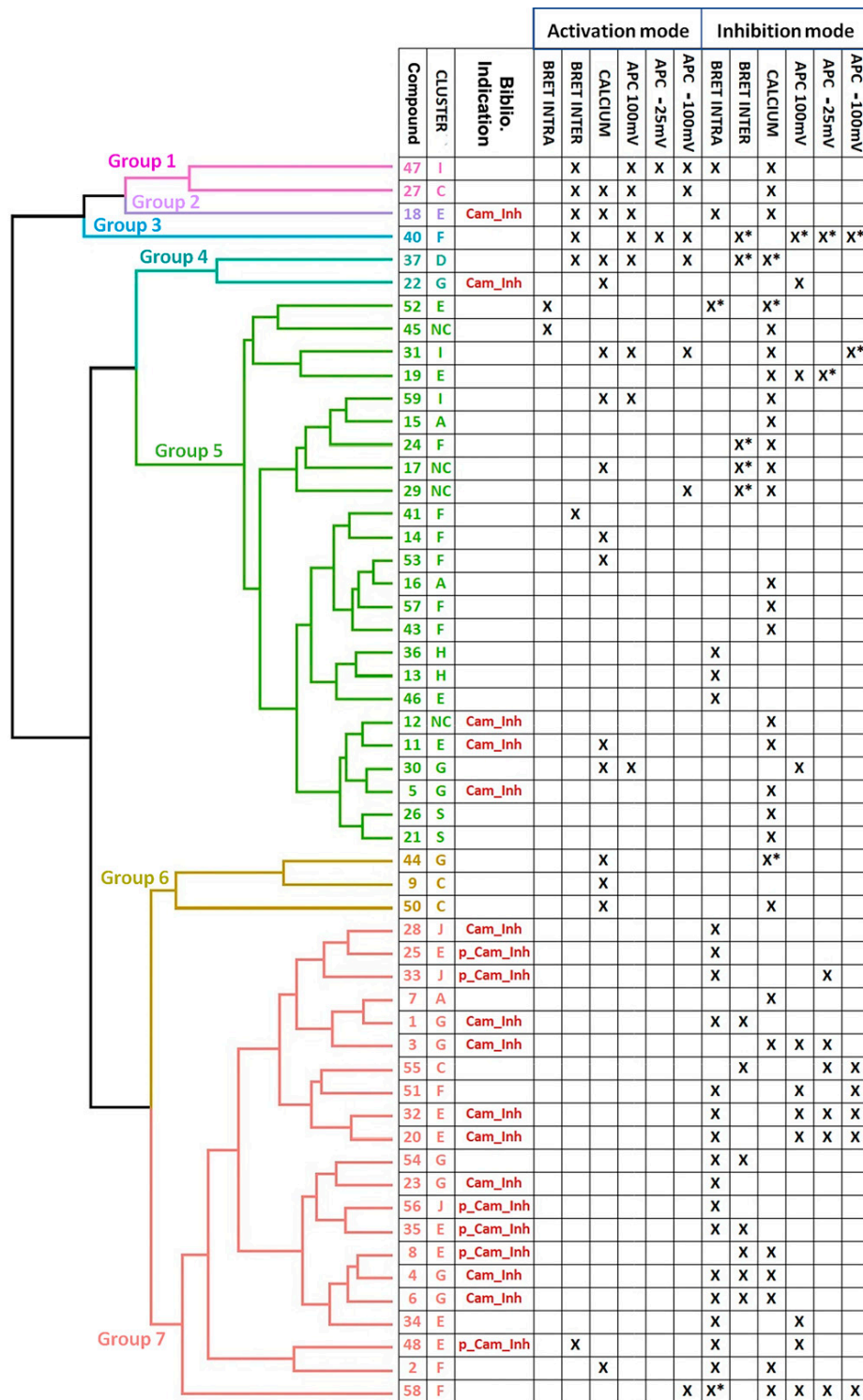
**Fig. 6.** Venn diagram of the hits detected with the TRPV1 intramolecular BRET probe, TRPV1 intermolecular BRET assay, and ACA in the activation mode (A) and in the inhibition mode (B).

Cluster J contains 3 compounds [felodipine (#28), lacidipine (#33), and ciltidipine (#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 ciltidipine, 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- $\text{TRPV1}$  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).

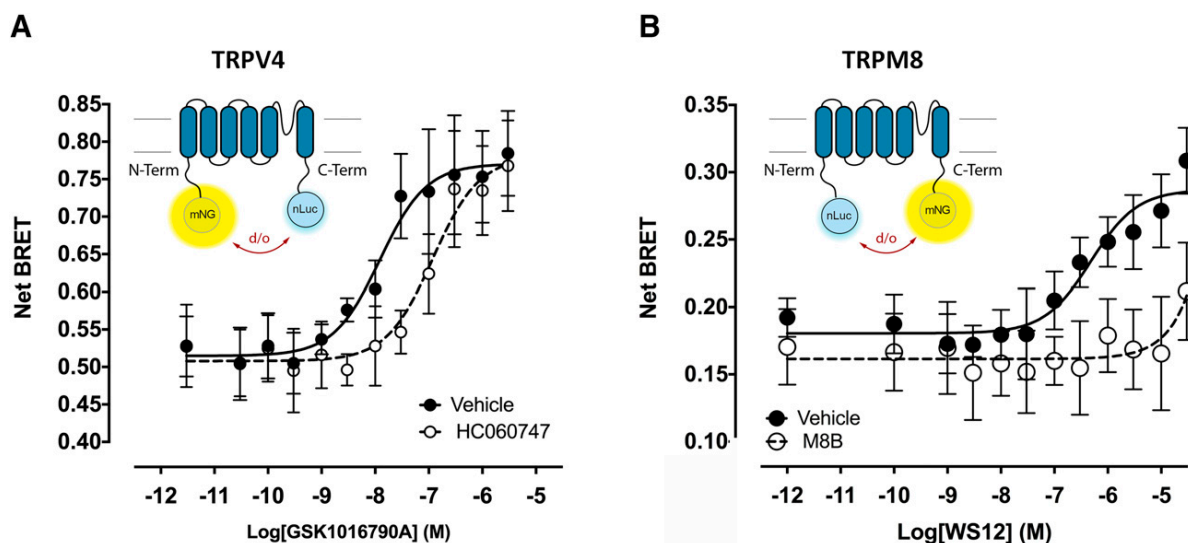
To the best of our knowledge, the only hit compound which has been shown to inhibit purified CaM *in vitro* (Schaeffer et al., 1987) and which does not belong to clusters E, G, or J is

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.

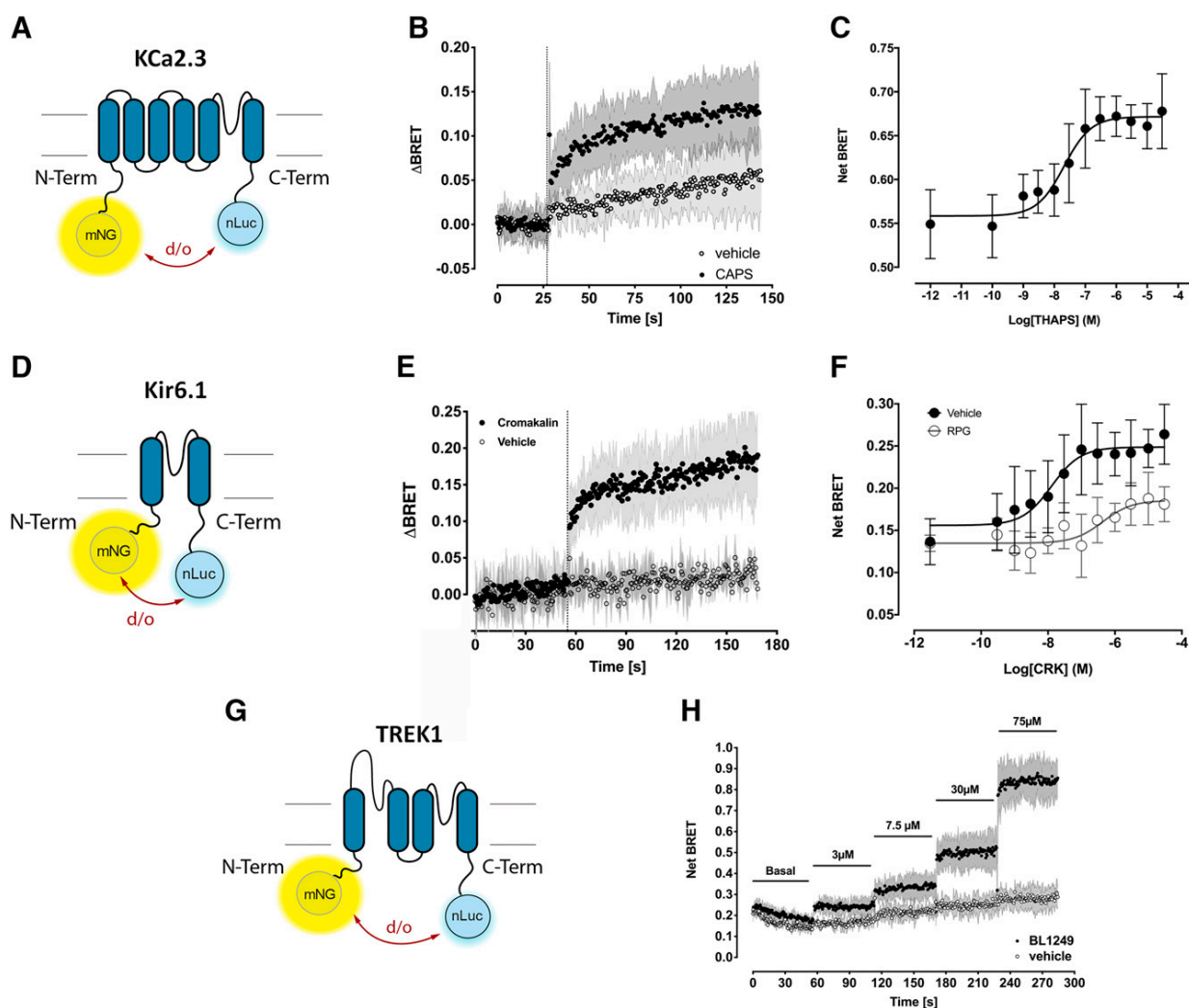
been reported. Finally, two studies suggest that TRPV1 contributes to  $Ca^{2+}$  influx triggered in vagal nociceptive neurons by the well known antibiotic antimycin A (#17), which belongs to the miscellaneous cluster (Nesuashvili et al., 2013; Stanford et al., 2019).

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



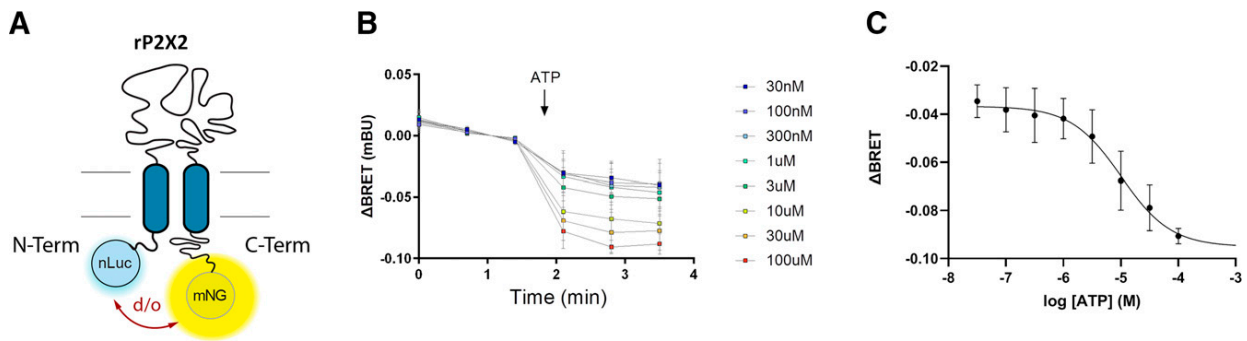
**Fig. 10.** Assessment of the functionality of intramolecular BRET probes targeting KCa2.3, Kir6.1, and TREK1. (A) Schematic representation of mNeonGreen-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe. (B) Kinetic measurement of the effect of CAPS (10  $\mu$ M) or vehicle on the BRET ratio measured from HEK293T 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 μM 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) Indiscriminate 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, Imkke 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.

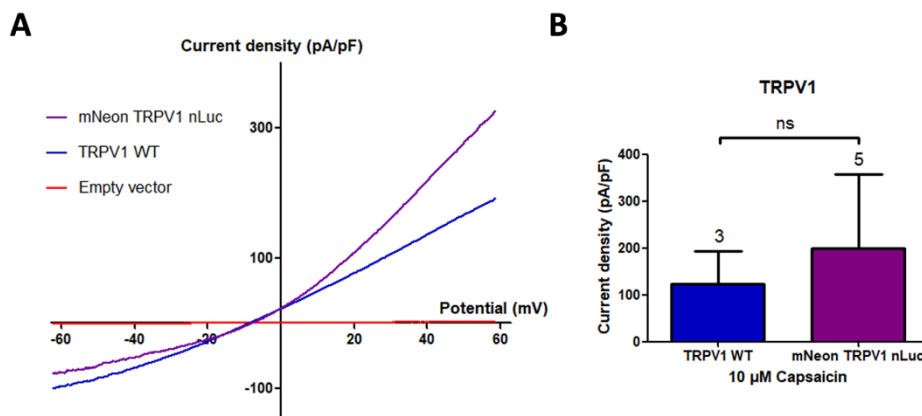
- Johnson JD and Wittenauer LA (1983) A fluorescent calmodulin that reports the binding of hydrophobic inhibitory ligands. *Biochem J* **211**:473–479.
- Kaczorowski GJ, McManus OB, Priest BT, and Garcia ML (2008) Ion channels as drug targets: the next GPCRs. *J Gen Physiol* **131**:399–405.
- Kassambara 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.
- Meseguer 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, Peeze 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, Luginer 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 KM, 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.

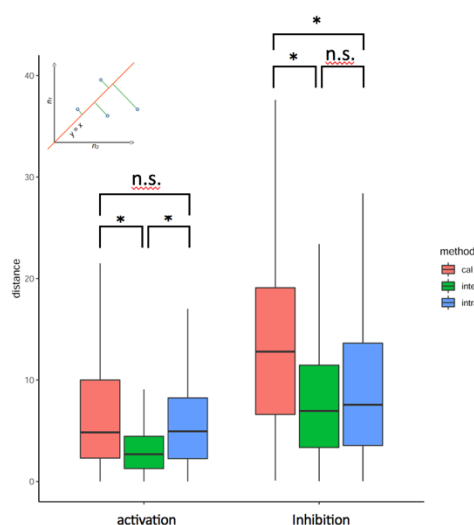
---

**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)

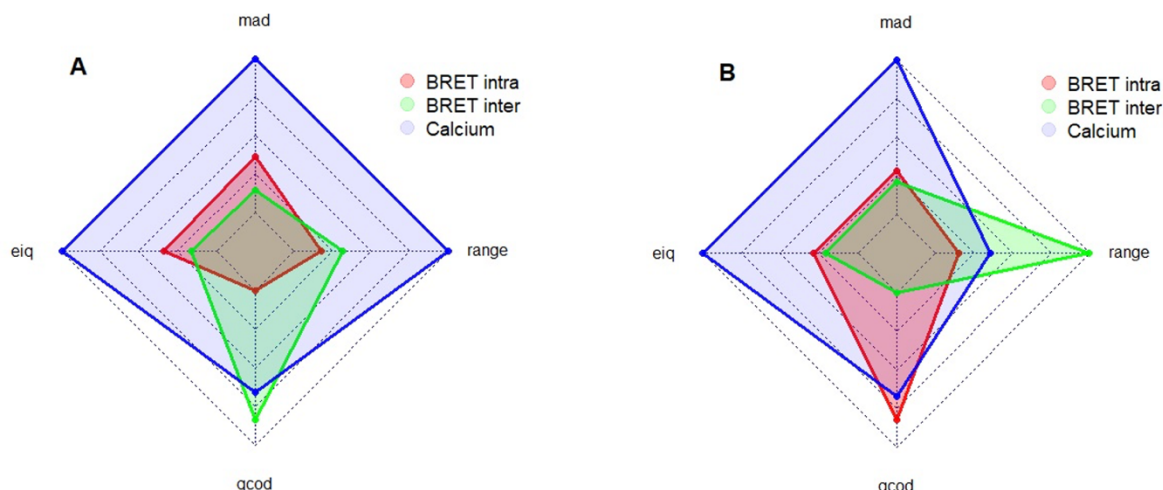
---



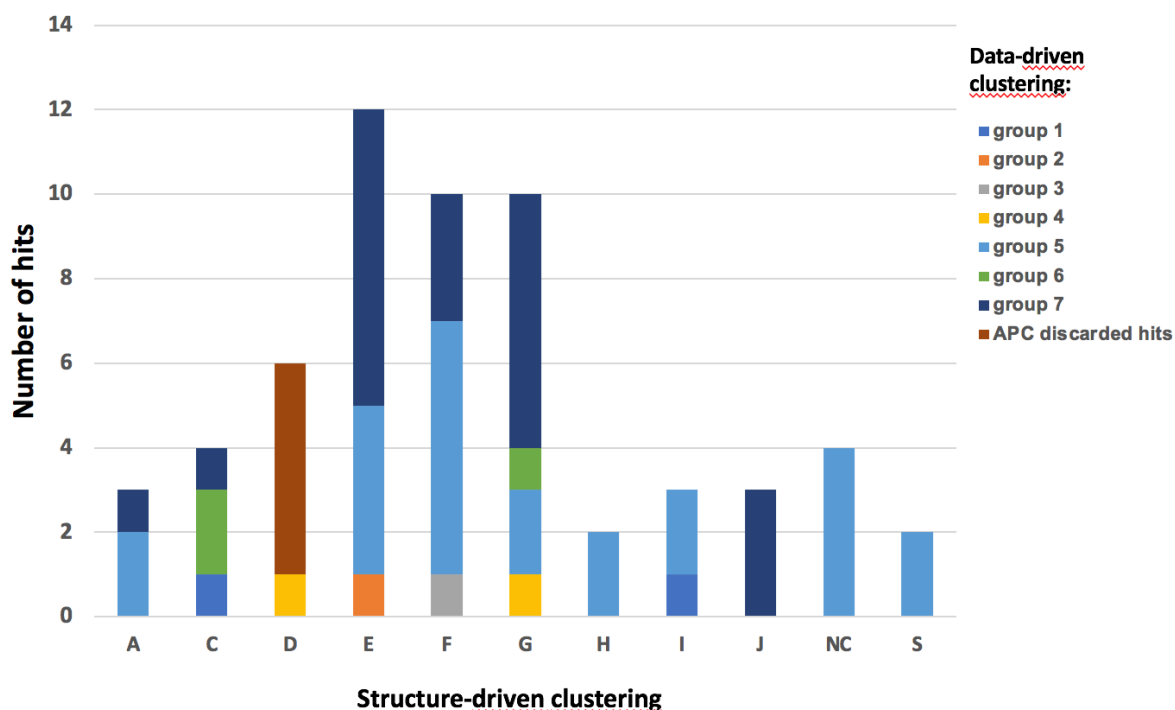
**Supplementary Figure 1:** Capsaicin-induced activation of TRPV1 current. (A) Whole-cell patch-clamp recording showing the representative trace of 10  $\mu$ M Capsaicin-activated current elicited by 650 ms voltage ramps from  $-60$  to  $+60$  mV in HEK293T cells transfected with empty vector, TRPV1 WT or mNeonGreen-TRPV1- nLuc. The holding potential was  $-60$  mV. Currents were normalized to cell capacitance for each cell and are expressed as pA/pF. (B) Summary data for capsaicin-induced mean current densities at  $+60$  mV recorded in cells transfected with the different constructions. Data are expressed as mean value  $\pm$  S.D. and  $3 < n < 5$ . Mann-Whitney test was performed to compare the TRPV1 WT and mNeonGreen-TRPV1-nLuc currents.



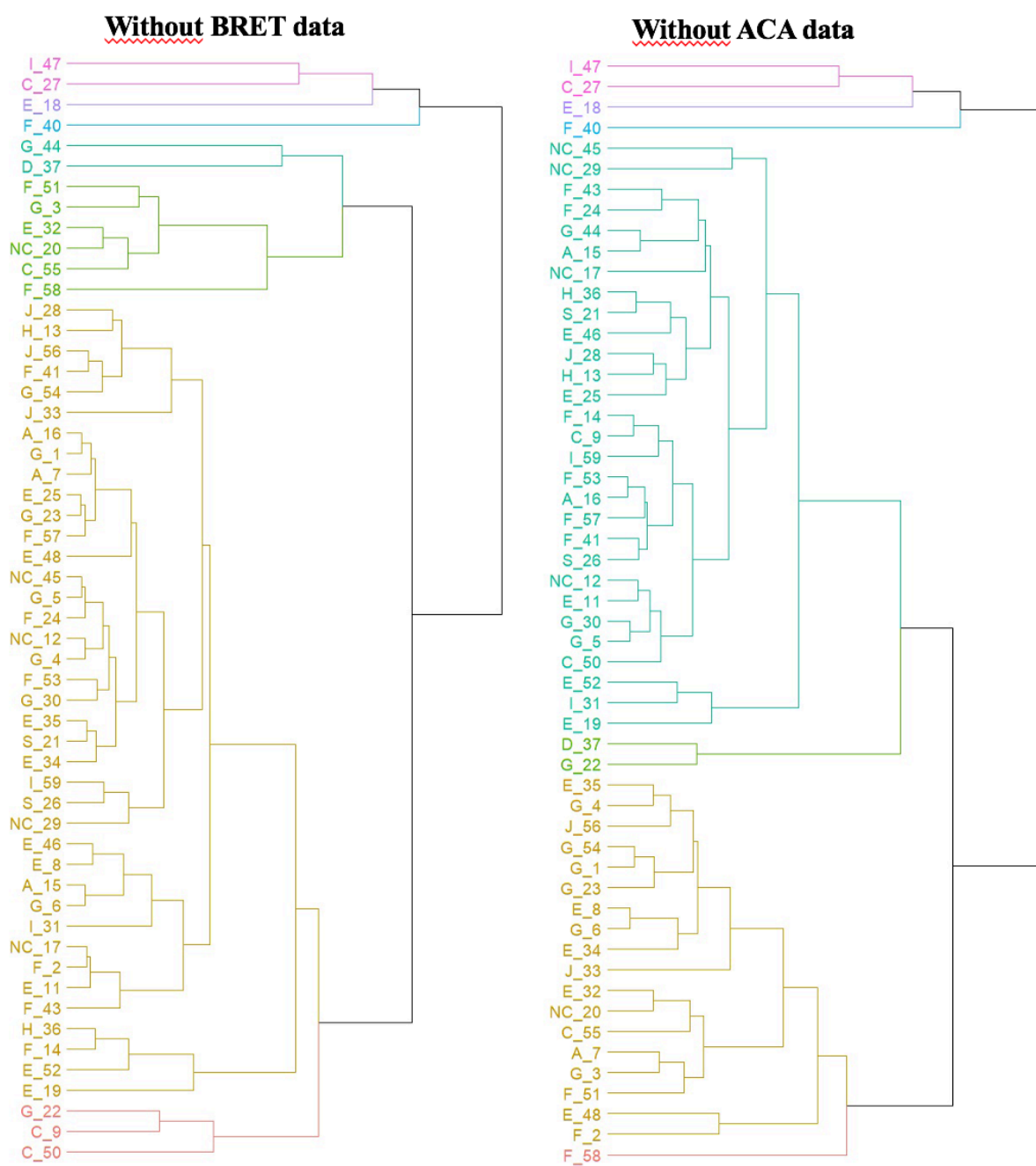
**Supplementary Figure 2:** The distance from each point to the  $y=x$  equation line was computed as shown on the inset for each method (intramolecular, intermolecular, and calcium assays) and both for agonist and antagonist conditions (complete data are shown in figure 4 G-H-I and figure 5 G-H-I). The smaller is the distance (greens line), the higher is the reproducibility between  $n1$  and  $n2$  assays. Statistical significance between the different conditions were analysed using a Kruskal-Wallis and Conover post-hoc tests, \*:  $p$ -value  $< 5\%$ , n.s.: not significant).



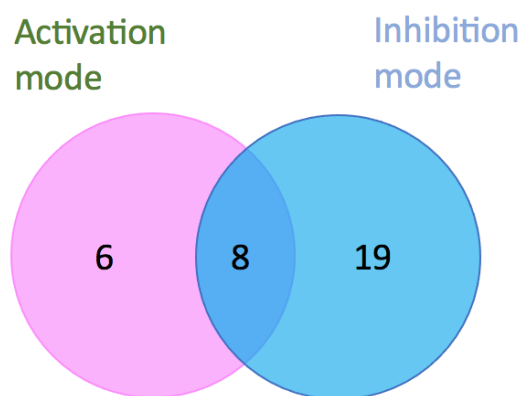
**Supplementary Figure 3:** Four measures frequently used to evaluate dispersion were computed: the median absolute deviation (mad), the difference between the largest and smallest values (range), the quartile coefficient of dispersion (qcod), and the interquartile range (iqr). The higher these metrics, the larger the data dispersion. Data were pooled (n1 and n2) in the 2 different assays conditions: (A) agonist and (B) antagonist. The four metrics were computed, normalized, and plotted on radar charts.



**Supplementary Figure 4:** Number of hits detected within each data-driven group as a function of structure-driven clusters.



**Supplementary Figure 5:** Data-driven hierarchical clustering of the effect of the hit compounds performed without the BRET data (left panel) or ACA data (right panel).



**Supplementary Figure 6:** Venn diagram of the hits detected with the automated Calcium-flux assay in the activation and the inhibition mode.

### 3.3 Développement des tests BRET mesurant la quantité intracellulaire d'ions dans le nanoenvironnement du pore des canaux.

Bien que les sondes BRET intra- et intermoléculaire constituent une alternative aux techniques conventionnelles d'étude des canaux ioniques, ces dernières ne donnent qu'une information partielle. En effet, un remodelage structural ne reflète pas pour autant une modulation de l'activité de transit des flux ioniques du canal étudié. Sur la base de ce constat, notre démarche a consisté à développer des sondes BRET permettant de mesurer les concentrations intracellulaires en ions situées dans le nano-environnement du pore sous un canal donné.

Ces sondes ont été construites sur la base du canal TRPV1 dont une extrémité est fusionnée à un capteur BRET afin pour le calcium (Yang et al., 2016), le potassium (Bischof et al., 2017) ou sensible à la force ionique des ions monovalents (Liu et al., 2017) (ci-après nommée SOFI (pour Sonde à Force Ionique)). Dans ces constructions, le capteur BRET fusionné à TRPV1 est composé d'une séquence protéique sensible à la concentration ionique, qui est prise en sandwich entre un donneur d'énergie bioluminescent (ici la nanoluciférase) et un accepteur d'énergie fluorescent compatible (ici la protéine mNeonGreen). Les modifications de conformation du capteur, ici induites par la variation de la quantité d'ions mesurée, entraînent un rapprochement ou un éloignement des groupes donneurs et accepteurs, et donc une variation concomitante de la mesure du signal de BRET. La fusion des différents types de capteurs à l'une des extrémités du canal TRPV1 renseigne donc sur les variations des quantités des différents ions sous le canal TRPV1 lors de son ouverture. Grâce à ces sondes nous avons pu mettre en évidence un biais dans la capacité de certains ligands à antagoniser les différents flux cationiques au travers de TRPV1. Nous avons également pu exemplifier l'utilisation de ces



sondes aux canaux P2X. Nous mettons en évidence une variation temporelle de la sélectivité cationique des canaux P2X lors de leur activation.

### 3.4 Article 2: Ligand bias induces variable ion selectivity in TRPV1 and P2X5/7

## **Ligand bias induces variable ion selectivity in TRPV1 and P2X5/7**

Yann Chappe<sup>1</sup>, Sandra Pierredon<sup>2</sup>, Alexandre Joushomme<sup>1</sup>, Pablo Molle<sup>1</sup>, André Garenne<sup>1</sup>, Anne Canovi<sup>1</sup>, Solène Barbeau<sup>3,4</sup>, Florence Poulletier De Gannes<sup>1</sup>, Annabelle Hurtier<sup>1</sup>, Isabelle Lagroye<sup>1</sup>, Thomas Ducret<sup>3,4</sup>, Jean-François Quignard<sup>3,4</sup>, Vincent Compan<sup>2</sup>, & Yann Percherancier<sup>1,§</sup>

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

<sup>2</sup> IGF, CNRS, INSERM, Univ. Montpellier, F-34094 Montpellier, France

<sup>3</sup> Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France

<sup>4</sup> INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France

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

## **Running Title: Ligand bias in TRPV1 and P2X ion channels**

Correspondence to Yann Percherancier  
Laboratoire IMS / UMR5218  
Université de Bordeaux I – Bat. A31  
351 av de la liberation  
F-33400 Talence  
France  
Tel: 0540002724  
Mail: [yann.percherancier@ims-bordeaux.fr](mailto:yann.percherancier@ims-bordeaux.fr)

### **Abbreviations**

APC: Automated patch-clamp  
BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer  
CAPS: Capsaicin  
CaM: Calmodulin  
CPZ: Capsazepine  
GPCR: G-protein-coupled receptors  
    mNeonG : mNeon Green protein  
    nLuc : nano Luciferase  
    RTX : Resiniferatoxin  
    TRPV1 : Transient Receptor Potential channel 1

## Introduction

Ion channels are the second most important class of membrane proteins for drug discovery after the G protein-coupled receptor class (GPCRs) (Global data, 2020; Santos et al, 2017). However, in the quest for new biologically active chemical structures, it is striking that the search for new drugs on ion channels is only focusing on the development of high-throughput techniques necessary to measure the activity of these proteins, while the field of GPCRs drug discovery is fully benefiting from the latest conceptual developments in molecular pharmacology.

In particular, the concept of "functional selectivity" (also known as "biased signaling") has refined our understanding of membrane receptor pharmacology. According to this concept, intrinsic efficacy of a drug is not considered a unique property, independent of either the read-out chosen or the biological system in which the drug is acting. Instead, a drug can display various intrinsic efficiencies by triggering differential couplings between the targeted receptor and the multiple signaling pathways activated downstream of the receptor. Thus, a drug can be simultaneously an agonist, an antagonist, and an inverse agonist acting at the same receptor but on different signaling pathways. While biased signaling fits perfectly GPCRs pharmacology, for which various G-protein dependent and G-protein independent signaling pathways are already known, such pharmacological concept may also fit ion channel pharmacology depending on ligand-dependent changes in ion selectivity (Herrington & Arey, 2014).

Ion channels respond to various physical and chemical stimuli by regulating the flow of ions across the cell membrane. The resultant ion flux causes a change in cell membrane potential or alters intracellular ion concentrations, which ultimately controls cell responses. Ion flux regulation is, therefore, the main event by which ion channels trigger cell signalization. Anion/cation selectivity is a critical property of ion channels and underpins 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 has been challenged as dynamic changes in ion selectivity have been measured during C-type inactivation of Kv channels, with an increase in the channel permeability to sodium (Kiss *et al*, 1999; Starkus *et al*, 1997). More recent studies have demonstrated that under acidic conditions or in low extracellular K<sup>+</sup> concentrations, the two-pore domain K<sup>+</sup> channel (K2P) TWIK1 exhibits dynamic changes in its selectivity, becoming permeable to Na<sup>+</sup>, and shifting from an inhibitor to an excitatory role (Chatelain *et al*, 2012; Ma *et al*, 2011, 2012). This phenomenon is responsible for the paradoxical depolarization of human cardiomyocytes in pathological hypokalemia, which may contribute to cardiac arrhythmias. Dynamic ion selectivity may also occur in other K2P channels, forming a new regulatory mechanism of cellular excitability (Chen *et al*, 2014).

Additionally, various studies have reported that ion selectivity of P2X receptor channels and TRP ion channels, such as TRPV1, may change dynamically in response to sustained agonist activation ((Chung *et al*, 2008; Munns *et al*, 2015), reviewed in (Peverini *et al*, 2018)). In the case of ligand-activated P2X and TRPV1 channels, it was even postulated that, if the pore initially opens rapidly to a conducting state that is relatively selective for small cations such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup>, the pore then gradually dilates over time to become more permeable to larger cations, such as fluorescent dyes or synthetic organic molecules (Peverini et al, 2018; Ferreira & Faria, 2016; López-Romero et al, 2019). Such a phenomenon is known as "pore dilation" and may elicit essential physiological functions and be the basis for therapeutic applications. The study by Li et al (Li et al, 2015) seriously challenged the "pore dilation" theory based on the time-dependent ion selectivity change on P2X channels, but did not question the permeability of the gated P2X channels for large cations. These authors elegantly demonstrated that the time-dependent shift in the reversal potential ( $E_{rev}$ ) measured in bi-ionic

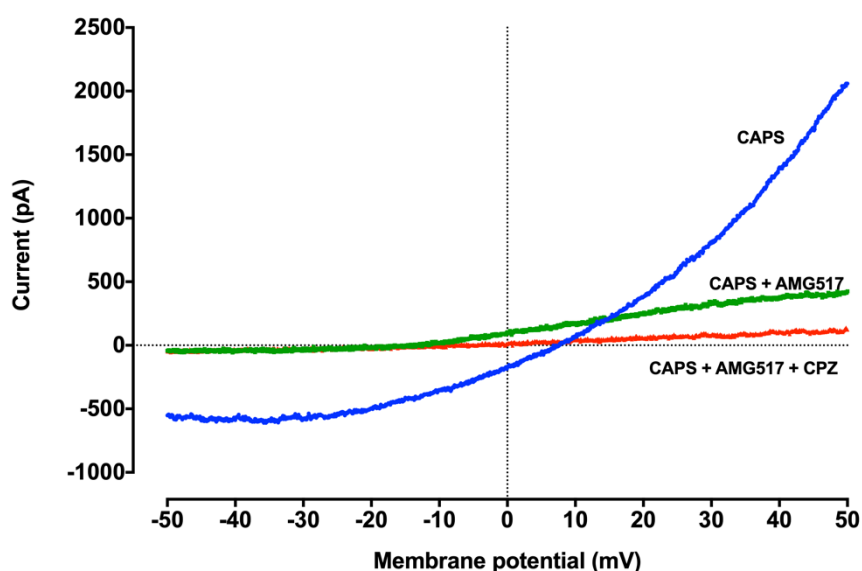
solutions is an artifact, warning about the results obtained when measuring permeability changes during whole-cell patch-clamp recordings. Concomitantly, and for similar reasons, the study by Samways et al. (Samways et al, 2016) also presented convincing results casting doubts on the time-dependent changes in the  $P_{Ca}/P_{Na}$  ratio during sustained activation of TRPV1 with Capsaicin under voltage-clamp conditions (Chung *et al*, 2008; Munns *et al*, 2015).

Using automated whole-cell voltage-clamp assay with an extracellular solution mimicking physiological conditions, we recently showed that some TRPV1 hit-compounds display differential agonist or antagonist efficacies and potencies to trigger inward (at negative voltage) and outward current (at positive voltage) on HEK293T cells expressing TRPV1. There is also a hint of a related phenomenon in various studies using the whole-cell patch-clamp technique. For example, it was shown that repeated applications of Capsaicin, in the presence of extracellular  $Ca^{2+}$ , resulted in a much stronger decrease in the inward current than the outward current in HEK293 cells expressing TRPV1 (Lau *et al*, 2012; Valente *et al*, 2008). Moreover, Methocramine analogs were shown to inhibit more potently, and with more efficacy, the inward current than the outward current induced by Capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons (Mellor *et al*, 2004). Finally, the TRPV1 positive allosteric modulator (PAM) MRS1477 increased peak currents activated by CAPS much more at negative potential than at positive potential (Kaszas *et al*, 2012). Altogether, these observations suggested that some compounds may differentially trigger or inhibit inward and outward current, which could be of utmost importance for drug screening campaigns (Chappe *et al*, 2021). While such results may be explained by the influence of the electric field on the ligand fixation site, a change in ionic selectivity may also be invoked if accompanied by a shift in the  $E_{rev}$  (Talavera & Nilius, 2011).

In the quest for compounds inducing a variation of ligand-induced ion selectivity in TRPV1, we found that AMG517, a well-known inhibitor of all TRPV1 activation modes (Garami *et al*, 2010), not only selectively inhibited the CAPS-induced inward current, but induced also 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 intracellular quantity of  $Ca^{2+}$  (Talavera & Nilius),  $K^{+}$  (Bischof *et al*, 2017), and ionic strength (Liu *et al*, 2017b) in the vicinity of the TRPV1 pore in real-time and 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 allowed for dynamic measurements of  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  concentration or ionic strength in the nanoenvironment of the TRPV1 channel in real-time and in live cell during drug challenge. Our results indicate that some TRPV1 antagonists display a differential potency to inhibit CAPS-induced  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  fluxes. Even more strikingly, we found that AMG517 is a partial agonist of the  $K^{+}$  efflux through TRPV1, while behaving as a pure antagonist of the  $Ca^{2+}$  flux. In a further effort to exemplify ligand bias in other families of cationic channels, using the same BRET-based strategy, we also showed concentration-dependent or time-dependent ligand bias in P2X7 and P2X5 cationic selectivity when activated by Bz-ATP.

## Results

We performed whole-cell patch-clamp experiments in HEK293T cells stably expressing TRPV1. As shown in Fig. 1, in the presence of 100 nM CAPS, the TRPV1 current-voltage relationship (I/V curve) was outwardly rectifying with a  $E_{rev}$  of about +7.6 mV. As expected, we found that the subsequent application of a saturating concentration of AMG517, a well-known TRPV1 antagonist (Gavva et al, 2007, 2008), decreased the magnitude of the current flow at both positive and negative voltage. Interestingly, the inhibition of the inward current was almost total while a remaining outward current could still be measured. In addition, AMG517 treatment induced a shift of the  $E_{rev}$  to negative values close to -9 mV. The further injection of the prototypic TRPV1 competitive antagonist CPZ (Bevan *et al*, 1992) partly reverted the AMG517-induced leftward shift of the  $E_{rev}$ , that went back to less negative value (-1.5 mV), and almost totally inhibited the outward current. The inward current remained close to background following CPZ injection. These data suggested that AMG517, but not CPZ, could preferentially inhibit the  $Ca^{2+}/Na^{+}$  inward ion flux rather than the outward  $K^{+}$  fluxes flowing through the gated TRPV1. This result implied antagonist-dependent ionic selectivity, and needed to be confirmed with an alternative technique. We, therefore, sought to develop TRPV1-based BRET probes allowing for the nanoscale measurement of cations concentrations variations in the vicinity of the TRPV1 pore during gating.



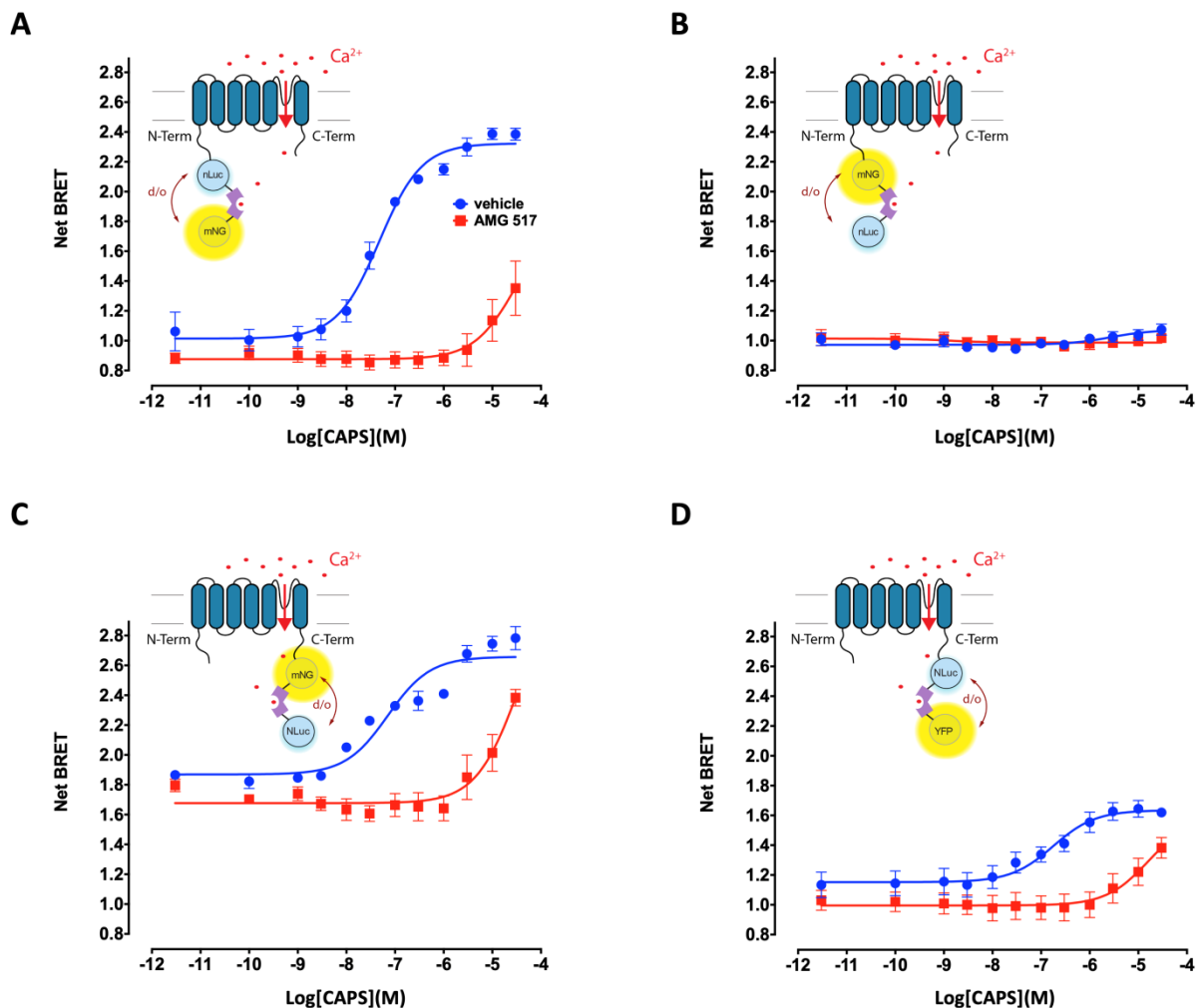
**Figure 1:** Effect of AMG517 and CPZ on CAPS-induced current in HEK cells stably expressing hTRPV1.

I-V curves were obtained in cells successively treated with 100 nM CAPS (blue curve), 1  $\mu$ M AMG517 (green curve), and 10  $\mu$ M CPZ (red curve). The results are representative of three independent patched cells.

Validation of the fusion between TRPV1 and Calflux BRET biosensors for measuring calcium influx in the pore nanoenvironment during agonist-promoted gating.

Since TRPV1 is known to be more selective for divalent relative to monovalent ion species, we first aimed at measuring intracellular  $Ca^{2+}$  rise in the nanoenvironment of the TRPV1 pore during gating. To achieve this objective, the human TRPV1 ion channel was fused to a slightly modified version of a recently described BRET sensor with high affinity for calcium (Calflux-VTN, (Yang *et al*, 2016)). We first sandwiched the troponin C domain (TnC) of the Calflux-VTN BRET sensor in-between the mNeonGreen fluorescent protein and the nanoLuc 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 the C-terminal extremity of the human TRPV1 ion channel. This yielded four different fusion proteins (Fig.

2), the functionality of which was assessed in the presence of increasing concentrations of Capsaicine (CAPS), the prototypic TRPV1 agonist, following their transient expression in HEK293T cells. As shown in Fig. 2, 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 (Fig. 2B). The greater CAPS-induced BRET increase was measured using the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 fusion protein ( $\Delta\text{BRET}_{\text{max}}=1.3\pm 0.1$ , Fig. 2A). A very significant while less marked BRET change was also measured with both TRPV1-based BRET probes C-terminally fused to the Calflux sensor (Fig. 2 C and D). This indicated that both respective positions of the energy donor and energy acceptor in the calflux BRET sensor and the extremity at which this sensor is fused to TRPV1, impacted the magnitude of the measured BRET change during TRPV1 gating. The pharmacological selectivity of the ligand-promoted BRET changes measured was further demonstrated by the right-shifting of the half-maximal response of each TRPV1-based BRET probe in the presence of AMG517 (Fig. 2).



**Figure 2:** Concentration-response curves of CAPS-induced BRET changes measured in HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (A, n=3), nLuc-Calflux-mNeonG-TRPV1 (B, n=4), TRPV1-mNeonG-Calflux-nLuc (C, n=3), and TRPV1-nLuc-Calflux-mNeonG (D, n=4). AMG517 (10 $\mu$ M) or vehicle was pre-incubated for 5 min before CAPS addition in the culture medium. The schematic representation of the TRPV1-based BRET probes are shown as insets.

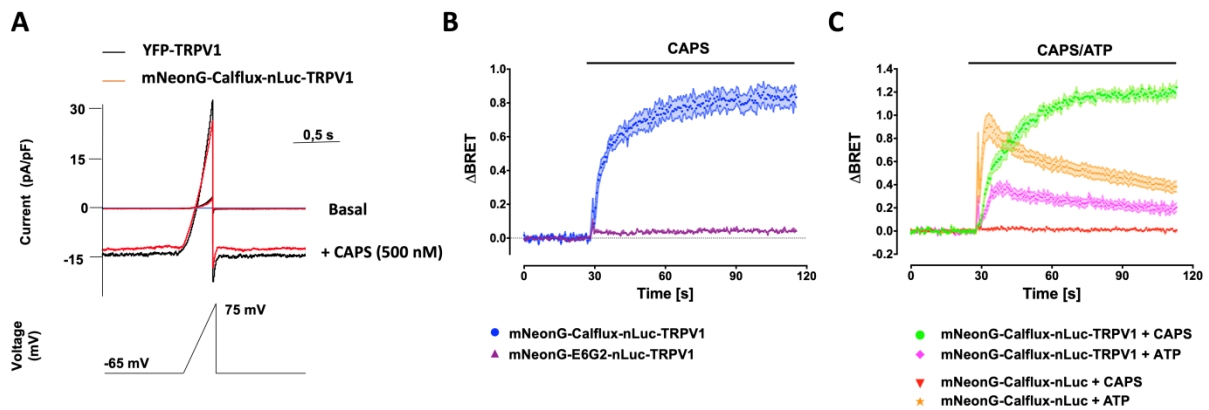
Since the bigger CAPS-induced BRET variation was obtained using the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe, this configuration was kept for the rest of the study. Similarly to what we have already shown with our former intramolecular and intermolecular TRPV1-based BRET probes sensing TRPV1 conformational changes and Calmodulin (CaM) coupling during gating (Ruigrok et al, 2017; Chappe et al, 2021), we showed that CAPS increased the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 basal BRET with first-order kinetics (Fig. 3B&C) and with potency ( $pEC_{50}=7.32\pm 0.08$ , Fig. 2A) matching the values reported in the literature (Caterina et al, 1997; Cui et al, 2012). However, the magnitude of the maximal BRET variation measured with the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe was at least fivefold higher than the one measured with our former intra- and intermolecular TRPV1-based BRET probes (Supp. Fig. 1), thus highlighting the potential of these new BRET probes. However, accepting the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe as a novel tool for TRPV1 ion channel studies was conditioned by several important facts.

Firstly, we verified that the CAPS-induced whole-cell current was of similar magnitude in HEK293T cell expressing either YFP-TRPV1 or mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (Fig. 3A). Knowing that the N-terminal YFP fusion does not alter the capacity of TRPV1 to let  $Ca^{2+}$  enter the cell (De-la-Rosa *et al*, 2013; Ruigrok *et al*, 2017), these results indicated that the N-terminal fusion of the mNeonG-Calflux-nLuc BRET sensor to TRPV1 did not alter its electrophysiological properties.

Secondly, it was necessary to assess 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 (De-la-Rosa *et al*, 2013; Ruigrok *et al*, 2017). To verify such possibility, we replaced the calcium-sensitive Calflux sequence with the E6G2 sequence, which senses macromolecular crowding, into our TRPV1-based BRET probe, yielding the mNeonG-E6G2-nLuc-TRPV1 BRET probe (Liu *et al*, 2017a). As shown in Fig. 3B, 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-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe directly relies on the  $Ca^{2+}$  concentration rise in the intracellular vicinity of the TRPV1 pore, and not on the conformational changes occurring in the quaternary structure of the TRPV1 ion channel during gating.

Finally, it was mandatory to verify that the BRET variation measured with the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 did not result from the biased activation of an off-target calcium channel. To control for this experimental bias, we took advantage of the endogenous expression of P2Y purinergic receptors in HEK293 cells (Tominaga et al, 2001). HEK293T cells transiently transfected with the unfused mNeonG-Calflux-nLuc or the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probes were challenged with a saturating concentration of either CAPS or ATP. As expected, CAPS did not trigger any BRET increase in the HEK293T cells transfected with the mNeonG-Calflux-nLuc BRET probe alone while it induced a rapid and sustained BRET increase in HEK293T cells transiently transfected with the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe (Fig. 3C). On the other hand, ATP caused an immediate and robust increase of the soluble mNeonG-Calflux-nLuc BRET ratio that rapidly decreased with time (Fig. 3C), as expected for the P2Y response to ATP (Fischer *et al*, 2005). Finally, ATP only induced a low-magnitude and transient increase of the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe, thus highlighting that any other sources of intracellular calcium increase only marginally contribute to the BRET signal.





**Figure 3:** A) Whole cell current responses of HEK293T cells expressing YFP-TRPV1 (black line) and mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 channels (red line) to a ramp voltage protocol from -65 mV to +75 mV (Holding potential: -65 mV), in presence or absence of CAPS (500nM). B) Kinetics measurement of the CAPS (500nM)-induced rise of the BRET signal in HEK293T cells transiently expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (n=6) or the mNeonG-E6G2-nLuc-TRPV1 BRET probe (n=6). C) Kinetics measurement of the CAPS (10 $\mu$ M) or ATP (10 $\mu$ M)-induced rise of the BRET signal in HEK293T cells transiently expressing either the unfused mNeonG-Calflux-nLuc BRET probe in absence of TRPV1, or the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe (n=5-10 depending on the condition).

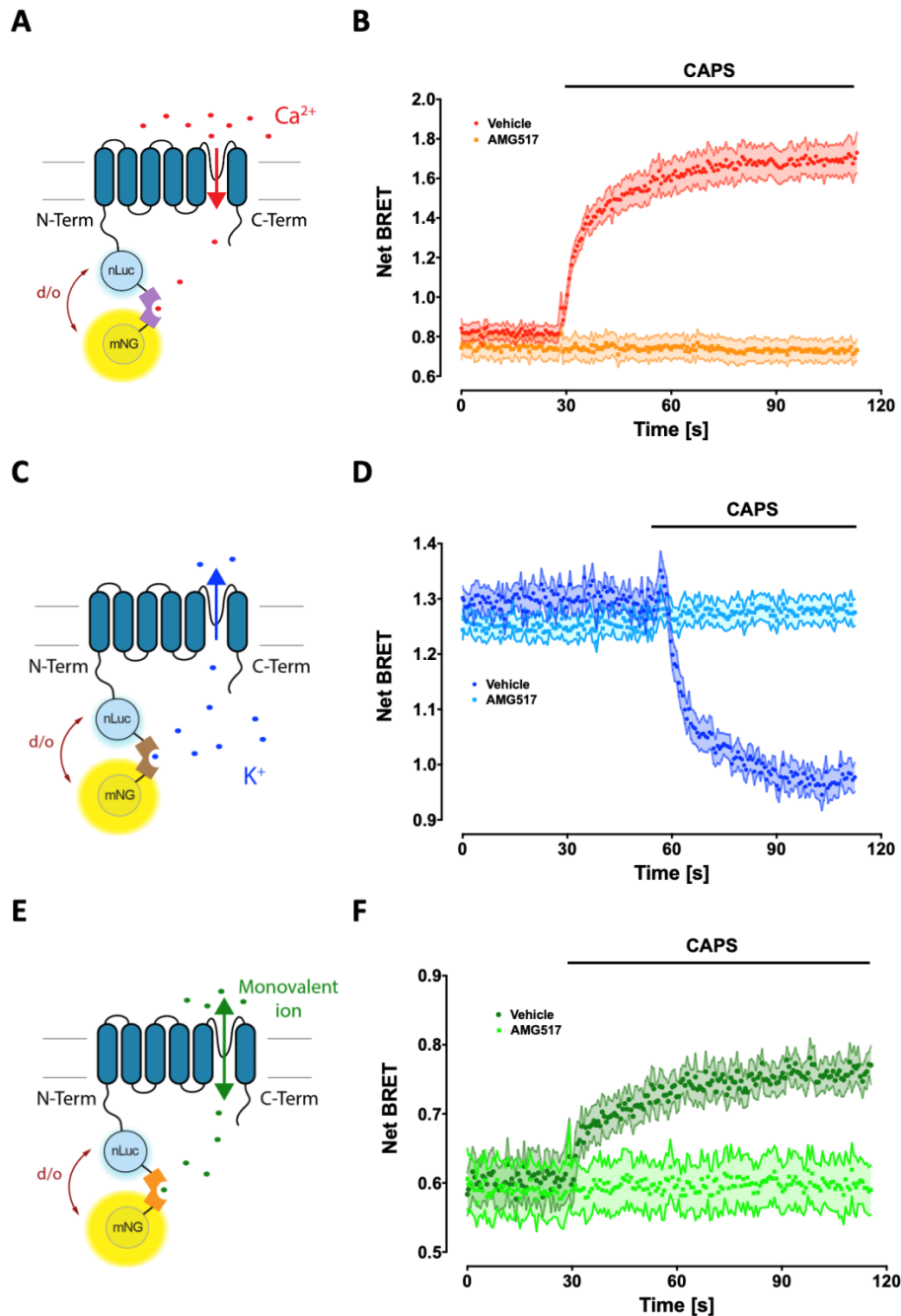
### Measurement of intracellular variation of potassium and ionic force in the TRPV1 pore nanoenvironment during agonist-promoted gating.

Having shown that the mNeonG-Calflux-nLuc BRET sensor N-terminally fused to TRPV1 allows for the direct assessment of TRPV1 ion channel pore opening in real-time and in live cells, and knowing that TRPV1 is described as a non-selective cation channel, we next aimed at using the same molecular strategy to measure the dynamic variation of TRPV1 permeability to other cations during gating.

To measure TRPV1 permeability to K<sup>+</sup> during gating, we used the recently described K<sup>+</sup>-sensitive genetically encoded Förster-resonance energy-transfer (FRET)-based probe, which enables quantitative real-time measurement of K<sup>+</sup> dynamic (Bischof et al, 2017). However, designing a Na<sup>+</sup>-sensitive BRET probe was problematic since, to our knowledge, no sodium-binding protein is already described with an affinity in the nanomolar range as for the Calflux and the Kbp sensors (Yang *et al*, 2016; Bischof *et al*, 2017). We nonetheless could built-on a recently described ionic-strength FRET biosensor that relies on a negatively charged  $\alpha$ -helix whose electrostatic attraction depends on the local ionic strength (Liu *et al*, 2017b). Therefore, following the same strategy used with the Calflux VTN BRET probe (Fig. 4A), we sandwiched both the K<sup>+</sup>-binding protein (Kbp) part of the genetically encoded K<sup>+</sup> indicator described by (Bischof et al, 2017) and the negatively charged  $\alpha$ -helix Ionic Strength Sensitive Sequence (hereafter called I3S) described by (Liu *et al*, 2017b), in between the fluorescent acceptor mNeonGreen at their N-terminal extremities and the bioluminescent donor nanoluc 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. 4C) and mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 BRET probe (Fig. 4E).

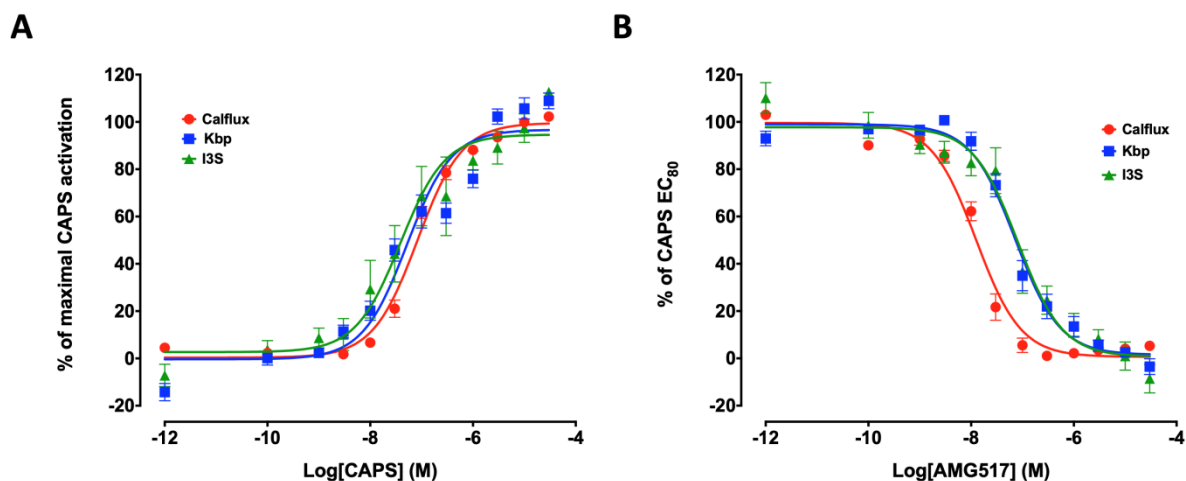
HEK293T cells expressing each one of these two BRET probes were then processed for BRET analysis. In both cases, the basal BRET, measured in resting condition, varied with first-order kinetics after exposure to CAPS, as already shown for the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 4B) and for our former TRPV1-based intramolecular and intermolecular BRET probes (Ruigrok et al, 2017). However, CAPS induced a decrease of the basal BRET

measured with the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 probe and an increase of the basal BRET measured with the mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 4 D&F). These effects were completely abolished in cells that were preincubated with AMG517, thereby pointing to the specificity of the assays (Fig. 4 D&F).



**Figure 4:** A, C and E) Schematic representation of the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (A), mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (C), and mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 (E) BRET probes. B, D and F) Kinetics measurement of the CAPS (500 nM)-induced change of the BRET signal in HEK293T cells transiently expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (B, n=10), the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probe (D, n=11), or the mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 BRET probe (F, n=6). AMG517 (10  $\mu$ M) or vehicle was pre-incubated for 5 min before CAPS addition in the culture medium.

Remarkably, a dose-response analysis revealed that, while CAPS potency to activate TRPV1 was almost identical for both BRET probes (Fig. 5A), the AMG517 potency to inhibit CAPS-induced TRPV1 activation was right-shifted by almost one log for both mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 and mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 probe in comparison with the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 5B, see also Table 1).

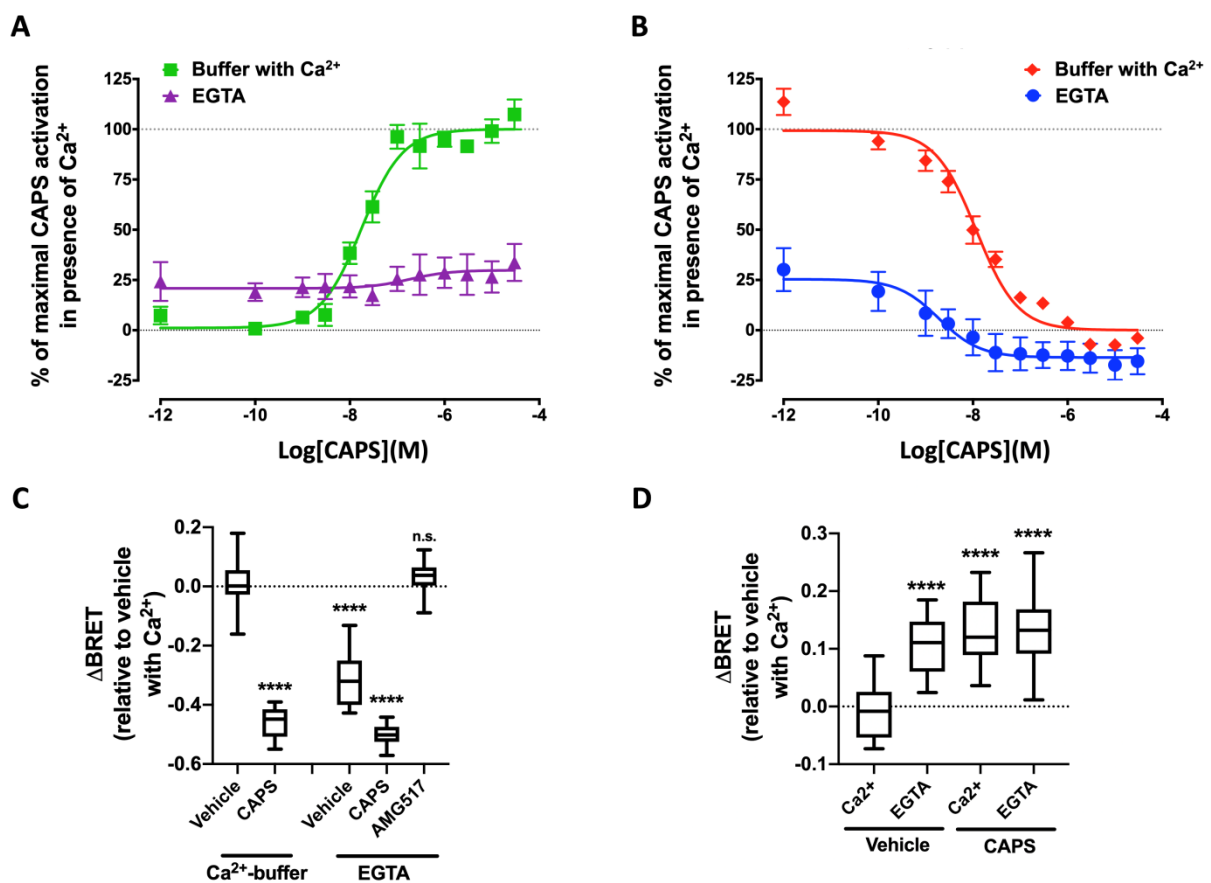


**Figure 5 :** (A) Concentration-response curves of CAPS-induced BRET changes measured in HEK293T cells transiently expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (n=13), mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (n=13), and mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 BRET probes (n=5). (B) Concentration-response curves of the ability of AMG517 to inhibit CAPS (500 nM) induced BRET changes in HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (n=13), mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (n=13), and mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 (n=5) BRET probes.

According to the study by (Bischof *et al*, 2017; Liu *et al*, 2017b), the efficiency of the resonant energy transfer between the donor and acceptor groups encompassing the Kbp sensor increases with the concentration of K<sup>+</sup> ion, while the resonant energy transfer efficiency between the donor and acceptor groups encompassing the I3S sensor decreases as the environmental ionic strength increases. Our results indicated therefore that both intracellular K<sup>+</sup> and ionic strength decrease while Ca<sup>2+</sup> increases in the nano-environment of the TRPV1 pore following CAPS-induced TRPV1 gating. Since the I3S probe is mainly insensitive to Ca<sup>2+</sup> (Liu *et al*, 2017b), our data suggested therefore that, under physiological conditions, i) the K<sup>+</sup> efflux overcomes the Na<sup>+</sup> influx in response to CAPS-induced TRPV1 gating, and ii) AMG517 may differentially inhibit both Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes through the opened TRPV1 pore. Because these two points challenge the classical view of TRPV1 gating and pharmacology, it was essential to check several potential biases.

Albeit no calcium-activated potassium channel currents have been observed in HEK293 cells (Benton *et al*, 2003), we first wanted to fully exclude the possibility that CAPS-induced Ca<sup>2+</sup> influx into the cell cytoplasm through the gated TRPV1 could have triggered the opening of endogenous potassium channels. In that aim, we challenged HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 6A) or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 6B) with increasing concentration of CAPS in the presence or absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. Interestingly, the basal BRET ratio of the calcium-sensing TRPV1-based BRET probe was slightly increased in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. The reason for such observation is not clear, but it may indicate that, in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, more Ca<sup>2+</sup> from internal stores are released in the cytosol. However, as expected, the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> almost completely abolished CAPS-induced calcium influx. In parallel, the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> induced a ~75% decrease in the basal BRET ratio measured in HEK293T

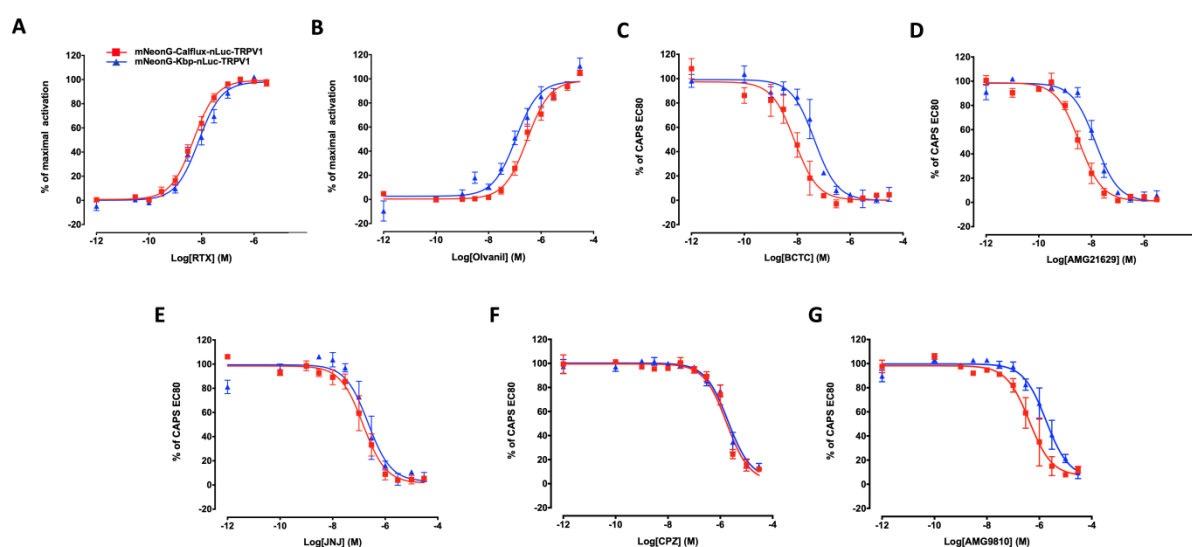
cells transfected with the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 probe (Fig. 6 B&C). Interestingly, in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , CAPS still dose-dependently induced a decrease in  $\text{K}^+$  in the nano-environment of the TRPV1 pore (Fig. 6 B & C). This effect was accompanied by a moderate, but still significant, leftward shift of the CAPS potency ( $\text{pEC}_{50}=7.93\pm 0.08$  in presence of  $\text{Ca}^{2+}$  vs  $8.72\pm 0.31$  in absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (i.e., in presence of EGTA),  $n=5$ ,  $p<0.0001$ ) and a slightly lower plateau reached at high CAPS concentration when  $\text{Ca}^{2+}$  is chelated (Fig. 6B). Importantly, AMG517 completely abolished the  $\text{K}^+$  efflux measured in presence of EGTA (Fig. 6C). Absence of extracellular calcium also decreased intracellular monomeric ionic strength in the vicinity of the TRPV1 pore, as measured with the mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 BRET probe that was expressed in HEK293T cells left in calcium-containing buffer or in calcium-free buffer containing EGTA (Fig. 6D). Altogether, these data strongly suggest that the CAPS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx is not responsible for an off-target leakage of the intracellular  $\text{K}^+$  nanocompartmentalized in the vicinity of the TRPV1 pore, but rather that  $\text{K}^+$  ions are leaking directly through TRPV1 in the absence of extracellular calcium.



**Figure 6 :** A&B) Concentration-response curves of CAPS-induced BRET changes in HEK293T cells expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (A,  $n=5$ ) or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (B,  $n=5$ ) in presence or absence (EGTA, 2mM) of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . C&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. Results represent the variation of the basal BRET in the control condition relative to 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 Mann-Whitney test. n.s.: not significant; \*\*\*\* $p<0.0001$ .

Comparison of the capabilities of the reference compounds to selectively trigger or inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{K}^{+}$  fluxes through TRPV1.

We next aimed at assessing whether other ligands could differentially modulate the TRPV1 permeability to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$ . By performing concentration-response curves in HEK293T cells expressing either mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 or mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probes, we observed that, in addition to AMG517, the compounds BCTC, AMG21629, and AMG9810 also displayed a better potency to inhibit the  $\text{Ca}^{2+}$  influx than the  $\text{K}^{+}$  efflux triggered by an  $\text{EC}_{80}$  of CAPS (Fig. 7 C & D, Table 1). None of the two other antagonists (CPZ, JNJ17203212) displayed such a variation in selectivity to differentially inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  fluxes (Fig. 7). Interestingly, we also found that, while CAPS and RTX displayed similar potencies to trigger Calcium influx and potassium efflux, Olvanil was slightly more potent to trigger the potassium efflux than the calcium influx (Fig. 7C and Table 1).



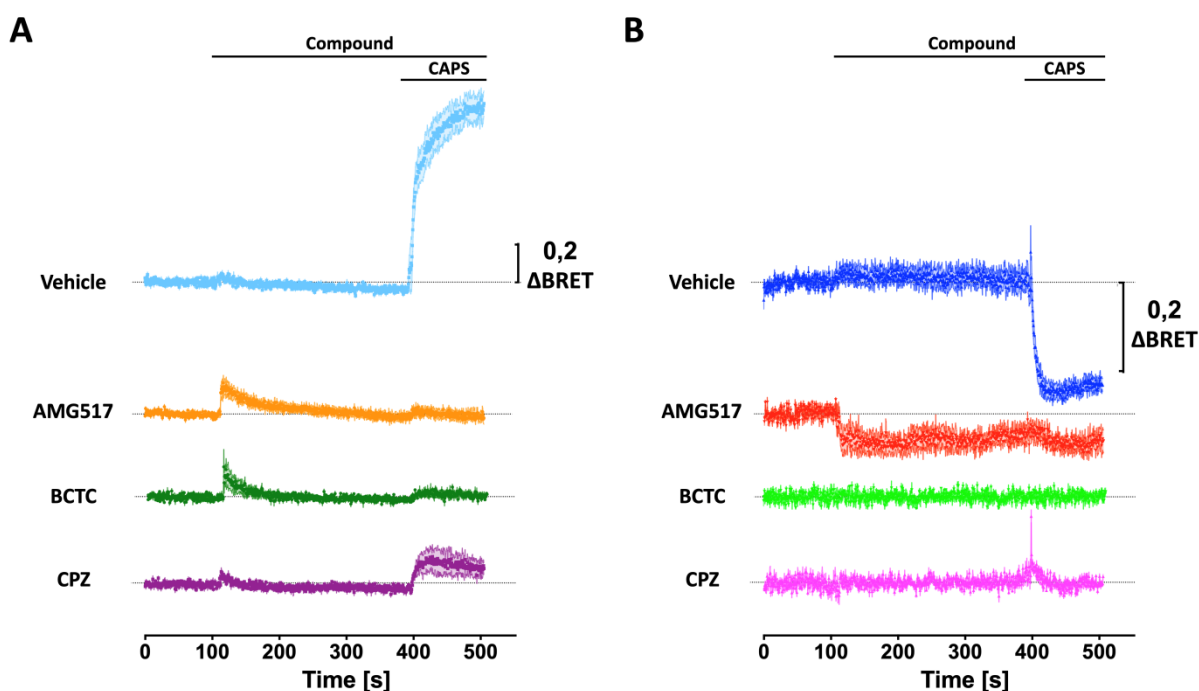
**Figure 7:** (A&B) Variation of the BRET signal measured in HEK293T cells expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (red curves) or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (blue curves) in response to increasing quantities of RTX (A), or Olvanil (B). (C-G) Concentration-response curves of the ability of BCTC (C), AMG21629 (D), JNJ17203212 (E), CPZ (F), and AMG9810 (G) to inhibit CAPS (500 nM)-induced BRET changes in HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (red curves) or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (blue curve) BRET probes. See table 1 for details.

**Table 1** : pEC50/pIC50 values derived from curve fitting of TRPV1 agonists/antagonists dose-response measured using either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1. Values represent the mean  $\pm$  S.E. of (n) independent experiments performed in duplicate. n.s.: not significant; \*p<0.05; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*p<0.0001.

		mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1	mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1	p-value
Agonists	Capsaicin	-7.08 $\pm$ 0.03 (13)	-7.13 $\pm$ 0.04 (9)	n.s.
	Olvanil	-6.53 $\pm$ 0.06 (8)	-6.96 $\pm$ 0.09 (8)	**
	RTX	-8.30 $\pm$ 0.05 (9)	-8.11 $\pm$ 0.06 (9)	n.s.
Antagonists	AMG517	-7.90 $\pm$ 0.04 (13)	-7.14 $\pm$ 0.06 (13)	****
	BCTC	-8.10 $\pm$ 0.12 (3)	-7.35 $\pm$ 0.10 (3)	*
	AMG21629	-8.46 $\pm$ 0.07 (7)	-7.85 $\pm$ 0.07 (7)	***
	CPZ	-5.76 $\pm$ 0.08 (7)	-5.71 $\pm$ 0.08 (7)	n.s.
	JNJ17203212	-6.84 $\pm$ 0.09 (6)	-6.65 $\pm$ 0.12 (6)	n.s.
	AMG9810	-6.39 $\pm$ 0.13 (6)	-5.74 $\pm$ 0.11 (6)	*

These observations indicated that some known TRPV1 antagonists might exert ion-specific inhibition of the CAPS-induced Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes flowing through TRPV1. Knowing that a partial agonist can partly antagonize the activity of a full agonist, these compounds could therefore behave as pure CAPS antagonists or as partial agonists of each flux, but with different potencies. To distinguish between these possibilities, kinetic experiments were performed, in the presence of BCTC and AMG517, in HEK293T cells expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probes. As shown in Fig. 8A (second injection), while CAPS induced a robust and sustained increase in the BRET ratio measured in cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 BRET probe, we measured that BCTC and AMG517 induced only a very transient and slight amplitude increase of the intracellular Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> trapped in either the outer pore entrance or the central pore vestibule during antagonist-driven conformational changes leading to a less Ca<sup>2+</sup>-permeable TRPV1 conformation.

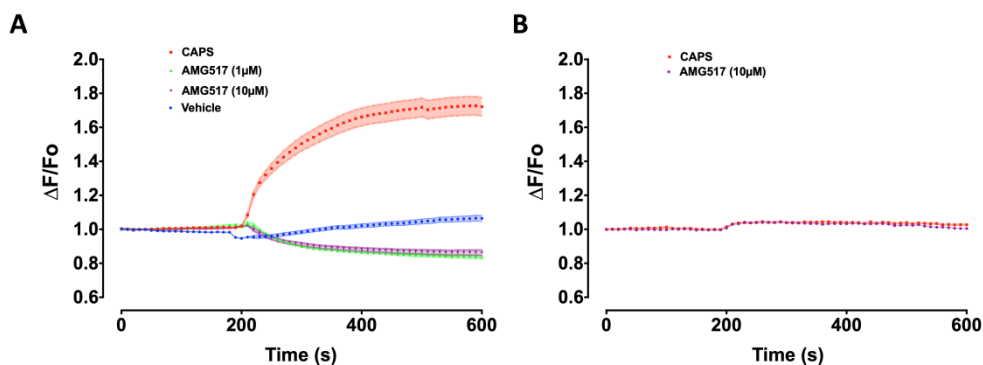
Strikingly, AMG517 triggered a sustained K<sup>+</sup> decrease, which was approximately 25% of the one triggered by CAPS (Fig. 8B). Such a phenomenon could not be measured using BCTC, which injection did not modify the BRET signal baseline measured with the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 BRET probe. Altogether, these results show that BCTC and AMG517 are authentic and potent antagonists of the Ca<sup>2+</sup> flux. At the same time, they behave as weak antagonist (BCTC) or weak partial agonist (AMG517) of the K<sup>+</sup> flux.



**Figure 8:** Kinetics measurement of the effect of AMG517 (10  $\mu\text{M}$ ,  $n=6$ ), BCTC (10  $\mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) and CPZ (10  $\mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) on the basal BRET measured in HEK293T cells transiently expressing either the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (A) or the mNeonG-Kbp-nLuc-TRPV1 (B). CAPS (500 nM) was injected when indicated.

Knowing that potassium is the dominant ion controlling the resting membrane potential (Ramahi & Ruff, 2014), potassium efflux through the biased opening of TRPV1 channel, even at low level, may induce hyperpolarization. Such an event would depend on the potassium ion's driving force and will only occur in relatively depolarized cells since the Nernst potential for the potassium ion is  $-90\text{mV}$ . Knowing that the membrane potential of HEK293T cells lies around  $-25\text{mV}$  (Kirkton & Bursac, 2011), we assessed whether AMG517 could differentially modulate the membrane potential of these cells when transiently expressing TRPV1. As expected, CAPS induced the depolarization of HEK293T cell membranes, as indicated by the net increase in the signal measured using the Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR) membrane potential dye (Fig. 9A). In sharp contrast, AMG517 induced a progressive signal decrease with a time constant similar to that measured in the presence of CAPS. These effects were not reproduced in untransfected HEK293T cells, indicating that AMG517 efficiently produces hyperpolarization through TRPV1 (Fig. 9B).



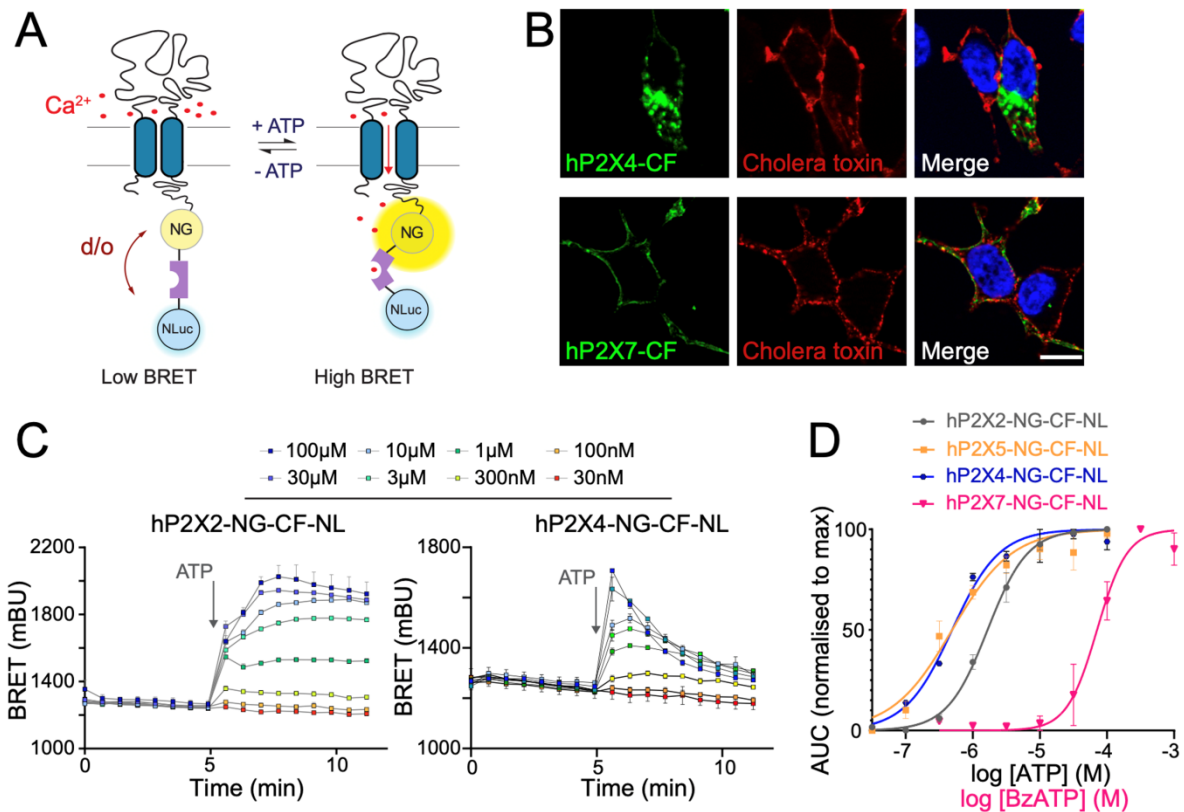


**Figure 9:** Kinetics measurement of the effect of CAPS (10  $\mu$ M, n=7), AMG517 (10  $\mu$ M, n=7), or vehicle (n=4) on the membrane potential of HEK293T cells transiently transfected with TRPV1 (A) or left untransfected (B).

Exemplification of Calflux and Kbp BRET biosensors for measuring intracellular calcium and potassium concentration in the vicinity of P2X ligand-gated ion channel pore.

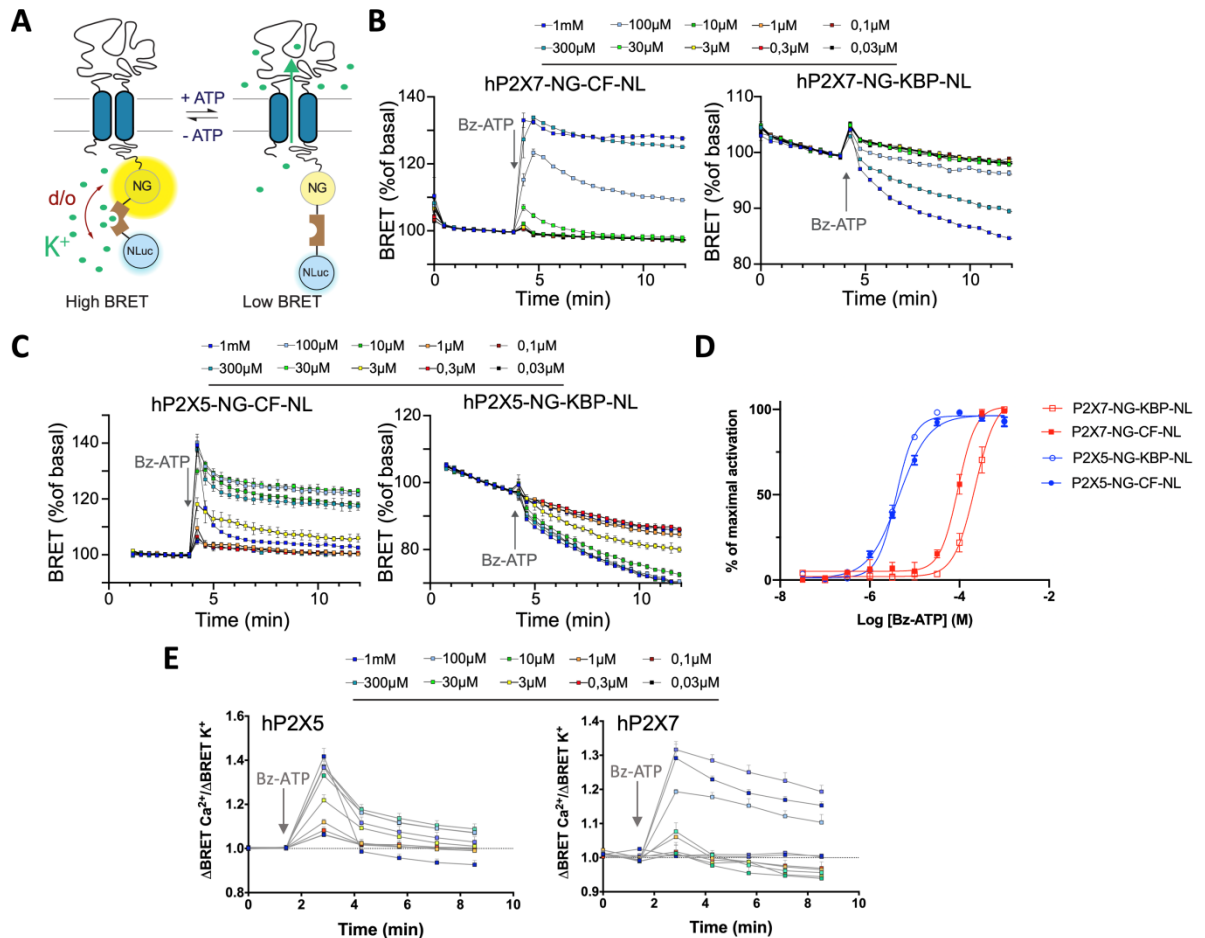
We next wondered whether our ionic BRET sensors could also monitor ion flux through ligand-gated ion channels such as P2X purinergic receptors. We therefore fused the mNeonG-Calflux-nLuc sensor to the C-terminal tail of the seven human P2X subunits (Fig. 10A). Correct expression of the P2X BRET probes transiently transfected in HEK293T cells was confirmed by western blotting (Supp. Fig. 2). Fusion of the P2X subunit with the Calflux sensor seems not to affect the subcellular localization of receptors since we confirmed that hP2X4 and hP2X7 were respectively located, as expected, in lysosomes-like structures and at the plasma membrane (Fig. 10B). Among the seven probes individually expressed, time-dependent and concentration-dependent ATP increase of BRET signals were observed for P2X2 (Fig. 10C, left panel) and P2X4 (Fig. 10C, right panel) (See also Fig. 10D). Similar observations were made for P2X7 (Fig. 11B, left panel) and P2X5 (Fig. 11C, left panel) when activated by increasing concentration of Bz-ATP, a more potent receptor activator. In the case of P2X4, slow desensitization of the receptor was observed following prolonged ATP application as already described (Fountain & North, 2006). No changes in BRET signals were observed for P2X1 and P2X3, presumably due to the rapid desensitization of these receptors (data not shown). Regarding P2X6, we did not detect any BRET changes following ATP stimulation as this subunit does not form functional homomeric receptors (data not shown). Apparent affinities ( $pEC_{50}$ ) for ATP or Bz-ATP (in the case of P2X7) were  $5.78 \pm 0.03$ ,  $6.31 \pm 0.04$ ,  $6.31 \pm 0.07$  and  $4.15 \pm 0.06$  for P2X2, P2X4, P2X5 and P2X7 respectively (Fig10D).





**Figure 10:** (A) Schematic representation of the P2X-mNeonGreen-CalFlux-nLuc BRET probe, where the calcium biosensor mNeonGreen-CalFlux-nLuc was fused to the C-terminal extremity of P2X subunits. After activation of P2X receptors by ATP, the distance (d) and/or the orientation (o) between mNeonGreen and nLuc are expected to be modified following calcium binding and conformational changes of CalFlux. (B) Analysis by immunocytochemistry of the hP2X4 and hP2X7 subunits (green staining) fused to the BRET calcium sensor mNeonGreen-CalFlux-nLuc after expression in HEK293T cells. Plasma membranes (red) and nucleus (blue) were stained using cholera toxin subunit B fused to CF594 dye and hoechst 33258 respectively. (C) Representative kinetic measurements of the effect of increasing dose of ATP on the BRET ratio measured from HEK293T cells expressing the hP2X2 mNeonGreen-CalFlux-nLuc (left panel) or hP2X4- mNeonGreen-CalFlux-nLuc (right panel) BRET probe. (D) Concentration-response curves of ATP or Bz-ATP (for hP2X7 receptors) on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with different human (h) P2X-mNeonGreen-CalFlux-nLuc BRET probes ( $n = 3$ , excepted for hP2X4 and hP2X7  $n=2$  ).

We next aimed at monitoring potassium permeability through the pore of P2X receptors. In that aim we fused the mNeonG-Kbp-nLuc sensor to the C-terminal tail of the human P2X subunits (Fig 11A). We focused our analysis on hP2X5 and hP2X7, two receptors that Bz-ATP can activate. Time-dependent and dose-dependent Bz-ATP decrease of BRET was observed for these two receptors (Fig. 11B&C, right panel), confirming that hP2X-mNeonG-Kbp-nLuc fusions allow tracking potassium permeability of these two receptors. Considering the BRET variation of the Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-sensitive probes during the first 3 min following Bz-ATP injection, it becomes apparent that the potency of Bz-ATP to induce Ca<sup>2+</sup> influx and K<sup>+</sup> efflux through P2X5 is similar ( $pEC_{50}$   $5.35 \pm 0.03$  vs  $5.41 \pm 0.02$  respectively,  $n=4$ ,  $p>0.5$ ), Fig. 11D). The Bz-ATP potency to trigger a Ca<sup>2+</sup> influx through P2X7 during the same period is however slightly better than its potency to induce a K<sup>+</sup> efflux through P2X7 ( $pEC_{50}$   $3.65 \pm 0.04$  vs  $4.03 \pm 0.03$  respectively,  $n=3$ ,  $p<0.5$ , Fig. 11D).



**Figure 11:** (A) Schematic representation of the P2X-mNeonGreen-Kbp-nLuc BRET probe, where the potassium biosensor mNeonGreen-Kbp-nLuc was fused to the C-terminal extremity of P2X subunits. After activation of P2X receptors by ATP, the distance (d) and/or the orientation (o) between mNeonGreen and nLuc are expected to be modified following potassium efflux and conformational changes of Kbp. (B and C) Representative kinetic measurements of the effect of increasing doses of Bz-ATP on the BRET ratio measured from HEK293T cells expressing the hP2X7 (B) or hP2X5 (C) subunits fused either to mNeonGreen-CalFlux-nLuc (left panel) or mNeonGreen-Kbp-nLuc (right panel) BRET probes. (D) Concentration-response curves of Bz-ATP on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with hP2X5 or hP2X7 and fused to either the calcium or the potassium BRET probes ( $n \geq 3$ ). (E) Relative variation of the intracellular quantity of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> in the vicinity of the P2X5 pore (left panel) or P2X7 pore (right panel).

In addition, the time-dependent relative permeability of P2X5 and P2X7 for Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> changed with time following Bz-ATP challenging (fig. 11E). For both P2X5 and P2X7, Bz-ATP triggered an immediate Ca<sup>2+</sup> rise that slightly decreased after peaking. In sharp contrast, the K<sup>+</sup> never peaked but slowly increased along time following Bz-ATP addition in the cell culture media (Fig. 11B and C). This phenomenon is exacerbated at the highest Bz-ATP concentration tested (1 mM) on P2X5. In that condition, while the permeability of P2X5 for calcium was maximale 1 min after Bz-ATP injection, it then dramatically dropped to a level close to the background. In the same time, the permeability for K<sup>+</sup> progressively increased and was maintained over time. Altogether these results confirm that our ionic BRET biosensors allow to monitor ligand gated ion channel activation and might represent valuable tools to track specific ion permeability during receptor gating.

## Discussion

Since its cloning in 1997 by the Julius laboratory, TRPV1 has always been described as a relatively non-selective cationic channel (Caterina et al, 1997) that triggers cell membrane depolarization when gated by noxious heat, Capsaicin, and other various stimuli. As for all channels, TRPV1 ionic selectivity was initially considered to be fixed with  $P_{Ca} > P_{Na} \sim P_K$  (Caterina et al, 1997). However, this dogma has been challenged by Michael Caterina himself when, several years later, his laboratory reported that TRPV1 showed time-dependent and ligand-dependent changes in its selectivity among monovalent and divalent cations over a period ranging from a few seconds to several minutes (Chung et al, 2008). These former data were obtained from electrophysiological recordings using bi-ionic solutions with NMDG<sup>+</sup> present outside the cell and Na<sup>+</sup> inside (NMDG<sup>+</sup><sub>out</sub>/Na<sup>+</sup><sub>in</sub>). Such technique later turned out to be biased due to time-dependent depletion of internal Na<sup>+</sup> and accumulation of NMDG<sup>+</sup> in the vicinity of the channel during sustained activation, a phenomenon known as “ion accumulation” (Li et al, 2015; Samways et al, 2016). The same phenomenon occurs under bi-ionic conditions where Ca<sup>2+</sup> was the sole extracellular charge carrier (Li et al, 2015; Samways et al, 2016). This technical bias potentially calls for the reexamination of the phenomenon of dynamic ion selectivity reported for the TRPV1 channel (Chung et al, 2008; Munns et al, 2015), TRPA1 channels (Banke, 2011; Chen et al, 2009), and TMEM16A calcium-activated chloride channels (Jung et al, 2013; Yu et al, 2014). However, apart from this technical debate, whether ion channels experience dynamic ion selectivity remains of critical importance since this could support ion channel functional bias (Chen et al, 2014; Herrington & Arey, 2014).

In this work, we generated highly sensitive BRET probes allowing for the non-invasive measurement of specific ions concentration changes in the vicinity of TRPV1 and P2X pore in real-time and live cells. This achievement was based on i) the success of our previous intramolecular and intermolecular BRET probes to study chemical and thermal activation of TRPV1 (Ruigrok et al., 2017; Chappe et al., 2021), ii) the possibility to track ion channel activity by the mean of a C-terminal fusion with a FRET-based or circularly permuted fluorescent-based calcium sensor, as demonstrated by us and others (Richler *et al*, 2008; Tay *et al*, 2012; Ollivier *et al*, 2021), and iii) the already characterized FRET and BRET sensors for Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and ionic strength of monovalent ions (Bischof *et al*, 2017; Liu *et al*, 2017b; Yang *et al*, 2019). Our probes were built using four different orientations (with the BRET sensor fused either at the N- or the C-terminal extremity of TRPV1 and with the sensor peptide sequence sandwiched in between nLuc and mNeonG at its N- and C-terminal or vice versa in the BRET sensor). Using the Calflux sensor, sensing Ca<sup>2+</sup>, we first determined that the mNeonG-calflux-nLuc-TRPV1 fusion protein yielded the bigger BRET change following TRPV1 challenging with CAPS. Interestingly, in our previous study using TRPV1-based intramolecular BRET probes (Ruigrok *et al*, 2017), the magnitude of the CAPS-induced BRET variation was also more significant when the fluorescent acceptor was N-terminally fused to TRPV1 (unpublished data). Both BRET probes harbor a free N-terminus in the fluorescent acceptor protein, which appear to be an essential requirement for a highly efficient energy transfer process (Molinari et al, 2008). We next used the various mNeonG-ion sensor-nLuc-TRPV1 BRET probes to assess the impact of CAPS on the level of intracellular Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and the ionic strength of monovalent ions. As expected, CAPS induced both an increase in Ca<sup>2+</sup> and a decrease in K<sup>+</sup> in the vicinity of the TRPV1 pore with a similar time constant and potency. Unexpectedly, the BRET ratio measured with the mNeonG-I3S-nLuc-TRPV1 increased with similar kinetics, indicating that the monovalent ionic strength time-dependently decreases in the nano-environment of the TRPV1 pore following CAPS activation. Knowing that i) K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> are the main monovalent ions flowing through TRPV1, and ii) our assays were done in conditions mimicking physiological ionic concentrations, this result suggests that more K<sup>+</sup> ions are outwardly flowing

through TRPV1 than  $\text{Na}^+$  ions are inwardly flowing. This result apparently contradicts the notion that TRPV1 does not discriminate among monovalent cations, as shown by the Julius laboratory in a similar cell line (Caterina *et al*, 1997). However, this discrepancy may be explained in the light of later studies showing that TRPV1 gating and sensitization are intimately dependent on the extracellular cation composition (Ahern, 2005; Ohta *et al*, 2008). Those studies, however, did not investigate the impact of extracellular cation composition on the  $\text{K}^+$  permeability of TRPV1. In their pioneering study, Caterina *et al*. (1997) performed whole-cell patch-clamp recording using bi-ionic experimental conditions (Caterina *et al*, 1997) while, in our BRET assay, the cell cytoplasmic composition remained unchanged and the buffer composition mimicked extracellular physiological conditions. It is fully conceivable that such difference in the experimental conditions supports the difference in the results of both studies.

Three significant results arise from our BRET study on TRPV1. Firstly, while all but one tested agonists displayed equivalent potency to gating the TRPV1 channel for both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$ , AMG517, AMG21629 and BCTC among the antagonists tested, were more potent to inhibit the CAPS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx than the CAPS-induced  $\text{K}^+$  efflux. Secondly, we found that AMG517, but not BCTC, is a long-lasting partial agonist of the  $\text{K}^+$  efflux through TRPV1. Thirdly, AMG517 induced a TRPV1-dependent hyperpolarization of the HEK293T cells. These results indicate that antagonists may display biased activity when interacting with a given ion channel by selectively and differentially inhibiting the flux of various ions through the gated channel.

How to explain that AMG517 antagonizes the CAPS-induced potassium flux and behaves as a partial agonist of the same ion flux at the same time? There are two basic mechanisms by which a molecule can alter the behavior of a given receptor toward other molecules: orthosteric or allosteric interactions (Kenakin, 2010, 2017). Apart from their structural similarity (BCTC) or dissimilarity (AMG517) with CAPS, whether AMG517 and BCTC are orthosteric or allosteric antagonists of CAPS is not known. Both AMG517 and BCTC were initially described as competitive antagonists of CAPS based on their ability to decrease CAPS potency, but not efficacy, to trigger a TRPV1-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx or uptake (Gavva *et al*, 2007; Valenzano *et al*, 2003). These results suggested that both AMG517 and BCTC were orthosteric antagonists of CAPS. If AMG517 was to bind TRPV1 at the same site as CAPS (or at an overlapping one), due to the principle of mutual exclusivity (only one ligand can occupy the receptor at a time), agonist activity may be reduced because of the competition for occupancy of a receptor by a ligand of lower intrinsic efficacy (a partial agonist, antagonist, or inverse agonist). In this case, when the competitor has entirely replaced occupancy at the receptor orthosteric site, the remaining response is due to the competitor and is dependent on the maximal response produced by the competitor (Berg & Clarke, 2018). Nonetheless, the competitive nature of AMG517 and BCTC may also be explained in the light of allosterism. If AMG517 or BCTC were to bind TRPV1 at a different site than CAPS, they would be defined as allosteric ligands of TRPV1. Therefore, they would be expected to produce their effect through alterations of the ion channel conformation. There are no theoretical reasons for which an allosteric change in the receptor would not lead to an active conformation while decreasing the activity of an orthosteric ligand. Allosteric ligands producing such effects are called negative allosteric modulator-agonists (NAM-Ago) and display a pharmacological profile resembling an orthosteric partial agonist (Kenakin, 2010, 2017). Consequently, whether AMG517 is an allosteric or an orthosteric ligand of TRPV1 (with regard to the CAPS binding site), it can differentially inhibit the CAPS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  fluxes while behaving as a partial agonist of the  $\text{K}^+$  flux.

We postulate that the TRPV1-dependent hyperpolarization measured when AMG517 is injected alone is due to its partial agonist of the  $\text{K}^+$  efflux. However, we acknowledge that our study was performed in HEK293T cells, the resting membrane potential of which lies around

-25 mV. At this value, the K<sup>+</sup> driving force is far from being negligible since the electrochemical equilibrium potential of the K<sup>+</sup> lies close to -90 mV. Knowing that most quiescent primary cells have a hyperpolarized resting membrane potential with a value lower than -50 mV (Abdul Kadir *et al*, 2018), one may therefore infer that ligand bias on TRP ion channel will rarely have physiological importance because the K<sup>+</sup> driving force will not be strong enough in these cells. Nonetheless, given the role that TRPV1 may play in the regulation of cancerous and healthy cell proliferation (Bujak *et al*, 2019; Zhai *et al*, 2020; Vrenken *et al*, 2016), and knowing that membrane depolarization is a prerequisite for cell division and proliferation (Carvalho, 2021), biased cationic selectivity in TRP ion channel may therefore occur in TRPV1 depending on the cell proliferation state.

Moreover, it is well known that hyperthermia occurs in a variety of mammalian organisms, including human, mouse, and rat, upon 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) can trigger hypothermia (reviewed in (Garami *et al*, 2020)). Even more striking is that chromanyl urea derivatives harboring subtle structural modifications exhibit a spectrum of thermoregulatory effects ranging from hypothermia to hyperthermia when binding to TRPV1 (Gomtsyan *et al*, 2015). From a pharmacological point of view, it could be understood that each of these ligands or antagonists induce a unique TRPV1 conformation that results in a biased response in terms of TRPV1-driven thermoregulation. Another example of biased TRPV1 signaling is the demonstration that TRPV1 antagonists may differentially impact the three main modes of TRPV1 gating (*i.e.*, the chemical mode (in the presence of agonists), low pH, and temperature above 43°C)(reviewed in (M. Blumberg *et al*, 2011; Romanovsky *et al*, 2009)). For example, the compound AMG8562 potently blocks TRPV1 activation by CAPS, does not affect heat activation of TRPV1, but potentiates TRPV1 activation by protons (Garami *et al*, 2018; Lehto *et al*, 2008). This observation agrees with the notion that protons, vanilloids, and temperature interact with distinct domains to regulate TRPV1 allosterically (Matta & Ahern, 2007). The transposition of the model described for GPCRs biased signaling (Smith *et al*, 2018) led us to consider that TRPV1 ion channels should not be modeled as “binary switches”, but rather as “allosteric microprocessors” that might generate a multitude of conformations in response to different ligands or different activation modes. Whether ligand-biased cationic selectivity is important for TRPV1-dependent body temperature regulation or whether cationic selectivity is differentially affected in response to the various modes of TRPV1 gating remains nonetheless to be determined but constitute a tempting hypothesis that deserves further attention.

What hypotheses could explain ligand bias on TRPV1 at the structural level? It is known that the pore regions of TRPV1/2/3/4 show significant sequence homology with the selectivity filter of the bacterial K<sup>+</sup> ion channel (KcsA). This includes the signature sequence motif TXGYGD that, in VR1 channels, is TXGMGD, suggesting a similar pore organization (Owsianik *et al*, 2006). Furthermore, at the outermost site of their selectivity filter facing the extracellular vestibule, most TRP channels harbor a negatively charged residue, predominantly aspartic acid, the mutation of which has been shown to affect ion selectivity (reviewed in (Cao, 2020)). 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 the permeability for Ca<sup>2+</sup> (García-Martínez *et al*, 2000; Voets *et al*, 2002), thus rendering both ion channels selective for monovalent ions. While the amino acid at this position may not account for all pore properties, suggesting the existence of additional structural determinants (García-Martínez *et al*, 2000), these experiments demonstrate nonetheless that the sequence motif and charge repartition in the putative pore region determine 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 gate and large conformational changes (Zhang *et al*, 2021; Cao *et al*, 2013). Given the similarity between the TRPV1 and KscA selectivity filter, and apart from the possibility of having various sizes of pore opening, ligand-induced allosteric stabilization of distinct conformational states with subtle changes in the charge repartition along the selectivity filter allows virtually for selective ion dehydration at the entrance barrier, and/or more or less tortuous trajectories of the different ions (Mita *et al*, 2021).

Another exciting issue arising from our results is that when extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is absent,  $\text{K}^+$  is apparently leaking freely from the non-activated TRPV1 channel (Fig. 6). Reciprocally, in CAPS-activated HEK293T cells expressing rat TRPV1, Ahern *et al* (2005) have shown a shift of  $E_{\text{rev}}$  to more positive values when the I/V curves were measured in the presence of a high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (100 mM) (Ahern, 2005). Altogether, these observations suggest that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and intracellular  $\text{K}^{2+}$  are competing for flowing through the TRPV1 pore or that the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is stabilizing a less-permeant TRPV1 conformation to potassium.

In this study, we also generated biosensors to monitor ligand gated ion channel activation. As a proof of concept, we fused the ionic BRET biosensors to the C-terminal tail of human P2X subunits. Such P2X-based BRET probes share similar functional properties with the native P2X receptors, such as kinetic of activation, desensitization, subcellular localization or  $\text{EC}_{50}$  for ATP. They therefore represent simple and valuable tools to monitor P2X receptor activity. However, tracking selective ion permeability through ionotropic receptors is challenging. To date, the only way to study specific ionic flux during ionotropic receptor gating is by electrophysiological recording. As for the study of other ion channel such as TRPV1, intra- or extra-cellular media must be constrained during electrophysiological recording, precluding therefore to monitor ionic flux in physiological conditions. P2X receptors are cationic channels that allow permeation of monovalent ions such as sodium and potassium, and divalent cations such as calcium. Although comparison of selective calcium permeability between P2X receptors have been reported (Egan, 2004), selective permeability of various cations following activation of a given P2X receptor has never been demonstrated. Using our BRET biosensors we detected potassium and calcium ions fluxes through the pore of P2X receptors in physiological extra- and intra-cellular media.

We found that during the first minutes following its injection in the cell culture medium, Bz-ATP displayed similar potency to induce both  $\text{K}^+$  efflux and  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the pore of hP2X5 receptors. However, Bz-ATP shows a better potency to induce  $\text{Ca}^{2+}$  influx than  $\text{K}^+$  efflux through the pore of hP2X7. To our knowledge, this is the first demonstration that Bz-ATP might be a more potent agonist for a specific cation flux through the P2X pore. Interestingly, we also measured a time-dependent variation of the P2X5 and P2X7 selectivity for potassium while Bz-ATP was kept in the cell culture medium. More experiences are needed to extend this concept to other P2X ion channels, such as the P2X4 receptor that display the highest  $\text{Ca}^{2+}$  permeability among the P2X family. Developing similar tools for other ionotropic receptors might also be interesting to track their activity and ion permeability in a given physiological or pathological context.

Finally, the demonstration that some compounds can more potently inhibit or activate one specific ion flux may directly impact the way we approach TRP channel molecular pharmacology and drug screening. The gold standard for studying ion channel activity, including TRP and P2X ion channels, remains patch-clamp electrophysiology. While manual patch-clamp is time-consuming and requires expert handling, the advent of automated patch-clamp (APC) provides increased throughput screening of ion channel targets (Obergrussberger

*et al*, 2020). However, since APC remains expensive, the combination of fluorescence-based screening technologies, as a primary screen, followed by APC as a hit confirmation screen, has become the most commonly used method for ion channel targeted drug discovery (Yu *et al*, 2016). In addition, TRP ion channel permeability is remarkably high to  $\text{Ca}^{2+}$ , which has favored the use of  $\text{Ca}^{2+}$ -based fluorescence assays to assess channel function using conventional plate readers or microscopes (Cordero-Sánchez *et al*, 2019). On the other hand, whatever 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 HTS studies performed on TRP channels only take into account the outward current measured at high positive membrane potential (Chambard *et al*, 2014). While this current is of much greater amplitude than the inward current measured at the negative resting  $E_m$ , it nonetheless corresponds to an outward potassium current in non-physiological membrane voltage conditions. We have recently shown that the assumption along which any hit displays an equal ability to activate or inhibit TRPV1 gating, irrespective of the membrane potential, is wrong (Chappe *et al*, 2021). In this former study, we have hypothesized that different ternary or quaternary conformational states of TRPV1 are stabilized when the  $E_m$  is clamped at selected values. The results presented here show that some compounds, such as AMG517, may behave as biased ligands that positively or negatively discriminate between ions that flow through a gated channel, adding a new layer of complexity. Therefore, our study points at 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 too). Ligand-dependent differential selectivity might therefore be a major source of experimental bias in many ion channel drug screening campaign. As an example, during a TRP ion channel drug screening campaign, if the workflow includes APC confirmation of hits formerly identified using a fluorescent calcium assay, the risk exists therefore to have false negative hits if only the outward current is taken into account during the secondary screen. On the other side, it is perfectly conceivable that biased ligands are overlooked by taking into account, as a primary screen against a given non selective cationic TRP ion channel, either the sole calcium fluorescent assay results or APC results measured at only one  $E_m$ . Therefore, in addition to our already described intra- and intermolecular BRET probes, addressing molecular events related to ion channel activation (conformational changes and dynamic of protein-protein interactions) that are intractable using either the conventional fluorescent-based probe or the patch-clamp techniques (Chappe *et al*, 2021; Ruigrok *et al*, 2017), our newly designed BRET-based probes now open an avenue for developing high added value to ion-channel drug discovery platforms by taking into account ligand-bias.



## 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 vector encoding mNeonG-TRPV1-nLuc, TRPV1-nLuc, and mNeonG-CaM were described in (Chappe *et al*, 2021).

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, Leiden, The Netherlands), that encode respectively nLuc or mNeonGreen (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 either TRPV1 or P2X5/7 ion channel (brick 2 and 3) as indicated in Supplementary figure 3. All bricks sequences are available using the following link: <https://cloud.ims-bordeaux.fr/index.php/s/QronTSZ8uKAKZGr>.

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 (Sup. Table 1). 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 bricks 1 to 4 was subjected to 35 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.

### Reagents

Olvamil, Resiniferatoxin (RTX), AMG517, AMG9810, BCTC, JNJ-17203212, and AMG21629 were all from Tocris (Bristol, UK). Capsaicin (CAPS) and Capsazepine (CPZ) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). Furimazine (Promega, Madison, WI, USA) or Coelenterazine H (Nanolight Technology, Pinetop, AZ, USA) was added to a final concentration of 5  $\mu$ 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, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units mL<sup>-1</sup> 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, Mr 25,000; Cat. No. 23966 Polysciences, Warrington, PA, USA) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as explained in Percherancier *et al*. (Percherancier *et al*, 2005). When intramolecular BRET assays were performed using any ion BRET sensor N-terminally or C-terminally fused to either TRPV1 or P2X5/7 (Supplementary fig. 1), HEK293T cells were transfected with 0.1  $\mu$ g of the corresponding expression vector and 1.9  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector. Alternatively, HEK293T cells were transfected with 0.1  $\mu$ g of mNeonG-TRPV1-nLuc and 1.9  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector, or 0.1  $\mu$ g of TRPV1-nLuc expression vector and 1.9  $\mu$ g of mNeonG-CaM expression vectors for intramolecular and intermolecular BRET assays respectively, as described in (Chappe *et al*, 2021). Following overnight incubation, transfected cells were detached and resuspended in DMEM w/o red phenol (Cat. No. 21063-029; ThermoFisher Scientific) containing 10% fetal bovine serum, 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, Courtaboeuf, France). Cells were left in culture for an additional 24 h before being processed for BRET assay.

### BRET measurement in 96-well plates

Following the addition of Coelenterazine H into the Red-phenol free cell culture medium at a final concentration of 5  $\mu$ M, BRET signals were measured using a multidetector TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) and emission filters centered at 510 $\pm$ 40 nm for mNeonG (*I*<sub>acceptor</sub>) and 460 $\pm$ 20 nm for nLuc (*I*<sub>donor</sub>).



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:

$$(6) \quad \text{BRET} = \frac{I_{mNeonG}}{I_{nLuc}}$$

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 (Hamdan *et al.*, 2006). 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 any ion channel BRET based probes, Coelenterazine H or Furimazine was added at the concentration of 5  $\mu\text{M}$  and incubated 10 min before agonists and antagonists were injected. BRET signal were measured 5min after the addition of the last compound. All experiments were performed at 37° C and pH 7.4 unless otherwise indicated. In all experiments, DMSO alone is used negative control (vehicle).

### Concentration-response using BRET assays.

Concentration-response curves and kinetics were analyzed using the software Prism 8.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Sigmoidal dose-response curves were fitted using Eq. 2.:

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

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

### Membrane potential assay kits in confocal microscopy

Transfected HEK293T cells plated in 96 well black plate with clear bottom 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 instructions (Molecular Device, San Jose, CA, USA). On the day of the experiment, culture medium was replaced with 50  $\mu\text{l}$  of fresh DMEM (Sigma-Aldrich). Then, 50  $\mu\text{L}$  of red dye-loading buffer was added directly to each well, and left for 30 minutes 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 study, 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. 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 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 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 ms voltage ramps from -60 to +60

mV were applied every 10 sec for 3 min. After 4 ramps, Capsaicin (10  $\mu$ 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 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), one application of the agonist Capsaicin EC<sub>50</sub> (50 nM) for 1-2 minutes, followed by addition of 10  $\mu$ M of the test compound (1-2 minutes), in the presence of Capsaicin EC<sub>50</sub>, and lastly addition of the full block 10  $\mu$ M Capsazepine (1 minute). In both activation and inhibition mode, 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. 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%.

## Bibliography

- Abdul Kadir L, Stacey M & Barrett-Jolley R (2018) Emerging Roles of the Membrane Potential: Action Beyond the Action Potential. *Front Physiol* 9: 1661
- Ahern GP (2005) Extracellular Cations Sensitize and Gate Capsaicin Receptor TRPV1 Modulating Pain Signaling. *Journal of Neuroscience* 25: 5109–5116
- Banke TG (2011) The dilated TRPA1 channel pore state is blocked by amiloride and analogues. *Brain Research* 1381: 21–30
- Benton DCH, Monaghan AS, Hosseini R, Bahia PK, Haylett DG & Moss GWJ (2003) Small Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels Formed by the Expression of Rat *SK1* and *SK2* Genes in HEK 293 Cells. *The Journal of Physiology* 553: 13–19
- Berg KA & Clarke WP (2018) Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 21: 962–977
- Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CSJ & Yeats JC (1992) Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology* 107: 544–552
- Bischof H, Rehberg M, Stryeck S, Artinger K, Eroglu E, Waldeck-Weiermair M, Gottschalk B, Rost R, Deak AT, Niedrist T, *et al* (2017) Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in vivo. *Nat Commun* 8: 1422
- Bujak JK, Kosmala D, Szopa IM, Majchrzak K & Bednarczyk P (2019) Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. *Front Oncol* 9: 1087
- Cao E (2020) Structural mechanisms of transient receptor potential ion channels. *Journal of General Physiology* 152: e201811998
- Cao E, Liao M, Cheng Y & Julius D (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504: 113–118
- Carvalho J (2021) A bioelectric model of carcinogenesis, including propagation of cell membrane depolarization and reversal therapies. *Sci Rep* 11: 13607
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824
- Chambard J-MM, Tagat E, Boudeau P & Partiseti M (2014) Transforming TRP channel drug discovery using medium-throughput electrophysiological assays. *J Biomol Screen* 19: 468–77
- Chappe Y, Michel P, Joushomme A, Barbeau S, Pierredon S, Baron L, Garenne A, Poullétier 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
- Chatelain FC, Bichet D, Douguet D, Feliciangeli S, Bendahhou S, Reichold M, Warth R, Barhanin J & Lesage F (2012) TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 5499–5504
- Chen H, Chatelain FC & Lesage F (2014) Altered and dynamic ion selectivity of K<sup>+</sup> channels in cell development and excitability. *Trends in Pharmacological Sciences* 35: 461–469
- Chen J, Kim D, Bianchi BR, Cavanaugh EJ, Faltynek CR, Kym PR & Reilly RM (2009) Pore Dilation Occurs in TRPA1 but Not in TRPM8 Channels. *Mol Pain* 5: 1744-8069-5–3
- Chung M-K, Güler AD & Caterina MJ (2008) TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11: 555–564
- Cordero-Sánchez C, Mudarra-Fraguas I & Fernández-Carvajal A (2019) Fluorescence-Based Functional Assays for Ca<sup>2+</sup>-Permeable ThermoTRP Channels. In *TRP Channels*, Ferrer-Montiel A & Hucho T (eds) pp 99–110. New York, NY: Springer New York

Cui Y, Yang F, Cao X, Yarov-Yarovoy V, Wang K & Zheng J (2012) Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J Gen Physiol* 139: 273–83

De-la-Rosa V, Rangel-Yescas GE, Ladrón-de-Guevara E, Rosenbaum T & 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

Egan TM (2004) Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *Journal of Neuroscience* 24: 3413–3420

Ferreira LGB & Faria RX (2016) TRPing 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

Fischer W, Franke H, Gröger-Arndt H & Illes P (2005) 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

Fountain SJ & North RA (2006) A C-terminal Lysine That Controls Human P2X<sub>4</sub> Receptor Desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 281: 15044–15049

Garami A, Pakai E, McDonald HA, Reilly RM, Gomtsyan A, Corrigan JJ, Pinter E, Zhu DXD, Lehto SG, Gavva NR, *et al* (2018) TRPV1 antagonists that cause hypothermia, instead of hyperthermia, in rodents: Compounds' pharmacological profiles, in vivo targets, thermoeffectors recruited and implications for drug development. *Acta Physiol* 223: e13038

Garami A, Shimansky YP, Pakai E, Oliveira DL, Gavva NR & Romanovsky AA (2010) Contributions of Different Modes of TRPV1 Activation to TRPV1 Antagonist-Induced Hyperthermia. *Journal of Neuroscience* 30: 1435–1440

Garami A, Shimansky YP, Rumbus Z, Vizin RCL, Farkas N, Hegyi J, Szakacs Z, Solymar M, Csenkey A, Chiche DA, *et al* (2020) Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacology & Therapeutics* 208: 107474

García-Martínez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM & Ferrer-Montiel A (2000) Identification of an Aspartic Residue in the P-loop of the Vanilloid Receptor That Modulates Pore Properties. *Journal of Biological Chemistry* 275: 32552–32558

Gavva NR, Bannon AW, Hovland DN, Lehto SG, Klionsky L, Surapaneni S, Immke DC, Henley C, Arik L, Bak A, *et al* (2007) Repeated Administration of Vanilloid Receptor TRPV1 Antagonists Attenuates Hyperthermia Elicited by TRPV1 Blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 128–137

Gavva NR, Treanor JJS, Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, Alvarez F, Bak A, Darling M, Gore A, *et al* (2008) Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 136: 202–210

Global data (2020) GlobalData's Pharma Intelligence Center Drug Sales and Forecast Database.

Gomtsyan A, McDonald HA, Schmidt RG, Daanen JF, Voight EA, Segreti JA, Puttfarcken PS, Reilly RM, Kort ME, Dart MJ, *et al* (2015) TRPV1 ligands with hyperthermic, hypothermic and no temperature effects in rats. *Temperature* 2: 297–301

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

Herrington J & Arey BJ (2014) Conformational Mechanisms of Signaling Bias of Ion Channels. In *Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics* pp 173–207. Elsevier

- Jung J, Nam JH, Park HW, Oh U, Yoon J-H & Lee MG (2013) Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> permeability by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 360–365
- Kaszas K, Keller JM, Coddou C, Mishra SK, Hoon MA, Stojilkovic S, Jacobson KA & Iadarola MJ (2012) Small Molecule Positive Allosteric Modulation of TRPV1 Activation by Vanilloids and Acidic pH. *J Pharmacol Exp Ther* 340: 152–160
- Kenakin TP (2010) Ligand Detection in the Allosteric World. *J Biomol Screen* 15: 119–130
- Kenakin TP (2017) Allosteric Drug Effects. In *Pharmacology in Drug Discovery and Development* pp 101–129. Elsevier
- Kirkton RD & Bursac N (2011) Engineering biosynthetic excitable tissues from unexcitable cells for electrophysiological and cell therapy studies. *Nat Commun* 2: 300
- Kiss L, LoTurco J & Korn SJ (1999) Contribution of the Selectivity Filter to Inactivation in Potassium Channels. *Biophysical Journal* 76: 253–263
- Lau S-Y, Procko E & Gaudet R (2012) Distinct properties of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *Journal of General Physiology* 140: 541–555
- Lehto SG, Tamir R, Deng H, Klionsky L, Kuang R, Le A, Lee D, Louis J-C, Magal E, Manning BH, *et al* (2008) Antihyperalgesic Effects of (R, E)-N-(2-Hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)-3-(2-(piperidin-1-yl)-4-(trifluoromethyl)phenyl)-acrylamide (AMG8562), a Novel Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Modulator That Does Not Cause Hyperthermia in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 218–229
- Li M, Toombes GES, Silberberg SD & Swartz KJ (2015) Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 18: 1577–1583
- Liu B, Åberg C, van Eerden FJ, Marrink SJ, Poolman B & Boersma AJ (2017a) Design and Properties of Genetically Encoded Probes for Sensing Macromolecular Crowding. *Biophysical Journal* 112: 1929–1939
- Liu B, Poolman B & Boersma AJ (2017b) Ionic Strength Sensing in Living Cells. *ACS Chem Biol* 12: 2510–2514
- López-Romero AE, Hernández-Araiza I, Torres-Quiroz F, Tovar-Y-Romo LB, Islas LD & Rosenbaum T (2019) TRP ion channels: Proteins with conformational flexibility. *Channels* 13: 207–226
- M. Blumberg P, V. Pearce L & Lee J (2011) TRPV1 Activation is Not An All-Or-None Event: TRPV1 Partial Agonism/Antagonism and Its Regulatory Modulation. *CTMC* 11: 2151–2158
- Ma L, Zhang X & Chen H (2011) TWIK-1 two-pore domain potassium channels change ion selectivity and conduct inward leak sodium currents in hypokalemia. *Sci Signal* 4: ra37
- Ma L, Zhang X, Zhou M & Chen H (2012) 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
- Matta JA & Ahern GP (2007) Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *The Journal of physiology* 585: 469–482
- Mellor IR, Ogilvie J, Pluteanu F, Clothier RH, Parker TL, Rosini M, Minarini A, Tumiatti V & Melchiorre C (2004) Methocitramine analogues inhibit responses to capsaicin and protons in rat dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Pharmacology* 505: 37–50
- Mita K, Sumikama T, Iwamoto M, Matsuki Y, Shigemi K & Oiki S (2021) 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 USA* 118: e2017168118

Molinari P, Casella I & Costa T (2008) Functional complementation of high-efficiency resonance energy transfer: a new tool for the study of protein binding interactions in living cells. *Biochem J* 409: 251–61

Munns CH, Chung M-K, Sanchez YE, Amzel LM & Caterina MJ (2015) Role of the Outer Pore Domain in Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Dynamic Permeability to Large Cations. *J Biol Chem* 290: 5707–5724

Obergrussberger A, Friis S, Brüggemann A & Fertig N (2020) Automated patch clamp in drug discovery: major breakthroughs and innovation in the last decade. *Expert Opinion on Drug Discovery*: 1–5

Ohta T, Imagawa T & Ito S (2008) Novel Gating and Sensitizing Mechanism of Capsaicin Receptor (TRPV1). *Journal of Biological Chemistry* 283: 9377–9387

Ollivier M, Beudez J, Linck N, Grutter T, Compan V & Rassendren F (2021) P2X-GCaMPs as Versatile Tools for Imaging Extracellular ATP Signaling. *eNeuro* 8: ENEURO.0185-20.2020

Owsianik G, Talavera K, Voets T & Nilius B (2006) PERMEATION AND SELECTIVITY OF TRP CHANNELS. *Annu Rev Physiol* 68: 685–717

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

Peeverini L, Beudez J, Dunning K, Chataigneau T & Grutter T (2018) New Insights Into Permeation of Large Cations Through ATP-Gated P2X Receptors. *Front Mol Neurosci* 11: 265

Ramahi AA & Ruff RL (2014) Membrane Potential. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences* pp 1034–1035. Elsevier

Richler E, Chaumont S, Shigetomi E, Sagasti A & Khakh BS (2008) Tracking transmitter-gated P2X cation channel activation in vitro and in vivo. *Nat Methods* 5: 87–93

Romanovsky AA, Almeida MC, Garami A, Steiner AA, Norman MH, Morrison SF, Nakamura K, Burmeister JJ & Nucci TB (2009) The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in Thermoregulation: A Thermosensor It Is Not. *Pharmacol Rev* 61: 228–261

Ruigrok HJ, Shahid G, Goudeau B, Poulletier 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

Samways DSK, Tomkiewicz E, Langevin OM & Bukhari M (2016) Measurement of relative Ca<sup>2+</sup> permeability during sustained activation of TRPV1 receptors. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 468: 201–211

Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, Karlsson A, Al-Lazikani B, Hersey A, Oprea TI, *et al* (2017) A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 16: 19–34

Smith JS, Lefkowitz RJ & Rajagopal S (2018) Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov* 17: 243–260

Starkus JG, Kuschel L, Rayner MD & Heinemann SH (1997) Ion Conduction through C-Type Inactivated Shaker Channels. *Journal of General Physiology* 110: 539–550

Talavera K & Nilius B (2011) Electrophysiological Methods for the Study of TRP Channels. In *TRP Channels*, Zhu MX (ed) Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis

Tay LH, Dick IE, Yang W, Mank M, Griesbeck O & Yue DT (2012) Nanodomain Ca<sup>2+</sup> of Ca<sup>2+</sup> channels detected by a tethered genetically encoded Ca<sup>2+</sup> sensor. *Nat Commun* 3: 778

Tominaga M, Wada M & Masu M (2001) Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 6951–6956

Valente P, García-Sanz N, Gomis A, Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Viana F, Belmonte C & Ferrer-Montiel A (2008) Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *FASEB j* 22: 3298–3309

Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, Tafesse L, Sun Q, Rotshteyn Y, Francis J, Limberis J, *et al* (2003) *N*-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2*H*)-carbox-amide (BCTC), a Novel, Orally Effective Vanilloid Receptor 1 Antagonist with Analgesic Properties: I. In Vitro Characterization and Pharmacokinetic Properties. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 377–386

Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Bödding M, Droogmans G & Nilius B (2002) Molecular Determinants of Permeation through the Cation Channel TRPV4. *Journal of Biological Chemistry* 277: 33704–33710

Vrenken KS, Jalink K, van Leeuwen FN & Middelbeek J (2016) Beyond ion-conduction: Channel-dependent and -independent roles of TRP channels during development and tissue homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863: 1436–1446

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

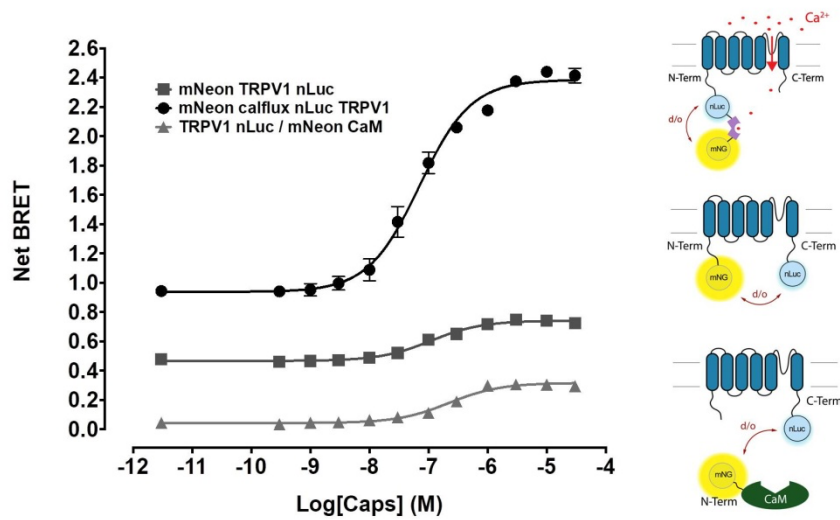
Yang JH, Siregar AS, Kim E-J, Nyiramana MM, Shin E-J, Han J, Sohn J-T, Kim JW & Kang D (2019) Involvement of TREK-1 Channel in Cell Viability of H9c2 Rat Cardiomyoblasts Affected by Bupivacaine and Lipid Emulsion. *Cells* 8: 454

Yu H, Li M, Wang W & Wang X (2016) High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol Sin* 37: 34–43

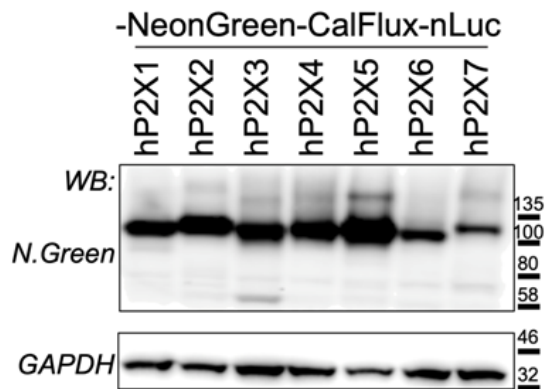
Yu Y, Kuan A-S & Chen T-Y (2014) Calcium-calmodulin does not alter the anion permeability of the mouse TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Journal of General Physiology* 144: 115–124

Zhai K, Liskova A, Kubatka P & Büsselberg D (2020) Calcium Entry through TRPV1: A Potential Target for the Regulation of Proliferation and Apoptosis in Cancerous and Healthy Cells. *IJMS* 21: 4177

Zhang K, Julius D & Cheng Y (2021) Structural snapshots of TRPV1 reveal mechanism of polymodal functionality. *Cell* 184: 5138-5150.e12

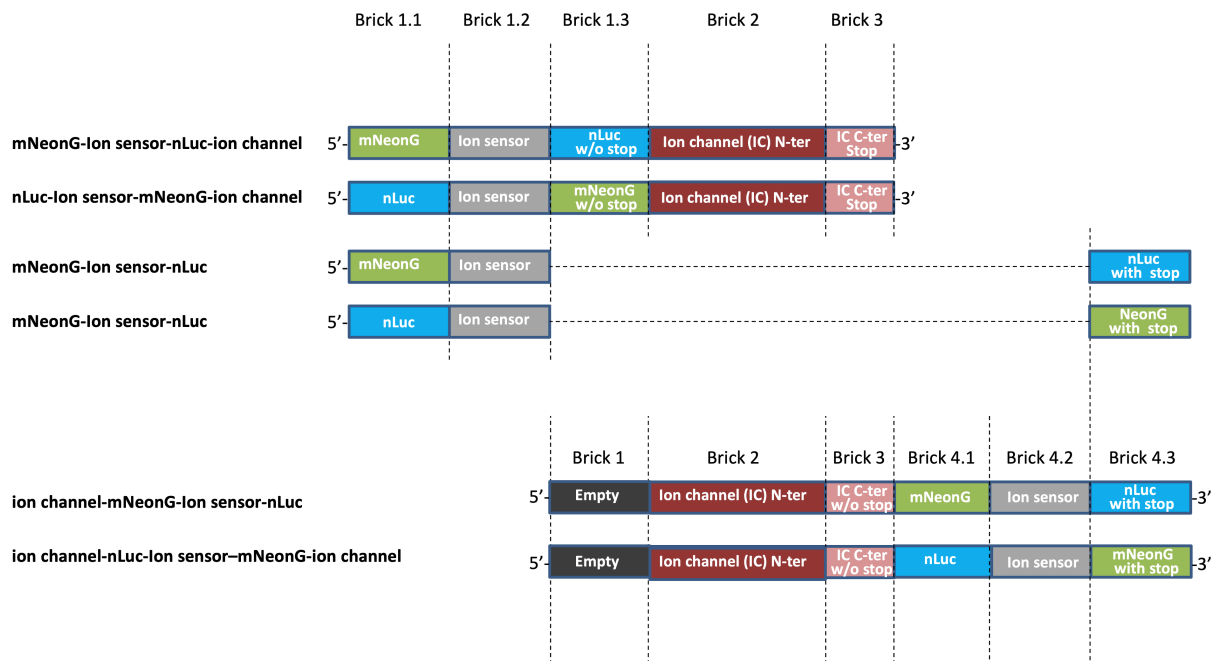


**Supplementary Figure 1:** Concentration-response curves of CAPS-induced BRET changes measured in HEK293T cells expressing the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV1 (n=3), mNeonG-TRPV1-nLuc (n=4) or TRPV1-nLuc / mNeonG-CaM (n=3). The schematic representation of the TRPV1-based BRET probes are shown as insets.



**Supplementary Figure 2:** Analysis by western blot of the seven human P2X subunits fused to the BRET calcium sensor mNeonGreen-CalFlux-nLuc after expression in HEK293T cells. The P2X biosensors were revealed using an anti-NeonGreen antibody and an anti-GAPDH antibody was used as loading control.

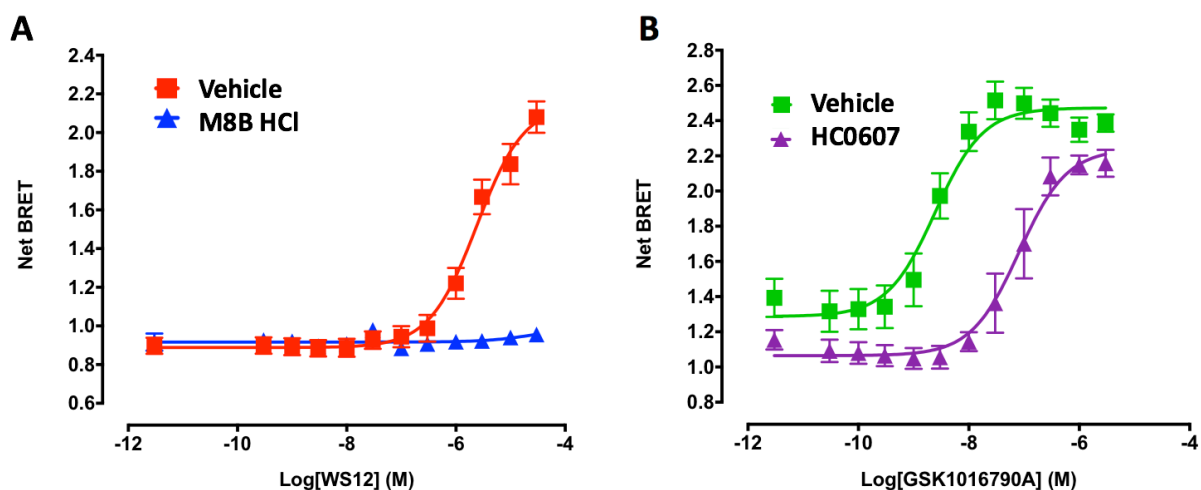




**Supplementary Figure 3:** Schematic representation of the golden-gate strategies used.

### 3.5 Exemplification du principe des sondes BRET à ions étendu à d'autres canaux

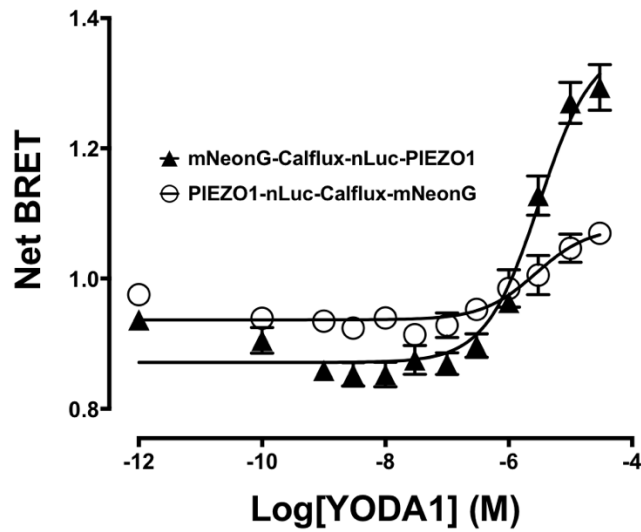
Nous avons pu montrer que les applications et possibilités des sondes BRET permettant l'étude de la fonctionnalité des canaux ioniques par la mesure de la concentration en ions proximale sont multiples. Bien que déjà élargi à la famille des canaux P2X, nous avons exemplifié ce concept de sonde senseur d'ions à d'autres canaux TRPs et non-TRPs, comme PIEZO1, KCa2.3, et TREK1. Comme le montre la figure 39, le concept de sondes à ion calcique fonctionne également pour les canaux TRPM8 et TRPV4. En effet, nous avons pu mettre en évidence des profils sigmoïdaux de doses réponses d'agonistes spécifiques de sondes mNeon-Calflux-nLuc-TRPM8 et mNeon-Calflux-nLuc-TRPV4, et leur antagonisation par des composés spécifiques.



**Figure 39 :** A) Dose réponse de WS12 réalisée sur la sonde mNeon-Calflux-nLuc-TRPM8 et son antagonisation par le M8B hydrochloride (10 $\mu$ M). B) Doses réponse de GSK101 réalisées sur la sonde mNeon-Calflux-nLuc-TRPV4 et son antagonisation par le HC0607 (10 $\mu$ M) (expériences réalisées par Alexandre Joushomme, doctorant dans l'équipe de Yann Percherancier). (N=5  $\pm$  SEM)

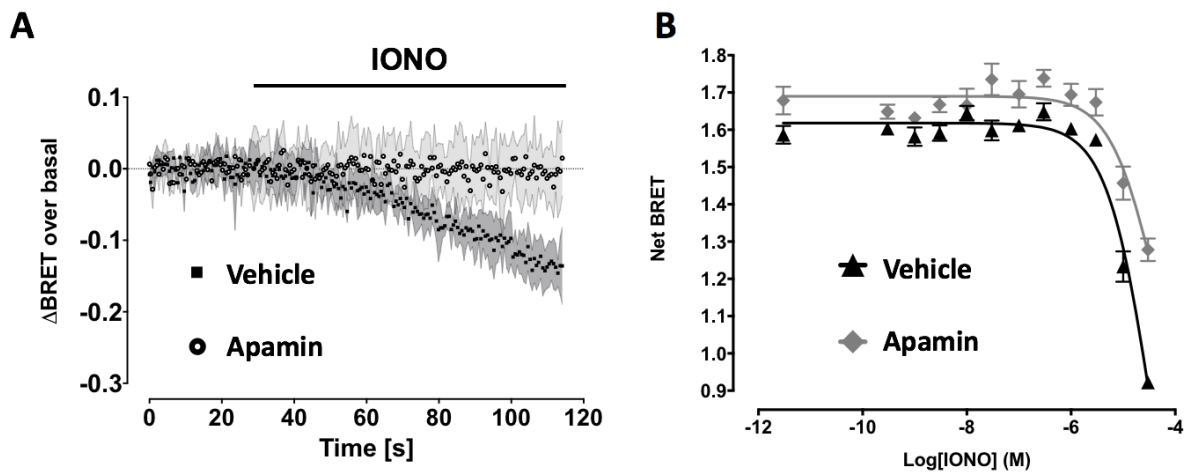
Le concept de sondes à ions calciques a été exemplifié à d'autres canaux non-TRPs comme P2X (cf chapitre 3.4) et PIEZO1 (Fig. 40). Comme nous pouvons le voir, une dose réponse de YODA1, l'agoniste spécifique de PIEZO1, entraîne une augmentation du signal de BRET en suivant une forme sigmoïdale. Nous avons pu régulièrement constater que l'orientation mNeon-senseur-nLuc-Canal est la plus favorable à l'obtention de réponses de très

fortes amplitudes. Un constat qui serait lié au fait que l'extrémité N-terminale du fluorophore reste libre (Molinari et al., 2008).



**Figure 40 :** A) Dose réponse de YODA1 réalisée sur les sondes mNeon-Calflux-nLuc-PIEZO1 et PIEZO1-nLuc-Calflux-mNeon (expériences réalisées par Alexandre Joushomme). (N=4 ± SEM)

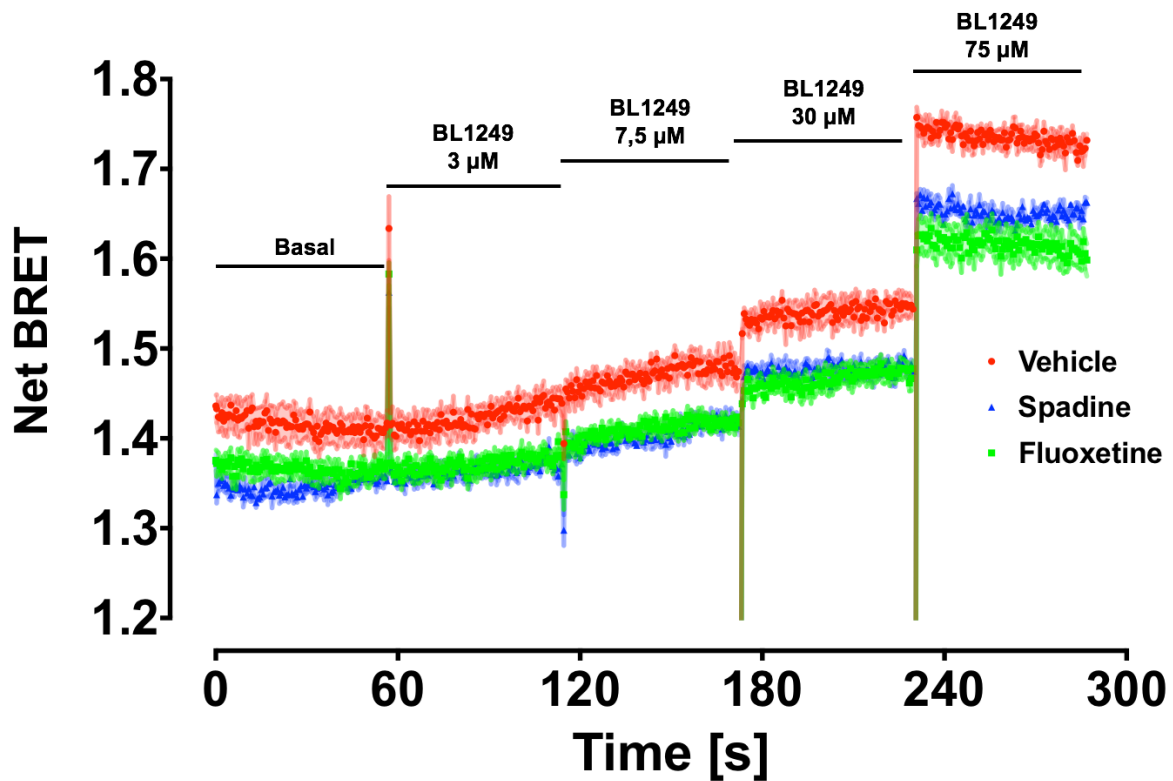
Dans le but d'élargir le concept, nous avons également exemplifié l'utilisation des senseurs BRET à ions potassiques à d'autres canaux sélectifs pour le potassium. Nous avons ainsi prouvé que ces sondes fonctionnaient également pour d'autres canaux potassiques comme KCa2.3 (Fig. 41) et Trek1 (Fig. 42) en réalisant des cinétiques et des doses réponses de l'effet d'agonistes, en présence ou en absence d'antagonistes spécifiques de ces canaux. L'analyse de nos résultats renforce nos constats précédents. Ainsi, l'ajout d'apamine, un peptide que l'on trouve dans le venin d'abeille, limite la diminution de la concentration de potassium sous le canal KCa2.3 en réponse à une augmentation de calcium intracellulaire provoqué par la ionomycine, un ionophore calcique.



**Figure 41 :** A) Cinétique montrant la réponse de la sonde BRET mNeon-KBP-nLuc-KCa2.3 ( $N=4 \pm \text{SEM}$ ) à un stimuli de  $10\mu\text{M}$  de ionomycine, un ionophore calcique, et son antagonisation par l'Apamine, un peptide antagoniste spécifique de KCa2.3. B) Dose réponse de ionomycine sur la sonde mNeon-KBP-nLuc-KCa2.3 et son antagonisation par l'apamine ( $100\text{nM}$ ).

Comme pour le canal KCa2.3, nous avons également construit des sondes à potassium pour le canal Trek1 (mNeon-KBP-nLuc-Trek1), et les avons évaluées en suivant la cinétique d'activation par le composé BL1249 (Fig. 42). En réponse à son agoniste, le signal BRET de cette sonde montre une surprenante augmentation de son signal BRET de base, suggérant une augmentation de la concentration de potassium sous ce canal en réponse à son agoniste. Ce constat est clairement contraire à ce que l'on pourrait attendre d'un canal potassique K2P en condition physiologique. Néanmoins, nous observons que cet effet est limité par une pré-incubation de spadine et de fluoxetine, deux antagonistes connus pour être spécifique des canaux K2P. De plus, ces deux antagonistes entraînent une diminution du signal BRET de base de cette sonde par rapport à l'injection contrôle (« vehicle ») suggérant que le canal est pré-activé. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Au regard de la fonction de canal de fuite du courant potassique de Trek1, il est probable que la transfection de ce canal entraîne une hyperpolarisation des cellules dans lesquelles il est transfecté. Ainsi, les cellules HEK293T pourraient se retrouver dans une configuration où son potentiel membranaire serait proche du potentiel d'équilibre des ions potassiques, qui se situe vers  $-90\text{mV}$ . De cette manière, la force électromotrice du flux potassique transitant par ce canal pourrait s'inverser et entraîner l'entrée des ions potassiums en réponse à un stimuli agoniste, ce qui a déjà été suggéré dans d'autres études (Schewe et al., 2016). Une solution serait de contrôler le potentiel de membrane avec le patch-clamp ou une sonde à potentiel de membrane située à proximité immédiate du canal

TREK. Néanmoins des investigations supplémentaires seront nécessaires pour expliquer ce phénomène.



**Figure 42 :** A) Cinétique montrant la réponse de la sonde BRET mNeon-KBP-nLuc-Trek1 ( $N=5 \pm SEM$ ) à des stimuli multiples de BL1249 et son antagonisation par la spadine (100nM) un peptide antagoniste spécifique de Trek1 et la fluoxetine (10µM).

L'ensemble des résultats présentés dans le chapitre ci-dessus, montre que notre concept de sondes BRET à flux d'ions peut être élargi à l'étude d'autres cibles comme les canaux K2P, P2X, PIEZO et KCa. Comme nous avons pu le voir dans l'ensemble du chapitre 3, une telle démarche pourrait permettre de faire émerger des nouveaux concepts pour les mécanismes de régulations de ces canaux, mais également de nouvelles approches thérapeutiques et proposer des solutions pharmacologiques à de nombreuses canaloopathies.

### 3.6 Étude de la distribution du canal TRPV1 et de sa pharmacologie à l'aide d'un test BRET bystander.

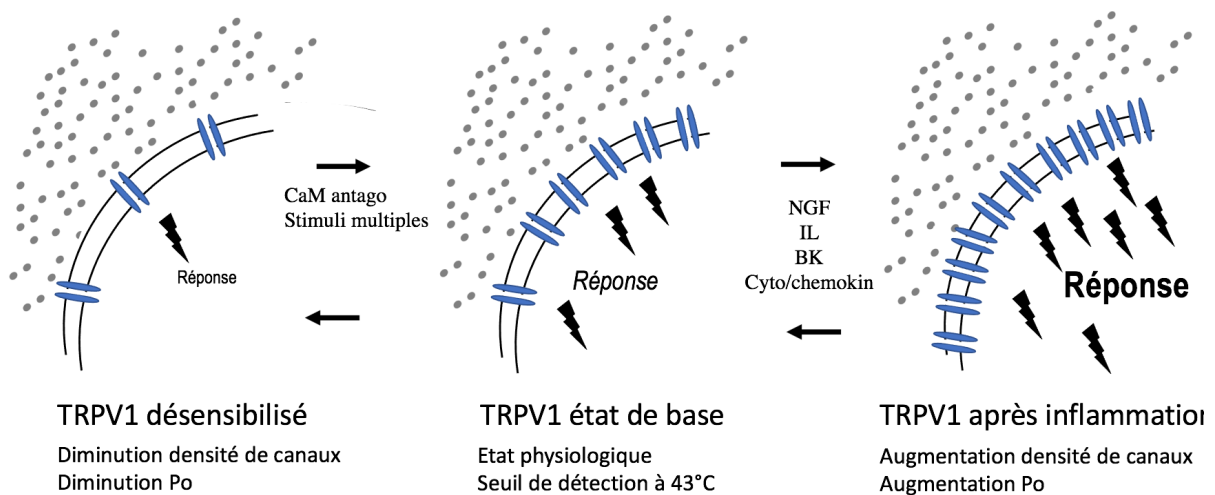
Le contrôle de l'expression à la surface de la membrane plasmique est un mécanisme essentiel de régulation de l'activité des récepteurs membranaires. Ces mécanismes maintiennent l'intégrité cellulaire, modulent l'intensité des signaux et permettent un recyclage efficace de

ces récepteurs (Ferrandiz-Huertas et al., 2014). Certains d'entre eux sont très bien caractérisés, comme les changements rapides de densité de récepteurs par insertion et recyclage dans la membrane plasmique des récepteur membranaires stockés dans des compartiments intermédiaires (Estadella et al., 2020). L'étude de ces mécanismes apporte une réelle plus-value pour la compréhension de la fonctionnalité de ces récepteurs et a permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt sur les RCPGs (René et al., 2010). En effet, des avantages thérapeutiques ont été obtenus avec des médicaments favorisant le routage intracellulaire des RCPGs vers les compartiments intracellulaires ou au contraire en permettant leur recyclage et leur adressage vers la membrane plasmique pour maintenir ou retrouver une fonction physiologique normale. Ceci représente une perspective d'autant plus alléchante qu'aujourd'hui nous pouvons cibler ces « voies de régulation » avec des médicaments, pour permettre une régulation différentielle de la distribution de ces récepteurs. Ces découvertes ont permis de faire émerger de nouvelles approches thérapeutiques innovantes comme les chaperonnes pharmacologiques. C'est ainsi que de nombreux nouveaux médicaments dirigés contre des RCPGs (René et al., 2010) et même certains canaux ioniques comme les CFTR ont vu le jour (Carlile et al., 2018). Malgré le succès évident de cette approche, celle-ci est encore sous exploitée dans une optique de recherche de nouveaux médicaments ciblant les canaux ioniques. Pourtant, contrôler la densité des canaux ioniques à la surface de la membrane plasmique représente une approche thérapeutique pertinente en vue de limiter les effets de ces récepteurs ou d'optimiser l'effet de médicaments.

Pour les canaux ioniques, les modes de régulation de l'expression membranaire sont encore trop peu étudiés, voir mal compris. Ceci est en grande partie due aux limites actuelles des approches techniques nécessaire à de telles études, comme la microscopie confocale ou la mesure de capacitance avec le patch-clamp (Kanner et al., 2018; Wu et al., 2009), qui ne permettent pas les études pharmacologiques à très haut débit. Pour autant, depuis une dizaine d'année, des alternatives à très haut débits pour étudier ces phénomènes ont déjà été validées pour des cibles comme les RCPGs (Ayoub, 2016). Ces approches tirent profit de la technique du BRET pour construire des tests en cellule vivante et en temps réel d'étude de la distribution de ces récepteurs.

Aujourd'hui, un nombre croissant de pathologies impliquant des canaux ioniques sont associées avec un trafic accru vers la membrane plasmique et une augmentation de la densité de surface de ces canaux. Un contrôle minutieux de cette densité, au cours des processus physiologiques et pathologiques est une approche thérapeutique pertinente pour prendre en

charge certaines maladies telles que la douleur chronique, une affection qui touche près de 20% de la population mondiale. Compte tenu de son rôle dans la sensation de la douleur, TRPV1 est l'une des cibles pharmacologiques les plus importantes pour traiter cette pathologie (Abbas, 2020). Ainsi, l'expression accrue de TRPV1 à la membrane plasmique est régulièrement associée au syndrome de douleur chronique (Fig. 43) (Jara-Oseguera et al., 2010b).



**Figure 43 :** Représentation schématique théorique des mécanismes de sensibilisation et de désensibilisation du canal TRPV1 d'après (Ferrandiz-Huertas et al., 2014). Po : Probabilité d'ouverture.

A l'état de base, des nouveaux canaux TRPV1 sont constamment recrutés à la surface cellulaire, et les canaux préexistants sont recyclés par endocytose/exocytose. Les canaux TRPV1 maintiennent ainsi une certaine homéostasie dans la densité de surface des canaux fonctionnels, ce qui constitue un mécanisme essentiel pour la régulation de l'activité de TRPV1. Lors d'une activation prolongée de ce canal par son agoniste la capsaïcine, ce dernier subit une désensibilisation aiguë qui diminue son activité de canal ionique (Caterina et al., 1997). De la même manière, la stimulation répétée de TRPV1 entraîne une tachyphylaxie qui abaisse le taux d'activation de TRPV1 avec les stimulations successives (Tian et al., 2019). L'ensemble de ces fonctionnalités a été corrélé avec une modulation de la densité de surface de ces récepteurs (Jara-Oseguera et al., 2010a). Ces mécanismes de boucles de rétro-activation négatives semblent impliquer la Calmoduline, le capteur de calcium principal des cellules, et le flux de calcium transitant à travers le pore de TRPV1. Néanmoins, les mécanismes moléculaires en œuvre pour cette régulation sont encore flous et seraient liés à une diminution de la densité de

canaux TRPV1 à la membrane plasmique (Lau et al., 2012; Lishko et al., 2007; Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004).

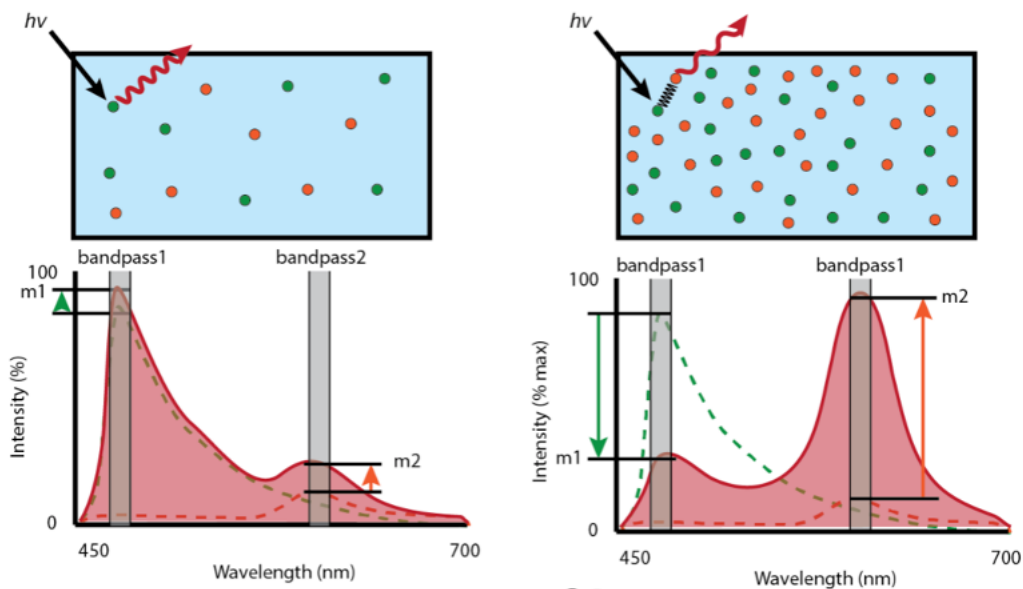
A l'inverse, l'ATP, le NGF, la bradykinine et les interleukines, dont la concentration augmente lors de la réponse inflammatoire, entraînent une sensibilisation du canal TRPV1 et augmentent l'intensité des signaux produit par ce canal. Cette sensibilisation de la réponse médiée par TRPV1 met en œuvre de multiples mécanismes de régulation (principalement la phosphorylation et la déphosphorylation) pouvant conduire à une augmentation de la probabilité d'ouverture ou à un recrutement accru des canaux TRP à la surface de la membrane plasmique (Fig. 43) (Morenilla-Palao et al., 2004; Stein et al., 2006; Tian et al., 2019). La sensibilisation de TRPV1 est un mécanisme pivot de la régulation de ce canal qui est nécessaire pour la préservation des tissus contre des stimuli nocifs. Par conséquent, contrôler l'expression de surface de TRPV1 en modulant le routage antérograde (adressage à la membrane plasmique) et rétrograde (endocytose, dégradation ou recyclage) pourrait constituer une stratégie thérapeutique d'avenir.

Les résultats publiés dans la première partie de ma thèse au chapitre 3.2 ont mis en exergue la capacité des inhibiteurs de la calmoduline à moduler l'activité de base du canal TRPV1 directement ou à moduler l'action de la CAPS à entrainer l'ouverture de ce canal. Ces résultats associés à ceux montrant le rôle prépondérant de la Calmoduline dans l'activité de TRPV1 (Lishko et al., 2007; Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004), suggèrent que l'interaction de TRPV1 avec la calmoduline (CaM) représente potentiellement une cible pharmacologique d'intérêt majeur pour des applications thérapeutiques. Toutefois, une étude approfondie, en temps réel et sur cellules vivantes, de la fonctionnalité de cette interaction entre la CaM et TRPV1, et de son impact sur la distribution du canal TRPV1 restait à entreprendre.

A ce jour, les approches qui permettent de suivre la distribution des canaux ioniques comme la mesure de capacitance en patch-clamp et la microscopie confocale (Kanner et al., 2018) ne sont pas adaptés pour des applications de criblage de molécules à haut débit. Récemment, l'avènement de la technique dite du « bystander BRET » a permis d'étudier la dynamique de la distribution des RCPGs dans différents compartiments cellulaires sur cellule vivante et en temps réel. Classiquement, les technologies RET tirent profit du fait que ce phénomène biophysique ne se produit que dans certaines conditions de distance (moins de 10 nm) et d'orientation entre les dipôles donneurs et accepteurs d'énergie (cf chapitre 2.2). Cependant deux protéines fusionnées à des groupements donneur et accepteur qui sont exprimés dans un même compartiment cellulaire sans interagir spécifiquement peuvent se retrouver par hasard dans des conditions de proximité permissive à l'établissement d'un RET. Il en résulte



un signal BRET de base non spécifique, qualifié de « bruit de fond », qui interviendra avec une probabilité d'autant plus importante que (i) l'expression de chaque partenaire est importante, et (ii) que la protéine fusionnée à l'accepteur est exprimée en excès par rapport à la protéine fusionnée au donneur d'énergie. C'est en tirant profit de ce phénomène non spécifique que la technologie BRET « bystander » a été pensée. Elle repose sur l'augmentation de la probabilité des collisions aléatoires entre le donneur bioluminescent et l'accepteur fluorescent par augmentation de la densité dans un compartiment donné des deux acteurs responsables du BRET. De cette manière, le BRET résultant d'une collision aléatoire entre le donneur bioluminescent et l'accepteur fluorescent augmente (Fig. 44) (Lan et al., 2012).



**Figure 44 :** Représentation schématique du principe des sondes BRET bystander. A) En condition normale, les deux acteurs du BRET sont présents dans le compartiment à faible densité ne produisant pas ou peu de collision aléatoire et donc de signaux RET. B) L'augmentation de la densité des deux acteurs du BRET dans le même compartiment augmente la probabilité de collision aléatoire et donc augmente la probabilité de produire un RET qui se répercutera sur les spectres d'émissions des deux acteurs du BRET.

Il est de fait possible de tirer profit du bystander BRET pour étudier la distribution cellulaire d'une cible d'intérêt en mesurant le signal entre une protéine d'intérêt fusionnée à la luciférase et un accepteur compatible fusionné à une séquence peptidique d'adressage à un compartiment spécifique. La co-expression des deux protéines de fusion permettra des mesures de BRET si le récepteur d'intérêt fusionné à la luciférase est co-localisé dans le compartiment

cellulaire où est exprimé de manière l'accepteur fluorescent. Cette technique est maintenant couramment utilisée par les chercheurs académiques et les industriels pharmaceutiques pour des démarches de criblage de médicament à très haut débits ciblant les RCPGs (Namkung et al., 2016).

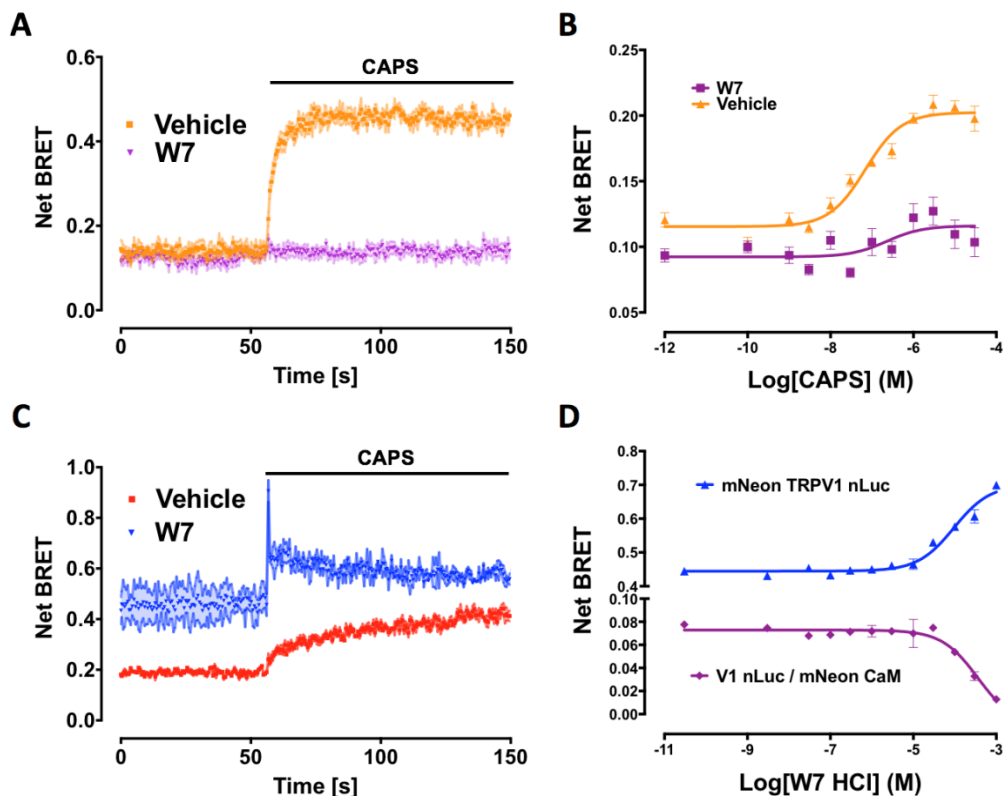
Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons tiré profit des résultats présentés dans le chapitre 3.2, ainsi que des sondes fluorescentes adressées à la membrane plasmique et aux endosomes primaires (Namkung), pour mieux comprendre l'impact de la calmoduline sur la fonction et la distribution des canaux TRPV1. Dans ce but, j'ai élargi le concept de sondes BRET bystander utilisées à l'étude de la distribution du canal TRPV1 entre différents compartiments, ceci à l'état de base et en réponse à différents ligands.

### 3.6.1 Confirmation de l'impact de la calmoduline dans la fonctionnalité du canal TRPV1.

L'analyse multiparamétrique issue du screening de la banque Prestwick de notre premier article montre que, parmi les 59 hits identifiés, 21 composés (soit environ 1/3), étaient caractérisés comme des antagonistes de la calmoduline. Cette conclusion émane principalement de l'utilisation des sondes BRET intra- et inter- moléculaires. Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons utilisé le W7 hydrochloride, un naphthalène sulfonamide couramment utilisé comme antagoniste de la CaM (Bautista-Carbajal et al., 2017; Numazaki et al., 2002). Comme le montre la fig. 45A, et contrairement à ce que laisse penser Numazaki dans son étude (Numazaki et al., 2002), le W7 à forte concentration (100 $\mu$ M) inhibe l'augmentation induite par la CAPS du signal BRET intermoléculaire entre la Calmoduline et TRPV1 au cours du temps. Ce résultat est confirmé en dose réponse par une diminution de l'efficacité de ce composé à induire l'augmentation du signal BRET intermoléculaire entre TRPV1 et la CaM, entraînant au passage un déplacement vers la droite de la puissance de la CAPS (Fig. 45B). Ce résultat confirme que le W7 dispose bien de la capacité à inhiber le couplage entre la CaM et TRPV1. Nous pouvons noter toutefois, un léger effet du W7 sur le signal BRET de base en dose réponse qui laisse penser à un possible effet agoniste inverse. En parallèle, ces mêmes essais ont été réalisés sur la sonde intramoléculaire mesurant les remodelages structuraux du canal TRPV1. Nous avons pu constater que le W7 entraîne une augmentation du signal BRET de cette sonde supérieure à 0,2. Cette augmentation suggère que l'action du W7 entraîne un fort remodelage structural du canal TRPV1, équivalent à celui provoqué par son agoniste de référence, la CAPS. Néanmoins, à la différence de la sonde intermoléculaire, l'effet de la CAPS

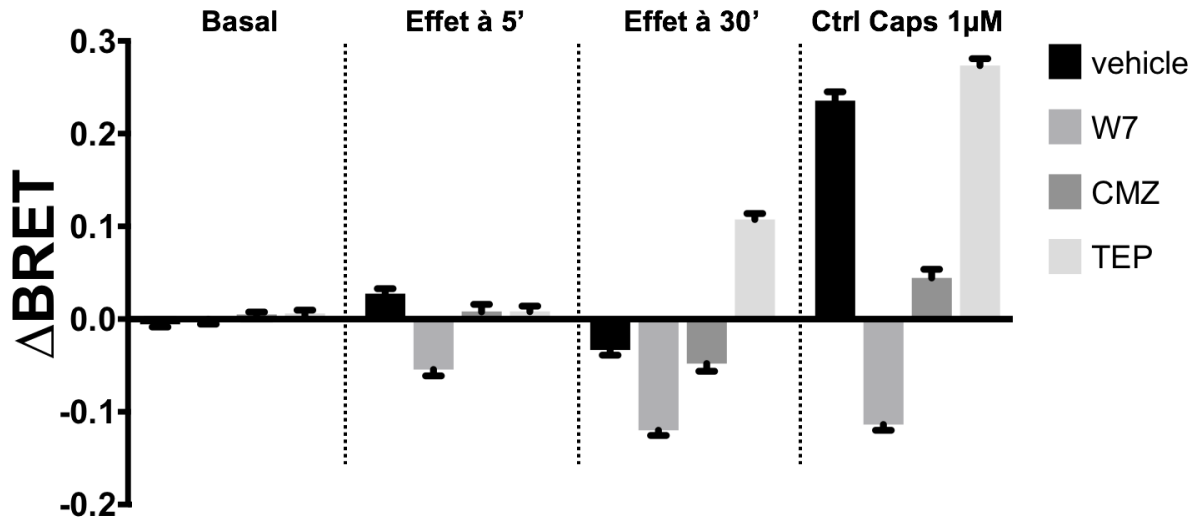
sur la sonde intramoléculaire n'est pas inhibé par le W7 car cet agoniste est toujours capable de moduler le signal BRET à la hausse. L'effet des deux composés est ainsi cumulatif (Fig. 45C).

A la vue de l'effet d'une concentration fixe de W7 sur les signaux BRET de base des sondes intra- et inter- moléculaire, nous avons souhaité étudier l'effet d'une dose réponse de ce composé sur ces deux sondes. Ces expériences nous ont permis de confirmer que le W7 est capable de moduler à la hausse le signal de base de la sonde intra-moléculaire, tandis qu'il module à la baisse le signal de la sonde inter-moléculaire (Fig. 45D). Cette concomitance met en exergue l'impact de l'interaction et/ou du couplage fonctionnel entre la CaM et TRPV1 sur le remodelage structural du canal TRPV1. La structure et la fonction des protéines étant liées, il était important de déterminer si l'interaction CaM/TRPV1 pouvait revêtir un rôle fonctionnel dans l'activité ou la régulation de TRPV1.



**Figure 45 :** Impact de la modulation de l'interaction CaM/TRPV1 par le CaM antagoniste naphthalène sulphonamide (W7 - 100 $\mu$ M) A) en cinétique d'activation par une dose de CAPS de 1 $\mu$ M ( $\pm$ SEM, n=5) et B) en dose réponse de CAPS sur la sonde BRET intermoléculaire ( $\pm$ SEM, n=5). C) effet du W7 à 100 $\mu$ M sur le signal BRET de la sonde TRPV1 intramoléculaire en cinétique d'activation par une dose de CAPS de 1 $\mu$ M ( $\pm$ SEM, n=3) D) confirmation de l'effet basal du W7 en dose réponse sur les sondes BRET intra- et intermoléculaire ( $\pm$ SEM, n=3).

Nous avons alors tenté d'étendre nos analyses à d'autres antagonistes de la CaM, comme le Calmidazolium (CMZ), basé sur un ion imidazole central, et le Tiéthylpérazine (TEP), une phénothiazine issue d'un cluster de composé identifié grâce aux sondes BRET dans l'étude réalisée au chapitre 3.2. Nous avons pu montrer que ces composés ne produisaient leur effet maximal qu'après une période d'incubation d'au moins 30 minutes (Fig. 46). Ce constat est également valable pour le W7 lorsqu'il est utilisé à plus faible concentration (10 $\mu$ M). Nous avons ainsi dans un premier temps, confirmé l'effet agoniste inverse du W7 sur le signal de base de la sonde intermoléculaire et son effet antagoniste plein de la réponse à un EC80 de CAPS (1 $\mu$ M) (Fig. 46). A la différence du W7, l'effet du CMZ sur le BRET de base de la sonde intermoléculaire n'est pas significatif par rapport au contrôle (vehicle). Il antagonise par contre la réponse à la CAPS. De façon surprenante, le TEP présente un profil complètement inversé, en provoquant une augmentation significative du signal BRET de base de la sonde intermoléculaire à 30 min équivalent à 40% de celui de la CAPS (1 $\mu$ M). De plus, on observe une potentialisation de la réponse de la sonde intermoléculaire à la CAPS, alors que nous attendions une antagonisation. Ce profil suggère que le TEP est un modulateur allostérique positif (PAM) de la CAPS. Malheureusement, dans nos conditions expérimentales, le canal est activé à hauteur de 80% de son effet maximal, ce qui ne laisse que 20% marge pour apprécier l'effet du TEP. D'autres essais devront être réalisés pour évaluer la reproductibilité et confirmer ces résultats préliminaires. L'aspect marquant de ce résultat est la dichotomie observée des profils des réponses de différents antagonistes de la CaM testés, qui montrent que les composés W7 et CMZ antagonisent l'interaction de base entre la CaM et TRPV1, tandis que le TEP semble la potentialiser. De plus, la temporalité de la cinétique observée corrèle avec des mécanismes moléculaires mettant en œuvre des phénomènes comme une internalisation des récepteurs membranaires.



**Figure 46 :** Résultats préliminaires montrant la caractérisation de l'effet des antagonistes de la Calmoduline W7 (10μM), CMZ (10μM) et TEP (10μM) sur la sonde BRET intermoléculaire (TRPV1-nLuc/mNeonG-CaM) en  $\Delta$ BRET  $\pm$  SEM.

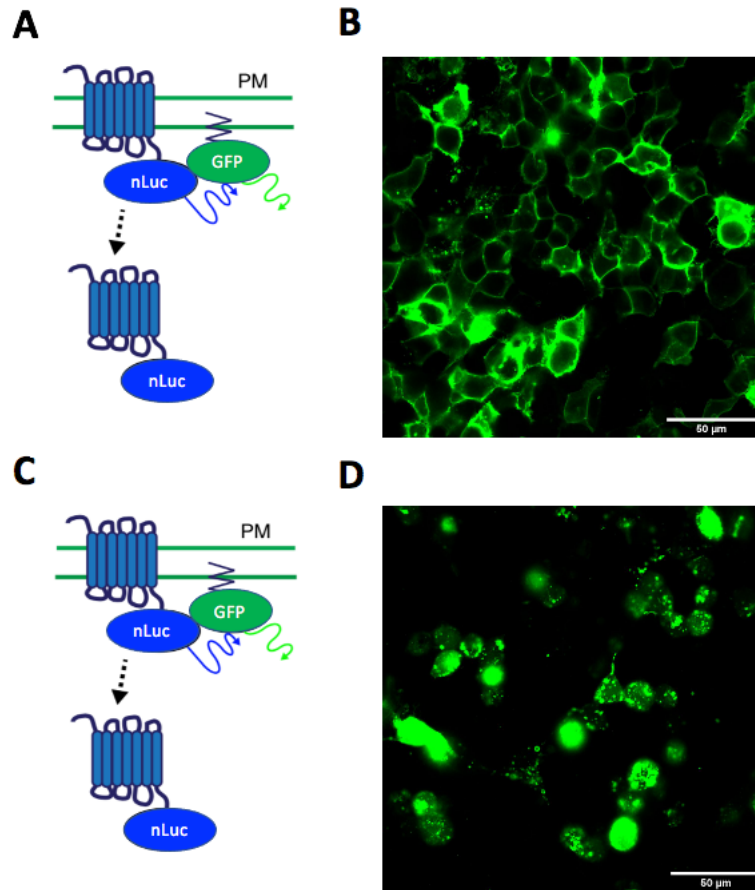
### 3.6.2 Application de la technique de « bystander BRET » à l'étude de la distribution de TRPV1.

Sur la base des études et des hypothèses énumérées précédemment, nous avons utilisé les séquences des sondes BRET « bystander » publiées dans l'article de Namkung 2016, pour construire de nouvelles sondes nanoBRET bystander en utilisant la nanoLuc comme donneur d'énergie et la mNeonGreen comme accepteur. En tirant profit du phénomène de bystander BRET, nous espérons pouvoir mesurer quantitativement la distribution cellulaire du canal TRPV1 en l'étiquetant avec le donneur bioluminescent, tandis que l'accepteur fluorescent est ancré dans un compartiment cellulaire précis comme la membrane plasmique ou dans les endomembranes à l'aide d'un peptide d'adressage spécifique.

Nous avons ainsi construit différents tests BRET en réutilisant la construction TRPV1-nLuc et en fusionnant la mNeonGreen en Cter de la séquence polybasique de la boîte de prénylation CAAX de KRAS ((Wright et al., 2021), « mNeonG-CAAX »), et de la séquence du domaine FYVE de l'endofins ((Guetta et al., 2010) « mNeonG-FYVE »), pour marquer respectivement la membrane plasmique « PM » et les endosomes précoces (ou early endosome en anglais, ci-après notés « EE ») (Fig. 47A et C) (Namkung et al., 2016).

Une fois construites, nous avons ensuite confirmé que ces sondes étaient correctement adressées aux compartiments d'intérêts grâce à la microscopie confocale. Comme le confirme les figures 47B et 47D, la protéine mNeonG-CAAX est localisée comme prévu à la PM

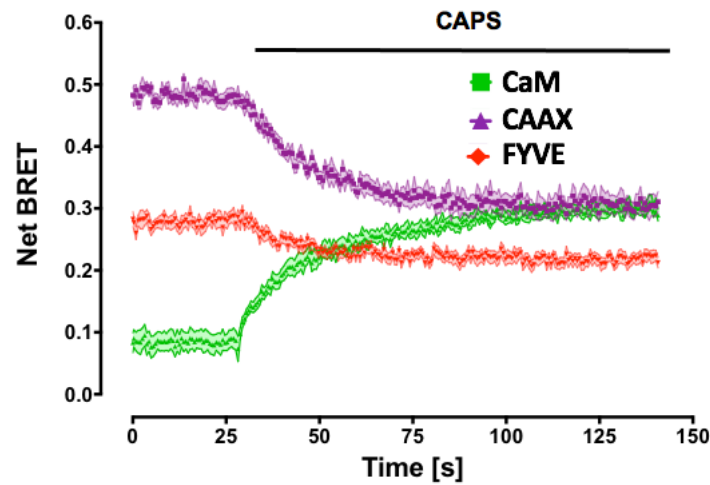
lorsqu'elle est exprimée de manière transitoire dans les cellules HEK293T (Fig. 47B), tandis que la protéine mNeonG-FYVE est sélectivement localisée dans les vésicules intracellulaires (Fig. 47D).



**Figure 47 :** Contrôle de l’adressage des différentes sondes BRET bystander. A) Représentation schématique des sondes BRET bystander mNeonG-CAAX marquant la membrane plasmique, B) Confirmation de la distribution cellulaire de mNeonG-CAAX observée en microscopie confocale. C) Représentation schématique des sondes BRET bystander mNeonG-FYVE, D) Confirmation de la distribution cellulaire de mNeonG-FYVE observée en microscopie confocale. Les schémas des essais BRET ont été reproduits à partir de (Namkung et al., 2016) où le principe est illustré à l’aide d’un RCPG. (La microscopie confocale a été réalisée par Solène Barbeau, doctorante dans l’équipe de Thomas Ducret)

Fort de ces résultats, nous avons procédé à des mesures des signaux BRET en cinétique, suite à l’ajout de la CAPS, au sein des cellules HEK293T cotransfectées avec TRPV1-nanoLuc et soit mNeonG-CAAX (adressé à la MP), soit mNeonG-FYVE (adressé aux endosomes

précoce). Les cinétiques obtenues ont été comparées à celles mesurées avec la sonde intermoléculaire (TRPV1-Luc/mNeon-CaM) (Fig. 48).

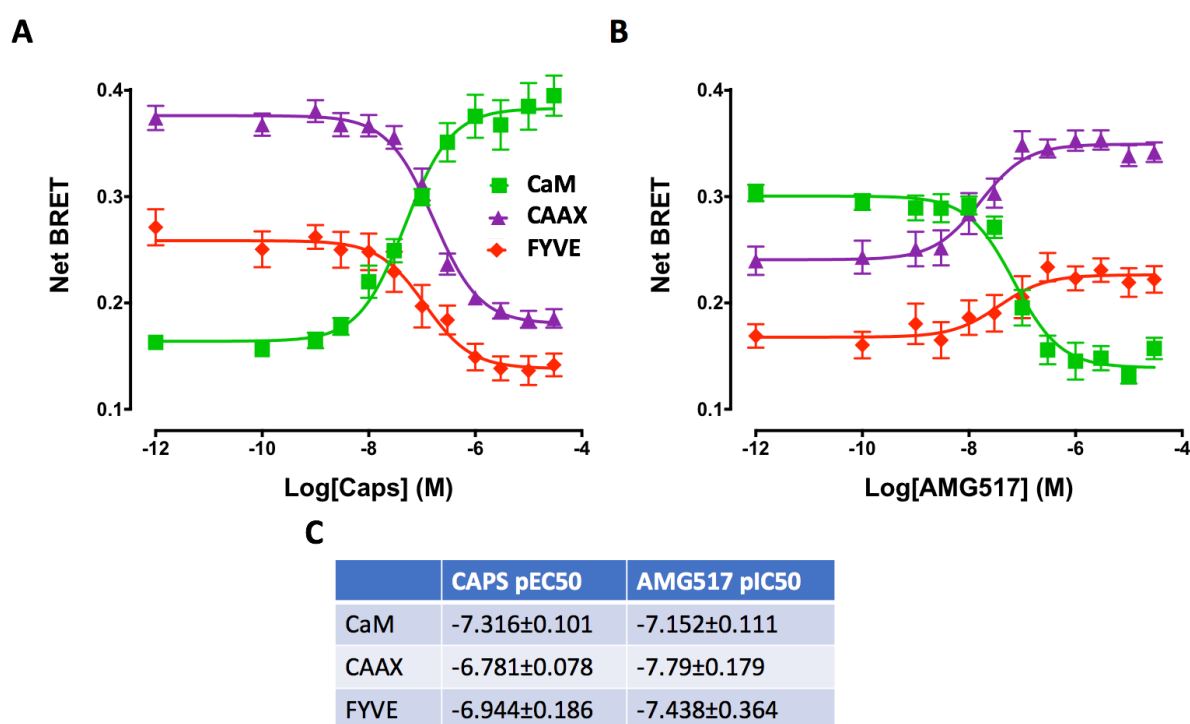


**Figure 48 :** Cinétiques montrant l'évolution du signal BRET des sondes bystander CAAX (PM) ( $n=6 \pm \text{SEM}$ ) et FYVE (EE) ( $n=6 \pm \text{SEM}$ ) suite à l'activation de TRPV1 par la CAPS. Les cinétiques sont comparées à celle obtenue avec le test intermoléculaire TRPV1/Calmoduline ( $n=3 \pm \text{SEM}$ ).

Dans les deux cas, les signaux BRET de base des sondes bystander, diminuent en suivant une cinétique de premier ordre après exposition à la CAPS  $1\mu\text{M}$ , avec des  $\Delta\text{BRET}$  de 0,16 pour CAAX et 0,07 pour FYVE (Fig. 48). Ces résultats suggèrent qu'en réponse à un stimulus activateur (CAPS), le pool de canaux TRPV1 quitte rapidement les compartiments de la membrane plasmique et des endosomes précoces. Bien que partiel, ces résultats suggèrent une endocytose de TRPV1 en réponse à la CAPS, ce qui concorde avec d'autres études (Sanz-Salvador et al., 2012), et met en exergue la plus-value de ces sondes pour étudier la distribution de canaux comme TRPV1. De façon concomitante, la sonde intermoléculaire TRPV1-nLuc / mNeonG-CaM montre une augmentation du signal BRET en réponse à la CAPS, synonyme soit d'un changement conformationnel du complexe préassemblé soit d'une modification dans l'équilibre d'association/dissociation entre ces deux partenaires. Des études passées ont déjà montré un lien direct entre l'association de la CaM et l'internalisation des récepteurs membranaires (Lishko et al., 2007; Wu et al., 2009). Le lien spatio-temporel de ces deux cinétiques pousse à croire que ces deux événements sont fonctionnellement liés.

Les résultats ci-dessus mentionnés ont ensuite été confirmés par des expériences de dose réponse en présence de concentration croissante de CAPS, mais également en présence

d'AMG517, un antagoniste spécifique de TRPV1 inhibiteur de l'effet de la CAPS (Fig. 49). Le profil sigmoïdal typique de la dose réponse de CAPS et d'AMG517 confirme que l'effet observé en cinétique est dose dépendant. La CAPS présente ainsi des pEC50 mesurés de  $6.78 \pm 0.078$  pour CAAX et  $6.94 \pm 0.186$  pour FYVE, cohérentes avec les valeurs précédemment obtenues en BRET ou avec des tests conventionnels. L'effet sélectif des composés ainsi testé est confirmé par la nature compétitive de l'effet de l'AMG517 sur une dose correspondant à un EC80 de CAPS (500nM), conformément ce que nous avons montré précédemment avec les sondes intra- et intermoléculaires (Chappe et al., 2021).



**Figure 49 :** A) Courbes concentration-réponse des sondes BRET TRPV1/ CaM, CAAX et FYVE induits par l'agoniste CAPS (n=4). B) Courbes concentration-réponse de la capacité de l'AMG517 à inhiber les changements BRET induits par la CAPS (500 nM) (n=4). C) Table résumant les pEC/IC50 de CAPS et d'AMG517 obtenus avec les différentes sondes BRET.

L'internalisation de TRPV1 induite par la CAPS et son antagonisation d'une manière dépendante de la dose et du temps, confirment la capacité de nos sondes BRET bystander à mesurer de façon qualitative et quantitative la distribution du canal TRPV1. L'émergence de ce nouvel outil pour étudier l'internalisation de TRPV1 représente potentiellement un outil puissant pour de futures campagnes de criblage de médicaments. Bien que validé expérimentalement en 96 puits, l'utilisation de ces sondes à l'échelle industrielle nécessitera



une miniaturisation au format de plaque 384 puits tout en maintenant des paramètres de reproductibilité et de robustesse (comme un Z factor supérieur à 0,5). De plus, il serait intéressant d'exemplifier ce concept en élargissant le panel de sondes disponibles permettant l'étude de l'adressage des canaux dans d'autres compartiments.

### 3.6.3 Influence du calcium extracellulaire sur l'internalisation de TRPV1 caps dépendante

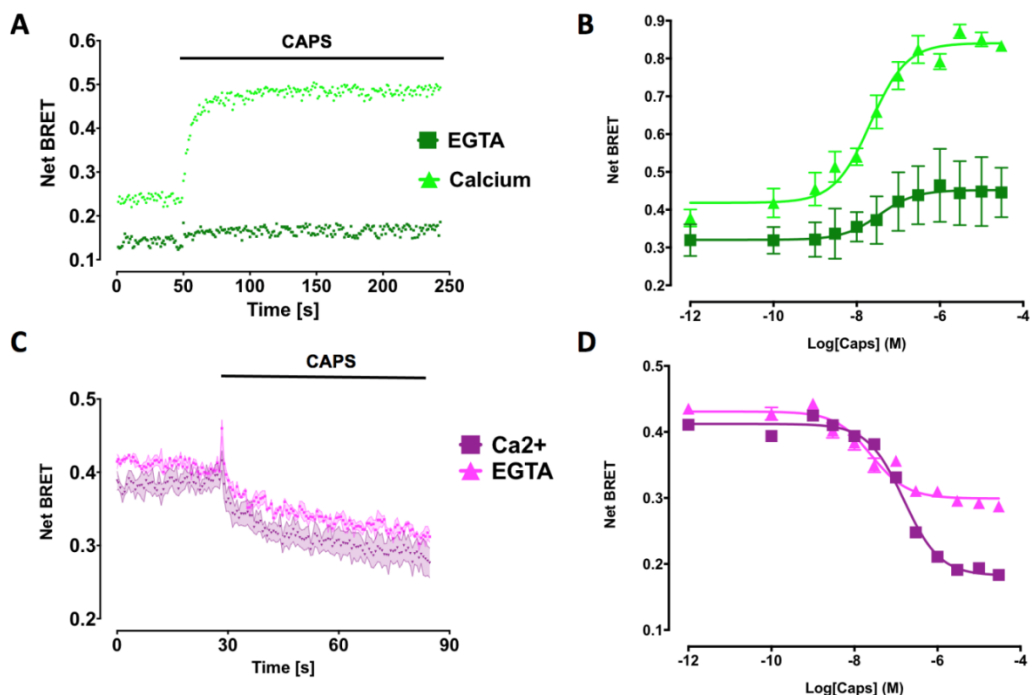
Le lien fonctionnel du couplage de la CaM avec les récepteurs membranaires et leur endocytose ont déjà pu être identifiés au niveau des synapses (Wu et al., 2009; Yao and Sakaba, 2012). De notre côté, nos résultats montrent que la CAPS entraîne un départ de TRPV1 de la membrane plasmique de manière concomitante avec une augmentation du signal BRET entre TRPV1 et la CaM. Ce résultat et les nombreuses études associées laissent penser que ces deux mécanismes sont liés. Parmi ces études, nombre d'entre elles mettent en avant le lien direct entre l'endocytose du canal TRPV1, le passage du calcium par le pore du canal TRPV1, et son interaction avec la CaM (Lishko et al., 2007).

Afin de préciser le rôle fonctionnel de l'interaction TRPV1/CaM- $\text{Ca}^{2+}$  dans le départ du canal de la membrane plasmique suite à son activation dans le mode chimique, nous avons étudié l'impact du flux calcique transitant par TRPV1 en réponse à la CAPS sur l'endocytose de ce canal. Dans cette optique, nous avons réalisé des mesures de BRET en cinétique et en dose réponse à l'aide des sondes bystander. Ces expériences ont été réalisées dans deux tampons salins différents, le premier contenant une concentration physiologique de calcium (2mM), et l'autre étant dépourvue de calcium avec 2mM d'EGTA.

Les signaux BRET mesurés dans ces essais en cinétique et en dose réponse, montrent que l'absence de calcium extracellulaire entraîne la diminution du BRET de base de la sonde intermoléculaire TRPV1/CaM (Fig. 50A), ainsi qu'une diminution de l'efficacité de la CAPS à entraîner l'augmentation du signal obtenu (Fig. 50B). Ces résultats confirment les observations précédentes de notre laboratoire (Ruigrok et al., 2017). L'interaction CaM/TRPV1 serait dépendante du flux calcique transitant par TRPV1. Néanmoins le profil sigmoïdal de la dose réponse de la sonde intermoléculaire réalisé en absence de calcium extracellulaire (Fig. 50B), suggère que la calmoduline reste associée à TRPV1.

En parallèle, nous avons réalisé ces mêmes expériences en absence de calcium pour évaluer son impact sur l'endocytose de TRPV1 dans les cellules HEK293T transfectées avec TRPV1-nLuc et mNeonG-CAAX. Malgré l'absence de calcium dans le milieu extracellulaire, la CAPS dispose toujours de la capacité à entraîner l'internalisation du canal TRPV1 (Fig. 50C).

L'absence de calcium extracellulaire entraine cependant une diminution de 50% de l'efficacité de l'effet d'internalisation de ce canal en réponse à une forte concentration de CAPS (Fig. 50D). A noter, que cet effet n'est pas observé en cinétique, mais que ce phénomène semble inhérent au temps d'incubation de la CAPS. En ce sens, il faudrait refaire l'expérience présentée en figure C avec une cinétique réalisée sur une durée d'environ 5 min pour corrélérer à la temporalité de la dose réponse. Si nous associons la perte partielle d'interaction CaM/TRPV1 (Fig. 50 A et B) en absence de calcium à l'effet d'endocytose observé dans les mêmes conditions, ces résultats suggèrent (i) que l'internalisation du canal TRPV1 en réponse à un stimulus agoniste n'est que partiellement dépendant du calcium transitant par TRPV1, et (ii) qu'il existe des voies d'endocytose du canal TRPV1 qui sont  $Ca^{2+}$ /CaM indépendantes. Si ces résultats préliminaires étaient confirmés par des expériences ultérieures, ceux-ci indiqueraient alors que l'internalisation du canal TRPV1 (suite à l'action de la CAPS) et l'interaction de TRPV1 avec son partenaire CaM ne seraient pas fonctionnellement liées. Néanmoins, du fait de la perte partielle d'interaction CaM/TRPV1 mis en exergue dans la figure 50B, il sera nécessaire d'évaluer directement l'impact de l'interaction CaM/TRPV1 sur la distribution de TRPV1.



**Figure 50 :** Effet de l'absence de Calcium extracellulaire sur A) la cinétique (n=1) et B) la dose réponse (n=2) de la sonde BRET TRPV1/CaM en réponse à l'agoniste CAPS (1 $\mu$ M). La même expérience est réalisée sur C) la cinétique (n=4) et D) la dose réponse (n=1) de la sonde CAAX en réponse à l'agoniste CAPS mesuré dans des cellules HEK293T.

### 3.6.4 Étude de l'impact de l'interaction calmoduline/TRPV1 sur la distribution du canal à l'état de base et suite à son activation

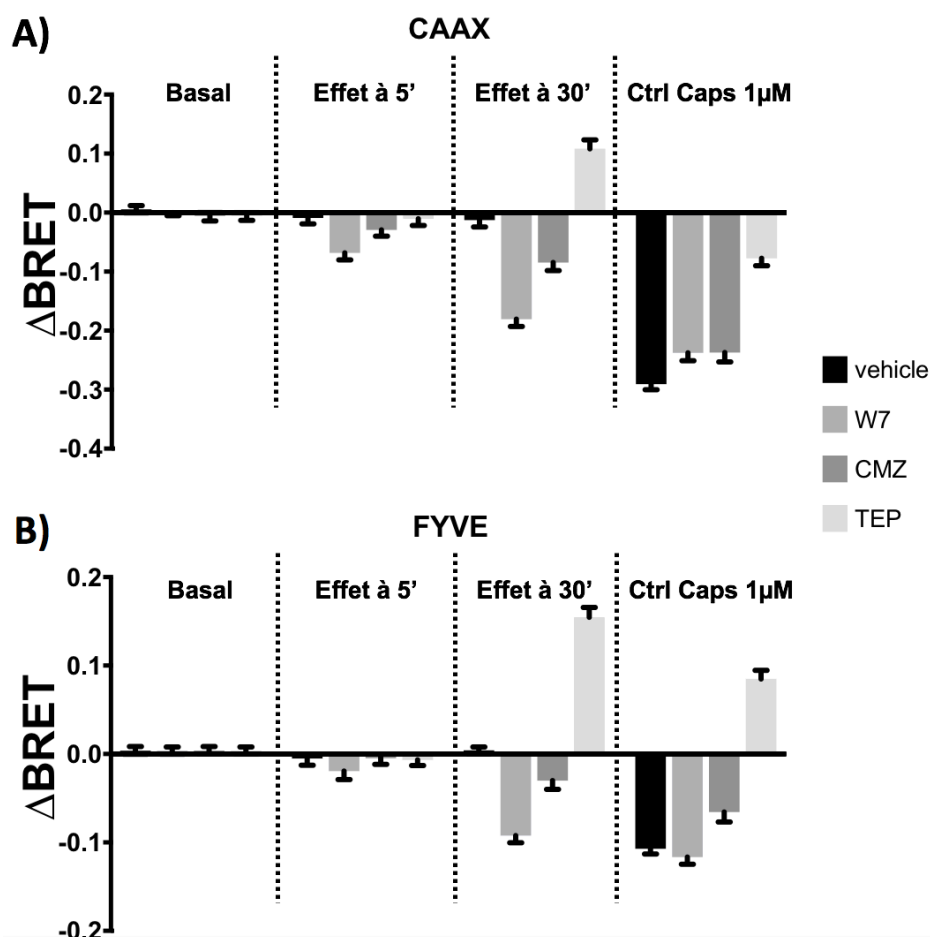
Pour évaluer l'impact direct de la calmoduline sur la distribution de TRPV1, nous avons incubé des cellules HEK293T co-exprimant TRPV1-nLuc avec mNeonG-CAAX ou mNeonG-FYVE, en présence des différents antagonistes de la CaM caractérisés précédemment (W7, CMZ et TEP) (Fig. 46). De la même manière que pour la sonde intermoléculaire, nous montrons que ces composés ne révèlent pleinement leur effet qu'après un temps d'incubation d'au moins 30 minutes (Fig. 51). À ce temps d'incubation, nous observons que selon le composé étudié, les profils des effets obtenus sont très différents. Le W7 diminue significativement les signaux BRET de base des deux sondes CAAX et FYVE, entraînant respectivement une variation des signaux BRET de -0,18 et -0,1 (Fig. 51). Ces résultats semblent indiquer qu'en réponse au W7, les canaux TRPV1 quittent la membrane plasmique et les endosomes précoces. Ce raisonnement est valable également pour la CMZ bien que l'amplitude de l'effet soit moins prononcée. Malgré un prétraitement avec le W7 et le CMZ, l'ajout extemporané de 1 $\mu$ M de CAPS entraîne toujours une diminution des signaux de ces sondes. L'endocytose et le départ du canal des endosomes primaires en réponse à la CAPS ne semble donc pas être inhibé par la présence des CaM antagonistes. L'effet du composé tiéthylpérazine est plus surprenant. A la différence des deux autres composés qui diminuent les signaux BRET, le TEP qui module à la hausse l'interaction CaM/TRPV1 (Fig. 46), entraîne une augmentation des signaux BRET de base des sondes bystander (Fig. 51). Dans ce cas précis, le TEP entrainerait une augmentation de l'adressage du canal TRPV1 à ces deux compartiments. De plus, l'effet de ce composé prime sur l'effet induit par un EC80 de CAPS.

Au regard de nos observations préliminaires obtenus avec les sondes intermoléculaires en présence de ces antagonistes (Fig. 46), les résultats des sondes bystander confirment le rôle prépondérant de l'interaction CaM/TRPV1 dans la rétention de ces canaux à la membrane plasmique et dans les endosomes à l'état de base.

A l'inverse, le départ de TRPV1 de ces compartiments en réponse à la CAPS malgré l'antagonisation des interactions CaM/TRPV1 montre que l'association de ces deux protéines n'est probablement pas indispensable à l'internalisation de TRPV1 suite à son activation par la CAPS. En ce sens, la CaM est d'avantage un modulateur qui permettrait l'ancrage de TRPV1 à la membrane plasmique. Une modulation structurale ou une perte d'interaction entre ces deux protéines par un agoniste spécifique de TRPV1 ou de la calmoduline entrainerait, de fait,

l'endocytose de TRPV1. L'endocytose de TRPV1 en réponse à un stimulus activateur pourrait donc être expliquée par deux mécanismes distincts, l'un impliquant la CaM et l'autre non.

L'autre aspect innovant identifié dans ces résultats concerne le composé TEP. Rappelons ici que ce composé fut identifié dans le crible de la banque Prestwick réalisé au chapitre 2.3 grâce aux sondes BRET intra- et inter- moléculaire, avec un effet antagoniste de 46 et 39% respectivement (Chappe *et al*, 2021). Les résultats présentés dans ce chapitre renforcent la plus-value de l'approche BRET pour identifier de nouveaux composés ciblant les canaux et ayant des propriétés fonctionnelles difficiles à étudier avec les approches classiques comme le patch-clamp ou les sondes à fluorescence. Grâce à une caractérisation plus poussée, nous avons pu montrer que le TEP se comporte davantage comme un agoniste du couplage entre la CaM et TRPV1 (Fig. 46), ce qui entraîne l'inhibition de l'effet de la CAPS sur l'internalisation (Fig. 51).



**Figure 51 :** Caractérisation de l'effet des calmodulines antagonistes W7, CMZ et TEP sur les sondes BRET bystander A) CAAX et B) FYVE.

### 3.6.5 Conclusion de l'étude préliminaire visant à évaluer l'impact de l'interaction calmoduline/TRPV1 sur la distribution cellulaire du canal

Grâce à la diversité des composés étudiés, nous montrons que nous avons potentiellement la capacité de contrôler pharmacologiquement à la hausse comme à la baisse la densité de canaux TRPV1 à la membrane plasmique et dans les endosomes en modulant le couplage entre TRPV1 et la CaM, soit par promotion de l'association entre ces deux partenaires, soit par la modulation de la conformation du complexe TRPV1/CaM. Dans les deux cas, de nouvelles opportunités pharmacologiques s'ouvrent pour construire des thérapies contre des pathologies mettant en œuvre TRPV1. Néanmoins, les résultats obtenus avec les composés W7, CMZ et TEP doivent être pondérés par leur manque de spécificité. Ces composés ne ciblant pas spécifiquement l'interaction entre TRPV1 et la CaM, tous les résultats observés peuvent potentiellement être issus de la modulation d'une cible connexe à TRPV1. En ce sens, construire de nouveaux composés spécifiques de l'interaction CaM/TRPV1 est une perspective alléchante dans le but de révéler pleinement l'effet de l'impact direct de l'interaction CaM/TRPV1 sur la distribution de ce canal. Des études préliminaires qui vont dans ce sens sont en cours dans l'équipe de Yann Percherancier. A terme, les conclusions et nouveaux composés issus de cette étude réalisée avec une technologie émergente devront être évalués par une étude fonctionnelle et pharmacologique *in vivo* sur des modèles animaux pour révéler les éventuels bénéfices d'une telle approche.

# DISCUSSION

Au cours de ce projet, nous avons pu apprécier l'étendue des possibilités des sondes BRET pour l'étude de la fonction et de la pharmacologie des canaux ioniques. Pour certains aspects, elles présentent de nombreux avantages par rapport aux techniques conventionnelles. Pour d'autres certaines difficultés persistent, notamment pour l'étude des canaux purement voltage-dépendants qui disposent d'une très faible caractérisation pharmacologique. En effet, les VGIC comme les canaux NaV, CaV et KV sont très majoritairement sous le contrôle du potentiel de membrane et oscillent très rapidement entre 2 ou 3 états conformationnels différents (ouvert, fermé et inactivé), avec des temps de transition de l'ordre de quelques millisecondes. L'étude de ces canaux requiert de fait, un appareillage de mesure en temps réel hautement sensible et ultra-rapide avec une lecture simultanée des signaux émis par le donneur et l'accepteur BRET pour atteindre cette vitesse d'acquisition. Malgré cette solution, plusieurs problèmes techniques persistent. Pour activer ces canaux, nous utilisons différentes options comme (i) la dépolarisation par augmentation de la concentration en potassium extracellulaire, ou (ii) l'activation par certains chimiques agonistes, comme la deltaméthrine pour NaV1.8. Ces approches impliquent des compromis. Par exemple, la dépolarisation active notre canal d'intérêt, mais ce mode d'activation n'est pas spécifique. De plus, que ce soit par la dépolarisation ou via un ligand chimique, l'activation de ces canaux s'effectue de façon unidirectionnelle et non réversible, ce qui limite les applications de criblage pharmacologique des VGICs « purs ».

Cet aspect est très problématique pour l'identification de certains composés comme le mibefradil spécifique des canaux CaV, ou la lidocaïne et la tétracaïne pour les canaux NaV, qui disposent d'une affinité optimale pour l'état inactivé de ces canaux. Ils ne se lient donc pas, ou très peu, aux deux autres états fermé et ouvert. Pour observer un effet optimal de ces composés, il est donc nécessaire de faire « cycler » le canal entre ces différents états, comme c'est le cas lorsqu'il se situe dans son contexte physiologique dans un neurone ou une cellule cardiaque. Un contrôle précis du potentiel de membrane est alors nécessaire pour permettre de révéler l'effet optimal des ligands. En l'état, notre approche BRET ne permet pas un contrôle précis du potentiel de membrane et le cyclage efficace des canaux entre leurs différents états conformationnels. De fait, la technique à privilégier pour étudier ces canaux reste le patch-

clamp qui présente à la fois l'atout du contrôle du voltage membranaire et du temps d'intégration de la donnée en deçà de la dizaine de milliseconde.

Bien que notre approche BRET ne permette pas un contrôle précis du potentiel de membrane et le cyclage des canaux entre leurs différents états, plusieurs alternatives sont possibles :

1. La première consiste à coupler un appareillage de contrôle du potentiel de membrane comme un patch-clamp avec un système de spectrophotométrie permettant les mesures BRET, ce qui donnerait la technique du « Patch BRET ». Des approches similaires existent en couplant des mesures de sondes fluorescentes ou des sondes FRET avec un patch-clamp (Kusch and Zifarelli, 2014; Trudeau and Zagotta, 2004).
2. La deuxième, serait de tirer profit de lignées cellulaire recombinantes exprimant de manière stables et inductibles des canaux qui disposent de la capacité d'osciller entre différents potentiels de membrane de façon spontanée ou de manière contrôlée par optogénétique.
3. Une autre solution serait de construire des lignées stables inductibles reposant sur des cellules pluripotentes via un système CRISPR (pour faire du knock-in de notre système BRET), en utilisant des cellules souches pluripotentes induites dits « iPSC » neuronales ou cardiaques. Une fois différenciées, ces cellules ont la capacité de déclencher des potentiels d'actions spontanées et synchronisées qui permettent une oscillation rapide et physiologique du potentiel de la membrane de la cellule. On peut ensuite activer la production du gène codant pour notre sonde BRET et observer l'effet de l'oscillation sur le signal BRET de nos sondes et l'effet des ligands sur l'amplitude de ces signaux.

Ces approches fondées sur les cellules humaines, telles que la culture de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ou de cellules primaires à partir de biopsies de patients, représentent une autre réelle opportunité pour comprendre certaines canalopathies. Les sondes BRET ciblant les canaux ioniques peuvent ainsi contribuer à identifier correctement les voies de signalisation impliquées dans ces pathologies particulières. Ces sondes permettront à terme de procéder à un criblage à haut débit de médicaments, ce qui devrait contribuer à développer des thérapies plus ciblées. De plus, l'utilisation d'un même lot de matériel biologique, comme des lignées cellulaires stables exprimant les sondes BRET est idéale pour le criblage de médicaments.

A notre connaissance, il n'existe pas de sonde codée génétiquement suffisamment résolutive pour étudier le flux de sodium et donc la fonctionnalité des canaux sodiques comme les NaV. Pour une étude BRET de ces canaux, trois alternatives peuvent se présenter : (i)

trouver un senseur à sodium avec un  $K_d$  au moins de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{M}$  et une spécificité suffisante pour distinguer les ions  $\text{Na}^+$  des ions  $\text{K}^+$ , (ii) construire une sonde qui permette de suivre le potentiel de membrane dans le nano-environnement du canal en prenant le pari que cette sonde ne sera pas « contaminée » par d'autres canaux endogènes voltage-dépendants, (iii) tirer profit de la perméabilité relative des canaux NaV pour le calcium, dont le ratio de perméabilité peut être modifié en faveur du calcium par la mutation des résidus DEKA du filtre de sélectivité. De cette manière, nous pouvons générer des canaux NaV perméables au calcium comme par exemple SoCal5 qui conserve les propriétés pharmacologiques du canal sauvage et dont on peut suivre l'activité en taggant une sonde BRET calflux dans son nanoenvironnement (Zhang et al., 2015).

Le biais de sélectivité des canaux ioniques sur les différents flux d'ions, mis en lumière grâce aux sondes BRET est le second point majeur et innovant de ce projet. L'émergence d'un tel concept, ouvre énormément de portes pour faire évoluer notre compréhension de la physiopathologie et de la pharmacologie des canaux ioniques. L'étude approfondie de ce mécanisme pourrait être un moyen d'éclaircir des fonctions encore insoupçonnées des canaux, voire être une opportunité thérapeutique pour traiter de nombreuses pathologies. Dans notre cas, je pense aux mécanismes moléculaires de la douleur chronique, de la thermo sensation et de la thermorégulation régit par TRPV1. Par exemple, certaines fonctions moléculaires comme la tachyphylaxie et la désensibilisation de TRPV1 ou d'autres études ont déjà pu montrer clairement que les deux flux d'ions entrant et sortant ne désensibilisent pas de la même manière (Lau et al., 2012; Valente et al., 2008). Des expériences préliminaires ont été réalisées en ce sens et semblent prendre cette direction.

A cours terme, nous envisageons d'élargir le concept de sélectivité ionique biaisée des canaux comme nous avons pu déjà le faire pour les canaux P2X avec l'équipe de Vincent Compan. Une optique intéressante serait de l'exemplifier sur d'autres canaux. En ce sens, nous avons déjà construits de nouvelles sondes pour étudier ce phénomène sur TRPV4 et Trek1. Ce dernier a déjà montré des propriétés similaires dans d'autres études (Chatelain et al., 2012; Chen et al., 2014). En capitalisant sur ce concept et sur les résultats d'autres études, nous devrions être capable d'identifier des nouveaux composés qui disposent de la capacité d'inhiber ou de favoriser sélectivement un flux d'ion par rapport à un autre. Une opportunité intéressante serait de réaliser en cinétique un criblage de molécules d'une banque de composés avec nos sondes afin de mieux apprécier l'aspect dynamique de cette sélectivité (Chung et al., 2008).



# PERSPECTIVES

Les perspectives des sondes BRET ciblant les canaux ioniques utilisées et développées dans ma thèse, laquelle s'inscrit dans le contexte plus large du projet ANR CanalBRET sont excellentes. Bien que certaines difficultés persistent, aucunes ne sont pour le moment insurmontables. Ces sondes ont permis d'ajouter plusieurs cordes à l'arc des techniques de criblages à haut débit des médicaments ciblant les canaux ioniques.

1. Les sondes intramoléculaires permettent de suivre les remodelages structuraux des canaux en réponse au ligand.
2. Avec les sondes intermoléculaires, nous pouvons suivre les interactions des canaux avec leurs partenaires fonctionnels.
3. Grâce aux sondes de « seconde génération », nous pouvons mesurer spécifiquement la quantité intracellulaire de différents ions sous le canal et suivre ainsi la fonctionnalité des canaux en réponse aux ligands.
4. Et avec les sondes « bystander », nous disposons d'un test de suivi de la distribution des canaux entre les différents compartiments en réponse aux ligands.

Toutes ces sondes génèrent une quantité de données de très haute qualité, avec une robustesse et une résolution comparable à celles proposées par les techniques conventionnelles mais pour un coût très compétitif. Les applications sont nombreuses aussi bien dans l'industrie pharmaceutique que pour faire de la recherche fondamentale sur la physiologie des canaux. Elles ont déjà permis des avancés révolutionnaires dans le domaine de la pharmacologie des canaux ioniques. Nous pensons qu'à terme, la technologie CanalBRET a tous les atouts pour s'imposer aux coté des autres technologies d'étude des canaux ioniques autant dans la recherche académique que pour des applications de recherche de médicament en industrie pharmaceutique.

## Bibliographie

- Abbas, M.A., 2020. Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chemico-Biological Interactions* 330, 109178. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109178>
- Ahern, G.P., 2005. Extracellular Cations Sensitize and Gate Capsaicin Receptor TRPV1 Modulating Pain Signaling. *Journal of Neuroscience* 25, 5109–5116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0237-05.2005>
- Anand, P., Bley, K., 2011. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia* 107, 490–502. <https://doi.org/10.1093/bja/aer260>
- Ayoub, M.A., 2016. Resonance Energy Transfer-Based Approaches to Study GPCRs. *Methods Cell Biol* 132, 255–92. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.10.008>
- Baez, D., Raddatz, N., Ferreira, G., Gonzalez, C., Latorre, R., 2014. Gating of Thermally Activated Channels, in: *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 51–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800181-3.00003-8>
- Bajar, B., Wang, E., Zhang, S., Lin, M., Chu, J., 2016. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors* 16, 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>
- Barnett, L.M., Hughes, T.E., Drobizhev, M., 2017. Deciphering the molecular mechanism responsible for GCaMP6m's Ca<sup>2+</sup>-dependent change in fluorescence. *PLoS ONE* 12, e0170934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170934>
- Bautista-Carbajal, P., Soto-Acosta, R., Angel-Ambrocio, A.H., Cervantes-Salazar, M., Loranca-Vega, C.I., Herrera-Martínez, M., del Angel, R.M., 2017. The calmodulin antagonist W-7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) inhibits DENV infection in Huh-7 cells. *Virology* 501, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.004>
- Baxter, D.F., Kirk, M., Garcia, A.F., Raimondi, A., Holmqvist, M.H., Flint, K.K., Bojanic, D., Distefano, P.S., Curtis, R., Xie, Y., 2002. A Novel Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Dye Improves Cell-Based Assays for Ion Channels. *J Biomol Screen* 7, 79–85. <https://doi.org/10.1177/108705710200700110>
- Beacham, D.W., Blackmer, T., O' Grady, M., Hanson, G.T., 2010. Cell-Based Potassium Ion Channel Screening Using the FluxOR™ Assay. *J Biomol Screen* 15, 441–446. <https://doi.org/10.1177/1087057109359807>
- Bell, D.C., Dallas, M.L., 2018. Using automated patch clamp electrophysiology platforms in pain-related ion channel research: insights from industry and academia: Automated electrophysiology in pain therapeutics. *British Journal of Pharmacology* 175, 2312–2321. <https://doi.org/10.1111/bph.13916>
- Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M.A., Gadella, T.W.J., 2017. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat Methods* 14, 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
- Bischof, H., Rehberg, M., Stryeck, S., Artinger, K., Eroglu, E., Waldeck-Weiermair, M., Gottschalk, B., Rost, R., Deak, A.T., Niedrist, T., Vujic, N., Lindermuth, H., Prassl, R., Pelzmann, B., Groschner, K., Kratky, D., Eller, K., Rosenkranz, A.R., Madl, T., Plesnila, N., Graier, W.F., Malli, R., 2017. Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in vivo. *Nat Commun* 8, 1422. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01615-z>
- Bohlen, C.J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J., Julius, D., 2010. A Bivalent Tarantula Toxin Activates the Capsaicin Receptor, TRPV1, by Targeting the Outer Pore Domain. *Cell* 141, 834–845. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.052>
- Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L., Ramkumar, V., 2014. TRPV1: A Potential

Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells* 3, 517–545.  
<https://doi.org/10.3390/cells3020517>

Bujak, J.K., Kosmala, D., Szopa, I.M., Majchrzak, K., Bednarczyk, P., 2019. Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. *Front. Oncol.* 9, 1087.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01087>

Cao, E., Cordero-Morales, J.F., Liu, B., Qin, F., Julius, D., 2013. TRPV1 Channels Are Intrinsically Heat Sensitive and Negatively Regulated by Phosphoinositide Lipids. *Neuron* 77, 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.016>

Carlile, G.W., Yang, Q., Matthes, E., Liao, J., Radinovic, S., Miyamoto, C., Robert, R., Hanrahan, J.W., Thomas, D.Y., 2018. A novel triple combination of pharmacological chaperones improves F508del-CFTR correction. *Sci Rep* 8, 11404.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29276-y>

Caterina, M.J., 2007. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292, R64–R76.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00446.2006>

Caterina, M.J., 2000. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science* 288, 306–313. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.306>

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>

Catterall, W.A., 2010. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron* 67, 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>

Chambard, J.-M.M., Tagat, E., Boudeau, P., Partiseti, M., 2014. Transforming TRP channel drug discovery using medium-throughput electrophysiological assays. *J Biomol Screen* 19, 468–77. <https://doi.org/10.1177/1087057113499632>

Chappe, Y., Michel, P., Joushomme, A., Barbeau, S., Pierredon, S., Baron, L., Garenne, A., Poullietier De Gannes, F., Hurtier, A., Mayer, S., Lagroye, I., Quignard, J.-F., Ducret, T., Compan, V., Franchet, C., Percherancier, Y., 2021. High-Throughput Screening of TRPV1 Ligands in the Light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer Technique. *Mol Pharmacol* 100, 237–257. <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000271>

Chatelain, F.C., Bichet, D., Douguet, D., Feliciangeli, S., Bendahhou, S., Reichold, M., Warth, R., Barhanin, J., Lesage, F., 2012. TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 5499–5504.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1201132109>

Chen, H., Chatelain, F.C., Lesage, F., 2014. Altered and dynamic ion selectivity of K<sup>+</sup> channels in cell development and excitability. *Trends in Pharmacological Sciences* 35, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.06.002>

Cheng, T., Wallace, D.M., Ponteri, B.B., Tuli, M., 2018. Valium without dependence? Individual GABA<sub>A</sub> receptor subtype contribution toward benzodiazepine addiction, tolerance, and therapeutic effects. *NDT Volume* 14, 1351–1361. <https://doi.org/10.2147/NDT.S164307>

Chuang, H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.-E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D., 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature* 411, 957–962. <https://doi.org/10.1038/35082088>

Chung, M.-K., Güler, A.D., Caterina, M.J., 2008. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11, 555–564. <https://doi.org/10.1038/nn.2102>

Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–24.  
<https://doi.org/10.1038/nature02196>

Clavel, D., Gotthard, G., von Stetten, D., De Sanctis, D., Pasquier, H., Lambert, G.G., Shaner, N.C., Royant, A., 2016. Structural analysis of the bright monomeric yellow-green fluorescent

protein mNeonGreen obtained by directed evolution. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 72, 1298–1307. <https://doi.org/10.1107/S2059798316018623>

Conforti, L., 2012. Patch-Clamp Techniques, in: *Cell Physiology Source Book*. Elsevier, pp. 369–381. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00020-2>

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S., 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)

Cosens, D.J., Manning, A., 1969. Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224, 285–287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>

Danigo, A., Magy, L., Demiot, C., 2013. TRPV1 dans les neuropathies douloureuses: Des modèles animaux aux perspectives thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 29, 597–606. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013296012>

Dragulescu-Andrasi, A., Chan, C.T., De, A., Massoud, T.F., Gambhir, S.S., 2011. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12060–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100923108>

Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Vasilyev, D., Arias, R., 2008. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat Rev Drug Discov* 7, 358–368. <https://doi.org/10.1038/nrd2552>

El Khamlichi, C., Reverchon-Assadi, F., Hervouet-Coste, N., Blot, L., Reiter, E., Morisset-Lopez, S., 2019. Bioluminescence Resonance Energy Transfer as a Method to Study Protein-Protein Interactions: Application to G Protein Coupled Receptor Biology. *Molecules* 24, 537. <https://doi.org/10.3390/molecules24030537>

Engler, C., Marillonnet, S., 2014. Golden Gate Cloning, in: Valla, S., Lale, R. (Eds.), *DNA Cloning and Assembly Methods, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 119–131. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9)

Estadella, I., Pedrós-Gámez, O., Colomer-Molera, M., Bosch, M., Sorkin, A., Felipe, A., 2020. Endocytosis: A Turnover Mechanism Controlling Ion Channel Function. *Cells* 9, 1833. <https://doi.org/10.3390/cells9081833>

Fang, Y., 2009. *J Recept Signal Transduct Res*. England. <https://doi.org/10.1080/10799890903079869>

Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C.J., Devesa, I., Ferrer-Montiel, A., 2014. Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes (Basel)* 4, 525–64. <https://doi.org/10.3390/membranes4030525>

Ferrer-Montiel, A., Fernández-Carvajal, A., Planells-Cases, R., Fernández-Ballester, G., González-Ros, J.M., Messeguer, A., González-Muñiz, R., 2012. Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Pat* 22, 999–1017. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.711320>

Gao, G., Cao, Y., Liu, W., Li, D., Zhou, W., Liu, J., 2017. Fluorescent sensors for sodium ions. *Anal. Methods* 9, 5570–5579. <https://doi.org/10.1039/C7AY01708A>

Gavva, N.R., 2008. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends in Pharmacological Sciences* 29, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.08.003>

Gavva, N.R., Bannon, A.W., Surapaneni, S., Hovland, D.N., Lehto, S.G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., Kuang, R., Le, A., Tamir, R., Wang, J., Youngblood, B., Zhu, D., Norman, M.H., Magal, E., Treanor, J.J.S., Louis, J.-C., 2007. The Vanilloid Receptor TRPV1 Is Tonicly Activated In Vivo and Involved in Body Temperature Regulation. *Journal of Neuroscience* 27, 3366–3374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4833-06.2007>

Gavva, N.R., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T.J., Viswanadhan, V.N., Toth, A., Pearce, L.V., Vanderah, T.W., Porreca, F., Blumberg, P.M., Lile, J., Sun, Y., Wild, K., Louis, J.-C., Treanor, J.J.S., 2004. Molecular Determinants of Vanilloid Sensitivity

in TRPV1. *J. Biol. Chem.* 279, 20283–20295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312577200>

Gavva, N.R., Tamir, R., Qu, Y., Klionsky, L., Zhang, T.J., Immke, D., Wang, J., Zhu, D., Vanderah, T.W., Porreca, F., Doherty, E.M., Norman, M.H., Wild, K.D., Bannon, A.W., Louis, J.-C., Treanor, J.J.S., 2005. Gavva 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. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.079855>

Gregorio-Teruel, L., Valente, P., González-Ros, J.M., Fernández-Ballester, G., Ferrer-Montiel, A., 2014. Mutation of I696 and W697 in the TRP box of vanilloid receptor subtype I modulates allosteric channel activation. *J Gen Physiol* 143, 361–75. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311070>

Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y., 2001. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein. *Journal of Biological Chemistry* 276, 29188–29194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102815200>

Groneberg, D.A., Niimi, A., Dinh, Q.T., Cosio, B., Hew, M., Fischer, A., Chung, K.F., 2004. Increased Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Airway Nerves of Chronic Cough. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1276–1280. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-174OC>

Guetta, D., Langou, K., Grunwald, D., Klein, G., Aubry, L., 2010. FYVE-Dependent Endosomal Targeting of an Arrestin-Related Protein in Amoeba. *PLoS ONE* 5, e15249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015249>

Hamdan, F.F., Rochdi, M.D., Breton, B., Fessart, D., Michaud, D.E., Charest, P.G., Laporte, S.A., Bouvier, M., 2007. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* 282, 29089–100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700577200>

Hardie, R.C., Minke, B., 1992. The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8, 643–651. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90086-S](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90086-S)

Harris, D.C., 2010. Quantitative chemical analysis. W.H. Freeman and Co, New York.

Heim, R., Tsien, R.Y., 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* 6, 178–182. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00450-5)

Hinard, V., Britan, A., Rougier, J.S., Bairoch, A., Abriel, H., Gaudet, P., 2016. ICEPO: the ion channel electrophysiology ontology 2016, 8.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* 117, 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>

Holzer, P., 2008. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor: The pharmacological challenge of TRPV1. *British Journal of Pharmacology* 155, 1145–1162. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.351>

Hondeghem, L.M., Dujardin, K., Hoffmann, P., Dumotier, B., De Clerck, F., 2011. Drug-Induced QTC Prolongation Dangerously Underestimates Proarrhythmic Potential: Lessons From Terfenadine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 57, 589–597. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182135e91>

Ikeda, Y., Tanaka, M., Nishihara, R., Hiruta, Y., Citterio, D., Suzuki, K., Niwa, K., 2020. Quantitative evaluation of luminescence intensity from enzymatic luminescence reaction of coelenterazine and analogues. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 394, 112459. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112459>

Isacoff, E.Y., Jan, L.Y., Minor, D.L., 2013. Conduits of Life's Spark: A Perspective on Ion Channel Research since the Birth of Neuron. *Neuron* 80, 658–674. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.040>

Jain, G., Muley, N., Soni, P., Singh, J.N., Sharma, S.S., 2009. Patch clamp Technique: Conventional to Automated 10, 8.

Janzen, W.P., Bernasconi, P. (Eds.), 2009. High Throughput Screening: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-258-2>

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

Jara-Oseguera, A., Simon, S.A., Rosenbaum, T., 2010b. TRPV1: ON THE ROAD TO PAIN RELIEF 34.

Jares-Erijman, E.A., Jovin, T.M., 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21, 1387–1395. <https://doi.org/10.1038/nbt896>

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R., 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523–526. <https://doi.org/10.1038/417523a>

Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., Waters, J.R., 1962. Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 60, 85–103. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030600111>

Jordt, S.-E., Julius, D., 2002. Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to “Hot” Chili Peppers. *Cell* 108, 421–430. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00637-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00637-2)

Jordt, S.-E., Tominaga, M., Julius, D., n.d. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site 6.

Kalia, J., Swartz, K.J., 2013. Exploring structure-function relationships between TRP and Kv channels. *Sci Rep* 3, 1523. <https://doi.org/10.1038/srep01523>

Kanchiswamy, C., Malnoy, M., Occhipinti, A., Maffei, M., 2014. Calcium Imaging Perspectives in Plants. *IJMS* 15, 3842–3859. <https://doi.org/10.3390/ijms15033842>

Kaneko, Y., Szallasi, A., 2014. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol* 171, 2474–507. <https://doi.org/10.1111/bph.12414>

Kanner, S.A., Jain, A., Colecraft, H.M., 2018. Development of a High-Throughput Flow Cytometry Assay to Monitor Defective Trafficking and Rescue of Long QT2 Mutant hERG Channels. *Front. Physiol.* 9, 397. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00397>

Kashio, M., 2021. Thermosensation involving thermo-TRPs. *Molecular and Cellular Endocrinology* 520, 111089. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111089>

Kiselyov, K., Muallem, S., 1999. Fatty acids, diacylglycerol, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptors and Ca<sup>2+</sup> influx. *Trends Neurosci* 22, 334–337. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01426-5](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01426-5)

Kocan, M., Pflieger, K.D.G., 2011. Study of GPCR-protein interactions by BRET. *Methods Mol Biol* 746, 357–71. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-126-0\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-126-0_20)

Kopec, W., Rothberg, B.S., de Groot, B.L., 2019. Molecular mechanism of a potassium channel gating through activation gate-selectivity filter coupling. *Nat Commun* 10, 5366. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13227-w>

Korsgaard, M., Strobaek, D., Christophersen, P., 2009. Automated Planar Electrode Electrophysiology in Drug Discovery: Examples of the Use of QPatch in Basic Characterization and High Content Screening on Nav, KCa2.3, and Kv11.1 Channels. *CCHTS* 12, 51–63. <https://doi.org/10.2174/138620709787048037>

Kraft, R., Harteneck, C., 2005. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 451, 204–211. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1428-0>

Kusch, J., Zifarelli, G., 2014. Patch-Clamp Fluorometry: Electrophysiology meets Fluorescence. *Biophysical Journal* 106, 1250–1257. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.02.006>

Lan, T.-H., Liu, Q., Li, C., Wu, G., Lambert, N.A., 2012. Sensitive and High Resolution Localization and Tracking of Membrane Proteins in Live Cells with BRET: Tracking

Membrane Proteins with BRET. *Traffic* 13, 1450–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01401.x>

Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C., Vargas, G., 2007. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 42, 427–38. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.04.004>

Lau, S.-Y., Procko, E., Gaudet, R., 2012. Distinct properties of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *Journal of General Physiology* 140, 541–555. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210810>

Laursen, W.J., Anderson, E.O., Hoffstaetter, L.J., Bagriantsev, S.N., Gracheva, E.O., 2015. Species-specific temperature sensitivity of TRPA1. *Temperature* 2, 214–226. <https://doi.org/10.1080/23328940.2014.1000702>

Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y., 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112. <https://doi.org/10.1038/nature12822>

Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B., Gaudet, R., 2007. The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron* 54, 905–918. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027>

Liu, B., Poolman, B., Boersma, A.J., 2017. Ionic Strength Sensing in Living Cells. *ACS Chem. Biol.* 12, 2510–2514. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00348>

Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., n.d. A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction 11.

Lukacs, V., Rives, J.-M., Sun, X., Zakharian, E., Rohacs, T., 2013. Promiscuous Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channels by Negatively Charged Intracellular Lipids. *Journal of Biological Chemistry* 288, 35003–35013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.520288>

Matta, J.A., Ahern, G.P., 2007. Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels: Voltage-independent gating of TRPV1 and TRPM8. *The Journal of Physiology* 585, 469–482. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.144287>

Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A., 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17, 969–973. <https://doi.org/10.1038/13657>

Mele, A., Calzolaro, S., Cannone, G., Cetrone, M., Conte, D., Tricarico, D., 2014. Database search of spontaneous reports and pharmacological investigations on the sulfonylureas and glinides-induced atrophy in skeletal muscle. *Pharmacol Res Perspect* 2. <https://doi.org/10.1002/prp2.28>

Menigoz, A., Boudes, M., 2011. The Expression Pattern of TRPV1 in Brain. *Journal of Neuroscience* 31, 13025–13027. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2589-11.2011>

Messeguer, A., Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel, A., 2006. Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor. *CN* 4, 1–15. <https://doi.org/10.2174/157015906775202995>

Minke, B., Wu, C.-F., Pak, W.L., 1975. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258, 84–87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>

Mita, K., Sumikama, T., Iwamoto, M., Matsuki, Y., Shigemi, K., Oiki, S., 2021. 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 USA* 118, e2017168118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017168118>

Miyawaki, A., Niino, Y., 2015. Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based probes. *Molecular cell* 58, 632–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.002>

Molinari, P., Casella, I., Costa, T., 2008. Functional complementation of high-efficiency resonance energy transfer: a new tool for the study of protein binding interactions in living cells. *Biochem J* 409, 251–61. <https://doi.org/10.1042/BJ20070803>

Montell, C., Caterina, M.J., 2007. Thermoregulation: Channels that Are Cool to the Core. *Current Biology* 17, R885–R887. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.016>

Montell, C., Rubin, G.M., 1989. Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X)

Moran, M.M., McAlexander, M.A., Bíró, T., Szallasi, A., 2011. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10, 601–620. <https://doi.org/10.1038/nrd3456>

Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., García-Sanz, N., Ferrer-Montiel, A., 2004. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* 279, 25665–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311515200>

Moreno, C., de la Cruz, A., Valenzuela, C., 2016. In-Depth Study of the Interaction, Sensitivity, and Gating Modulation by PUFAs on K<sup>+</sup> Channels; Interaction and New Targets. *Front. Physiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00578>

Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K., 2001. A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137–141. <https://doi.org/10.1038/84397>

Namkung, Y., Le Gouill, C., Lukashova, V., Kobayashi, H., Hogue, M., Houry, E., Song, M., Bouvier, M., Laporte, S.A., 2016. Monitoring G protein-coupled receptor and  $\beta$ -arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun* 7, 12178. <https://doi.org/10.1038/ncomms12178>

Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., 2005. Gating of TRP channels: a voltage connection?: Voltage dependence of TRP channels. *The Journal of Physiology* 567, 35–44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088377>

Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., Tominaga, M., 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8002–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1337252100>

Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M., 2002. Direct Phosphorylation of Capsaicin Receptor VR1 by Protein Kinase C $\epsilon$  and Identification of Two Target Serine Residues. *Journal of Biological Chemistry* 277, 13375–13378. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200104200>

Obergrussberger, A., Bru ggemann, A., Goetze, T.A., Rapedius, M., Haarmann, C., Rinke, I., Becker, N., Oka, T., Ohtsuki, A., Stengel, T., Vogel, M., Steindl, J., Mueller, M., Stiehler, J., George, M., Fertig, N., 2016. Automated Patch Clamp Meets High-Throughput Screening: 384 Cells Recorded in Parallel on a Planar Patch Clamp Module. *Journal of Laboratory Automation* 21, 779–793. <https://doi.org/10.1177/2211068215623209>

Obergrussberger, A., Friis, S., Brüggemann, A., Fertig, N., 2021. Automated patch clamp in drug discovery: major breakthroughs and innovation in the last decade. *Expert Opinion on Drug Discovery* 16, 1–5. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1791079>

Palovcak, E., Delemotte, L., Klein, M.L., Carnevale, V., 2015. Comparative sequence analysis suggests a conserved gating mechanism for TRP channels. *Journal of General Physiology* 146, 37–50. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411329>

Payandeh, J., Minor, D.L., 2015. Bacterial Voltage-Gated Sodium Channels (BacNaVs) from the Soil, Sea, and Salt Lakes Enlighten Molecular Mechanisms of Electrical Signaling and Pharmacology in the Brain and Heart. *Journal of Molecular Biology* 427, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.010>

Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., Catterall, W.A., 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature10238>

Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science* 296, 2046–2049.



<https://doi.org/10.1126/science.1073140>

Perkel, J.M., 2010. High-throughput Ion Channel Screening: A “Patch”-work Solution. *BioTechniques* 48, 25–29. <https://doi.org/10.2144/000113339>

Phelps, C.B., Gaudet, R., 2007. The Role of the N Terminus and Transmembrane Domain of TRPM8 in Channel Localization and Tetramerization. *Journal of Biological Chemistry* 282, 36474–36480. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707205200>

Philippaert, K., Kerselaers, S., Voets, T., Vennekens, R., 2018. A Thallium-Based Screening Procedure to Identify Molecules That Modulate the Activity of Ca<sup>2+</sup>-Activated Monovalent Cation-Selective Channels. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* 23, 341–352. <https://doi.org/10.1177/2472555217748932>

Phillips, A.M., Bull, A., Kelly, L.E., 1992. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8, 631–642. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90085-R](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90085-R)

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229–233. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-H](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-H)

Pumroy, R.A., Fluck, E.C., Ahmed, T., Moiseenkova-Bell, V.Y., 2020. Structural insights into the gating mechanisms of TRPV channels. *Cell Calcium* 87, 102168. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102168>

Putney, J.W., 2004. The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends in Cell Biology* 14, 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.04.002>

René, P., Le Gouill, C., Pogozheva, I.D., Lee, G., Mosberg, H.I., Farooqi, I.S., Valenzano, K.J., Bouvier, M., 2010. Pharmacological Chaperones Restore Function to MC4R Mutants Responsible for Severe Early-Onset Obesity. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 520–532. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.172098>

Romanovsky, A.A., Almeida, M.C., Garami, A., Steiner, A.A., Norman, M.H., Morrison, S.F., Nakamura, K., Burmeister, J.J., Nucci, T.B., 2009. The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in Thermoregulation: A Thermosensor It Is Not. *Pharmacol Rev* 61, 228–261. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001263>

Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., Gordon, S.E., 2004. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123, 53–62. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308906>

Ruigrok, H.J., Shahid, G., Goudeau, B., Poulletier de Gannes, F., Poque-Haro, E., Hurtier, A., Lagroye, I., Vacher, P., Arbault, S., Sojic, N., Veyret, B., Percherancier, Y., 2017. Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Three TRPV Channels. *Biophys J* 112, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.3197>

Sand, C.A., Grant, A.D., Nandi, M., 2015. Vascular Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1). *J Histochem Cytochem.* 63, 449–453. <https://doi.org/10.1369/0022155415581014>

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., Overington, J.P., 2017. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 16, 19–34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>

Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., Planells-Cases, R., 2012. Agonist- and Ca<sup>2+</sup>-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19462–19471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289751>

Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B.L., Tucker, S.J., Rapedius, M., Baukrowitz, T., 2016. A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K<sup>+</sup> Channels. *Cell* 164, 937–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.002>

Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., Davidson, M.W., Wang, J., 2013. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10, 407–409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>

Shaya, D., Findeisen, F., Abderemane-Ali, F., Arrigoni, C., Wong, S., Nurva, S.R., Loussouarn, G., Minor, D.L., 2014. Structure of a Prokaryotic Sodium Channel Pore Reveals Essential Gating Elements and an Outer Ion Binding Site Common to Eukaryotic Channels. *Journal of Molecular Biology* 426, 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.010>

Shuba, Y.M., 2021. Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 612480. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612480>

Stein, A.T., Ufret-Vincenty, C.A., Hua, L., Santana, L.F., Gordon, S.E., 2006. Phosphoinositide 3-Kinase Binds to TRPV1 and Mediates NGF-stimulated TRPV1 Trafficking to the Plasma Membrane. *Journal of General Physiology* 128, 509–522. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609576>

Steiner, A.A., Turek, V.F., Almeida, M.C., Burmeister, J.J., Oliveira, D.L., Roberts, J.L., Bannon, A.W., Norman, M.H., Louis, J.-C., Treanor, J.J.S., Gavva, N.R., Romanovsky, A.A., 2007. Nonthermal Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channels in Abdominal Viscera Tonicly Inhibits Autonomic Cold-Defense Effectors. *Journal of Neuroscience* 27, 7459–7468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1483-07.2007>

Stephens, R.F., Guan, W., Zhorov, B.S., Spafford, J.D., 2015. Selectivity filters and cysteine-rich extracellular loops in voltage-gated sodium, calcium, and NALCN channels. *Front. Physiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00153>

Szallasi, A., 2015. TRP Channels as Therapeutic Targets: From Basic Science to Clinical Use. Elsevier Inc.

Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A., Eid, S.R., 2007. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6, 357–72. <https://doi.org/10.1038/nrd2280>

Szymaszkiewicz, A., Włodarczyk, J., Wasilewski, A., Di Marzo, V., Storr, M., Fichna, J., Zielińska, M., 2020. Desensitization of transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channel as promising therapy of irritable bowel syndrome: characterization of the action of palvanil in the mouse gastrointestinal tract. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393, 1357–1364. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01829-x>

Tang, L., Fang, C., 2019. Elucidating Excited-State Hydrogen-Bonding Dynamics and Proton Transfer inside Fluorescent Protein Calcium Biosensors, in: *Hydrogen-Bonding Research in Photochemistry, Photobiology, and Optoelectronic Materials*. WORLD SCIENTIFIC (EUROPE), pp. 55–91. [https://doi.org/10.1142/9781786346087\\_0003](https://doi.org/10.1142/9781786346087_0003)

Terstappen, G.C., Roncarati, R., Dunlop, J., Peri, R., 2010. Screening technologies for ion channel drug discovery. *Future Medicinal Chemistry* 2, 715–730. <https://doi.org/10.4155/fmc.10.180>

Tian, Q., Hu, J., Xie, C., Mei, K., Pham, C., Mo, X., Hepp, R., Soares, S., Nothias, F., Wang, Y., Liu, Q., Cai, F., Zhong, B., Li, D., Yao, J., 2019. Recovery from tachyphylaxis of TRPV1 coincides with recycling to the surface membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 5170–5175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819635116>

Trudeau, M.C., Zagotta, W.N., 2004. Dynamics of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels measured by patch-clamp fluorometry. *J Gen Physiol* 124, 211–23. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409101>

Tsien, R.Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>

Tsien, R.Y., Miyawaki, A., 1998. Seeing the machinery of live cells. *Science* 280, 1954–5.

Valente, P., García-Sanz, N., Gomis, A., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Viana, F., Belmonte, C., Ferrer-Montiel, A., 2008. Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *FASEB j.* 22, 3298–3309. <https://doi.org/10.1096/fj.08-107425>

Vandenberg, J.I., Perry, M.D., Perrin, M.J., Mann, S.A., Ke, Y., Hill, A.P., 2012. hERG K<sup>+</sup> Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. *Physiological Reviews* 92, 1393–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2011>

Vay, L., Gu, C., McNaughton, P.A., 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 165, 787–801. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>

Velasco, M., Díaz-García, C.M., Larqué, C., Hiriart, M., 2016. Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells. *Mol Pharmacol* 90, 341–357. <https://doi.org/10.1124/mol.116.103861>

Vetter, S.W., Leclerc, E., 2003. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur J Biochem* 270, 404–414. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03414.x>

Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., Nilius, B., 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748–754. <https://doi.org/10.1038/nature02732>

Wang, Y., Shyy, J.Y.-J., Chien, S., 2008. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. *Annu Rev Biomed Eng* 10, 1–38. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.010308.161731>

Woudenberg-Vrenken, T.E., Bindels, R.J.M., Hoenderop, J.G.J., 2009. The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5, 441–9. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.100>

Wright, S.C., Lukasheva, V., Le Gouill, C., Kobayashi, H., Breton, B., Mailhot-Larouche, S., Blondel-Tepaz, É., Antunes Vieira, N., Costa-Neto, C., Héroux, M., Lambert, N.A., Parreiras-e-Silva, L.T., Bouvier, M., 2021. BRET-based effector membrane translocation assay monitors GPCR-promoted and endocytosis-mediated G<sub>q</sub> activation at early endosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 118, e2025846118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025846118>

Wu, L.-J., Sweet, T.-B., Clapham, D.E., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol Rev* 62, 381–404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>

Wu, X.-S., McNeil, B.D., Xu, J., Fan, J., Xue, L., Melicoff, E., Adachi, R., Bai, L., Wu, L.-G., 2009. Ca<sup>2+</sup> and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat Neurosci* 12, 1003–1010. <https://doi.org/10.1038/nn.2355>

Xing, B.-M.M., Yang, Y.-R.R., Du, J.-X.X., Chen, H.-J.J., Qi, C., Huang, Z.-H.H., Zhang, Y., Wang, Y., 2012. Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B. *J Neurosci* 32, 14709–21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1634-12.2012>

Yang, J., Cumberbatch, D., Centanni, S., Shi, S.-Q.Q., Winder, D., Webb, D., Johnson, C.H., 2016. Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca<sup>++</sup>sensing. *Nat Commun* 7, 13268. <https://doi.org/10.1038/ncomms13268>

Yannick, C., n.d. Etude de la régulation et de la diversité combinatoire des canaux potassiques à deux domaines P de la sous famille TREK. 221.

Yao, L., Sakaba, T., 2012. Activity-dependent modulation of endocytosis by calmodulin at a large central synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 291–296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100608109>

Yonghak, P., Miyata, S., Kurganov, E., 2020. TRPV1 is crucial for thermal homeostasis in the mouse by heat loss behaviors under warm ambient temperature. *Sci Rep* 10, 8799. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65703-9>

- Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A., 2005. Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol Rev* 57, 387–395. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.13>
- Yu, H., Li, M., Wang, W., Wang, X., 2016. High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol Sin* 37, 34–43. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.108>
- Zhang, H., Zou, B., Du, F., Xu, K., Li, M., 2015. Reporting Sodium Channel Activity Using Calcium Flux: Pharmacological Promiscuity of Cardiac Nav1.5. *Mol Pharmacol* 87, 207–217. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094789>
- Zhang, X., Huang, J., McNaughton, P.A., 2005. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* 24, 4211–4223. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600893>
- Zheng, J., 2013. Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol* 3, 221–42. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120001>