

# Dissection optique du rôle des récepteurs nicotiniques neuronaux à l'aide de récepteurs photo-contrôlables

Romain Durand-de Cuttoli, Sarah Mondoloni, et Alexandre Mourot\*

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine – Institut de Biologie Paris Seine (NPS – IBPS), 75005 Paris, France

**Résumé** – Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) sont des récepteurs canaux largement distribués dans le système nerveux central (SNC) et en périphérie. Les nAChR neuronaux jouent un rôle modulateur important dans l'apprentissage, la mémoire et l'attention, et sont impliqués dans de nombreuses pathologies aussi variées que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'épilepsie, la schizophrénie ou encore l'addiction à la nicotine. L'acétylcholine, neurotransmetteur endogène, et la nicotine, alcaloïde du tabac, entraînent l'ouverture du canal et permettent le passage de cations à travers la membrane plasmique, influençant ainsi l'excitabilité neuronale et la plasticité synaptique. La grande diversité des nAChR neuronaux en termes d'assemblage moléculaire (sous-unités  $\alpha 2$ -10 et  $\beta 2$ -4), de localisation tissulaire (cortex, mésencéphale, striatum...) mais aussi sub-cellulaire (pré- *vs* post-synaptique, dendritique *vs* axonale...) contribue aux rôles variés qu'ont ces récepteurs. Pouvoir activer ou inhiber spécifiquement un sous-type de nAChR à un endroit et un instant voulu permettrait d'avancer considérablement dans la compréhension de ses différents rôles physiologiques et pathologiques. À cette fin sont développées des techniques innovantes de pharmacologie optogénétique qui permettent de contrôler optiquement des sous-types de nAChR endogènes. L'idée est de greffer un nano-interrupteur chimique sur un nAChR modifié génétiquement afin d'utiliser la lumière pour photo-contrôler spécifiquement et précisément ce récepteur modifié. Nous discuterons ici de l'historique de la technique, mais aussi des dernières avancées technologiques dans le contrôle optique de récepteurs endogènes et dans la mise en œuvre de ces outils *in vivo*.

**Mots clés** : acétylcholine, nicotine, addiction, optogénétique, photopharmacologie

**Abstract – Optically dissecting brain nicotinic receptor function with photo-controllable designer receptors.** Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are pentameric ligand-gated ion channels widely expressed in the central nervous system and the periphery. They play an important modulatory role in learning, memory and attention, and have been implicated in various diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, epilepsy, schizophrenia and addiction. These receptors are activated by the endogenous neurotransmitter acetylcholine, or by nicotine, the alkaloid found in tobacco leaves. Both molecules open the ion channel and cause the movement of cations across the membrane, which directly affects neuronal excitability and synaptic plasticity. nAChRs are very heterogeneous in their subunit composition ( $\alpha 2$ -10 et  $\beta 2$ -4), in their brain distribution (cortex, midbrain, striatum...) and in their sub-cellular localization (pre- *vs* post-synaptic, axonal, dendritic...). This heterogeneity highly contributes to the very diverse roles these receptors have in health and disease. The ability to activate or block a specific nAChR subtype, at a defined time and space within the brain, would greatly help obtaining a clearer picture of these various functions. To this aim, we are developing novel optogenetic pharmacology strategies for optically controlling endogenous nAChR isoforms within the mouse brain. The idea is to tether a chemical photoswitch on the surface of a cysteine-modified nAChR, and use light for rapidly and reversibly turning that receptor mutant on and off. Here we will discuss the history of optogenetic pharmacology, and the recent advances for the optical control of brain nicotinic receptors *in vivo*.

**Keywords:** acetylcholine, nicotine, addiction, optogenetics, photopharmacology

\*Auteur de correspondance : [almourot@gmail.com](mailto:almourot@gmail.com)

## Abréviations

18-MC	18-Méthoxycoronaridine
ACh	Acétylcholine
AChBP	<i>Acetylcholine binding protein</i>
ATV	Aire tegmentale ventrale
CCh	Carbamylcholine
Ch	Choline
DH $\beta$ E	DiHydro- $\beta$ -érythroïdine
DTT	Dithiothréitol
IPN	Noyau interpedonculaire
LPA	Ligand photochromique attachable
LinAChR	<i>Light-controlled nicotinic acetylcholine receptor</i>
MAACh	Maléimide-azobenzène-acétylcholine
MAHoCh	Maléimide-azobenzène-homocholine
MEC	Mécamylamine
mHb	Habénula médiale
MLA	Méthyllycaconitine
nAChR	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
PTA	Phényltriméthylammonium
SNC	Système nerveux central
TMA	Tétraméthylammonium
UV	Ultraviolet

## Introduction

Disséquer les fonctions neuronales des récepteurs et canaux ioniques membranaires, en conditions normales et pathologiques, représente actuellement un défi majeur en neurosciences. De nombreux troubles neuropsychiatriques ou neurodégénératifs ont en effet comme origine un dysfonctionnement au niveau moléculaire de ces protéines membranaires. Des manipulations génétiques et pharmacologiques de ces protéines, entreprises ces dernières années, ont permis des avancées notables dans la compréhension de leurs fonctions physiologiques. La génétique (mutations, délétions, chimères...) permet notamment d'étudier de manière spécifique, et potentiellement avec une précision anatomique, le rôle d'un sous-type de récepteur *in vivo* (Tableau 1). Cependant, la manipulation génétique n'a pas la résolution temporelle suffisante pour permettre d'établir un lien direct entre l'activation des récepteurs, la modulation de circuits neuronaux et la mise en place de comportements. De plus, elle peut conduire à des altérations développementales qui se superposent à celles induites par la délétion/mutation du récepteur. La pharmacologie classique offre une meilleure résolution temporelle, mais souffre d'un problème de sélectivité fonctionnelle, car elle ne peut que rarement être dirigée contre un sous-type de récepteur, et en aucun cas être dirigée sur un type cellulaire précis. Il semble donc crucial de développer des technologies qui combinent les avantages de la pharmacologie et de la génétique afin de contrôler, *in vivo*, l'activité d'un type de récepteur donné, dans un tissu ciblé, et ce de manière aiguë, idéalement avec une résolution temporelle qui rivalise avec celle de la transmission synaptique (ms).

L'avènement des techniques optogénétiques, et notamment l'utilisation d'opsines microbiennes, est en train de révolutionner la façon dont on étudie les circuits neuronaux (Deisseroth, 2015; Kim *et al.*, 2017). Ces techniques permettent de contrôler l'activité de populations neuronales et leurs projections avec une très grande précision génétique, anatomique et temporelle (Tableau 1). Elles reposent sur l'utilisation de canaux ioniques et transporteurs photosensibles bactériens, que l'on introduit génétiquement dans une population neuronale donnée. L'optogénétique «classique» a ainsi permis de tester de nombreuses hypothèses de lien causal entre activité d'un réseau neuronal et mise en place de comportements. Cependant, cette technique utilise des protéines bactériennes exogènes et ne permet pas de comprendre comment les circuits neuronaux opèrent au niveau moléculaire. Il est donc crucial de développer de nouveaux outils optiques permettant, non pas de contrôler l'activité d'un réseau de neurones, mais de contrôler, au niveau moléculaire, l'activité de récepteurs et canaux naturellement présents dans ces neurones. Ces outils seront notamment indispensables au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces récepteurs et canaux. Les techniques de photopharmacologie et de pharmacologie optogénétique présentées dans cette revue utilisent des ligands photochromiques (ou *photoswitches*) afin de contrôler optiquement des récepteurs et canaux ioniques neuronaux endogènes.

La photopharmacologie (ou optopharmacologie) repose sur l'utilisation de ligands photochromiques diffusibles, qui changent de forme sous l'action de la lumière (Figure 1). Deux longueurs d'ondes distinctes ( $h\nu_1$  et  $h\nu_2$ ) sont utilisées pour que le ligand passe, réversiblement et rapidement, d'une configuration étendue à une configuration repliée. Une seule des deux configurations peut se lier au récepteur, et ainsi la lumière va dicter la liaison/dissociation du ligand avec son récepteur. Cette stratégie permet donc de contrôler de manière réversible et rapide (Tableau 1) l'activité de protéines endogènes (pour revues voir: Kramer *et al.*, 2013; Lerch *et al.*, 2016; Berlin & Isacoff, 2017). La photopharmacologie a été utilisée sur des protéines membranaires aussi variées que des canaux ioniques voltage-dépendants (Banghart *et al.*, 2009; Mourot *et al.*, 2011, 2012, 2017), des canaux sensibles à la température (Stein *et al.*, 2013; Frank *et al.*, 2015), des récepteurs canaux (Deal *et al.*, 1969; Volgraf *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2012; Laprell *et al.*, 2015; Lerch *et al.*, 2016), des canaux activés par les protéines G (Barber *et al.*, 2016), des canaux constitutivement ouverts (Schönberger *et al.*, 2014), des récepteurs couplés aux protéines G (Nargeot *et al.*, 1982; Schönberger & Trauner, 2014; Zussy *et al.*, 2016) ou des transporteurs de neurotransmetteurs (Quandt *et al.*, 2014). Certains de ces *photoswitches* ont été utilisés *in vivo* chez le rongeur, notamment pour restaurer la sensibilité à la lumière à des rétines aveugles (Polosukhina *et al.*, 2012; Tochitsky *et al.*, 2014) ou encore pour moduler la sensation de la douleur (Mourot *et al.*, 2012; Zussy *et al.*, 2016). Les

**Tableau 1.** Principes, avantages et limites pour l'utilisation *in vivo* des différentes techniques génétiques, optiques et pharmacologiques.

	Principe	Spécificité pharmacologique	Ciblage cellulaire	Résolution spatiale	Résolution temporelle
Pharmacologie	Activation/inhibition de récepteurs	Sélective	Impossible	Faible <sup>1</sup>	s-h <sup>2</sup>
Génétique	Délétion/mutation de récepteurs	Spécifique	Possible	Faible <sup>3</sup>	Aucune <sup>4</sup>
Optogénétique	Activation/inhibition de neurones	Aucune	Possible	Excellente (optique)	ms
Photo-Pharmacologie	Activation/inhibition de récepteurs	Sélective	Impossible	Excellente (optique)	ms
Pharmacologie optogénétique	Activation/inhibition de récepteurs	Spécifique	Possible	Excellente (optique)	ms

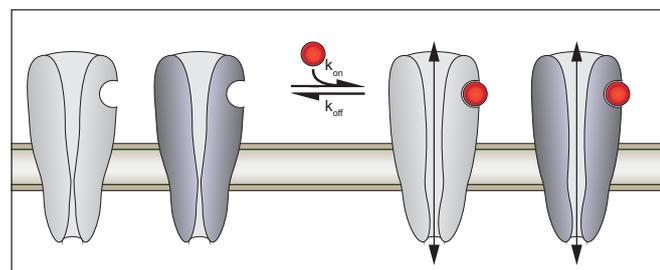
<sup>1</sup> Injection locale techniquement difficile.

<sup>2</sup> Réversibilité limitée par la pharmacocinétique de la drogue ; s: seconde ; h: heure.

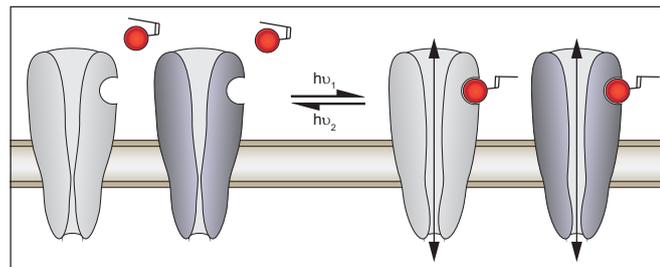
<sup>3</sup> Sauf pour les expressions conditionnelles (type Cre/Lox).

<sup>4</sup> Sauf pour les systèmes inductibles (type Tet-off/on).

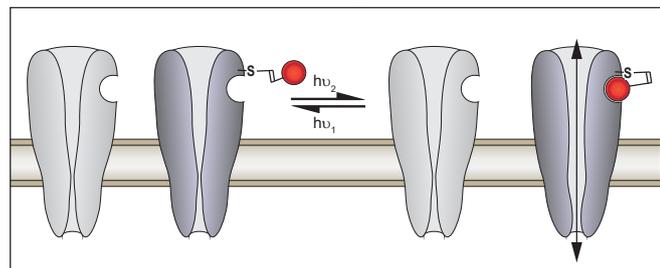
### PHARMACOLOGIE



### PHOTO-PHARMACOLOGIE



### PHARMACOLOGIE OPTOGENETIQUE

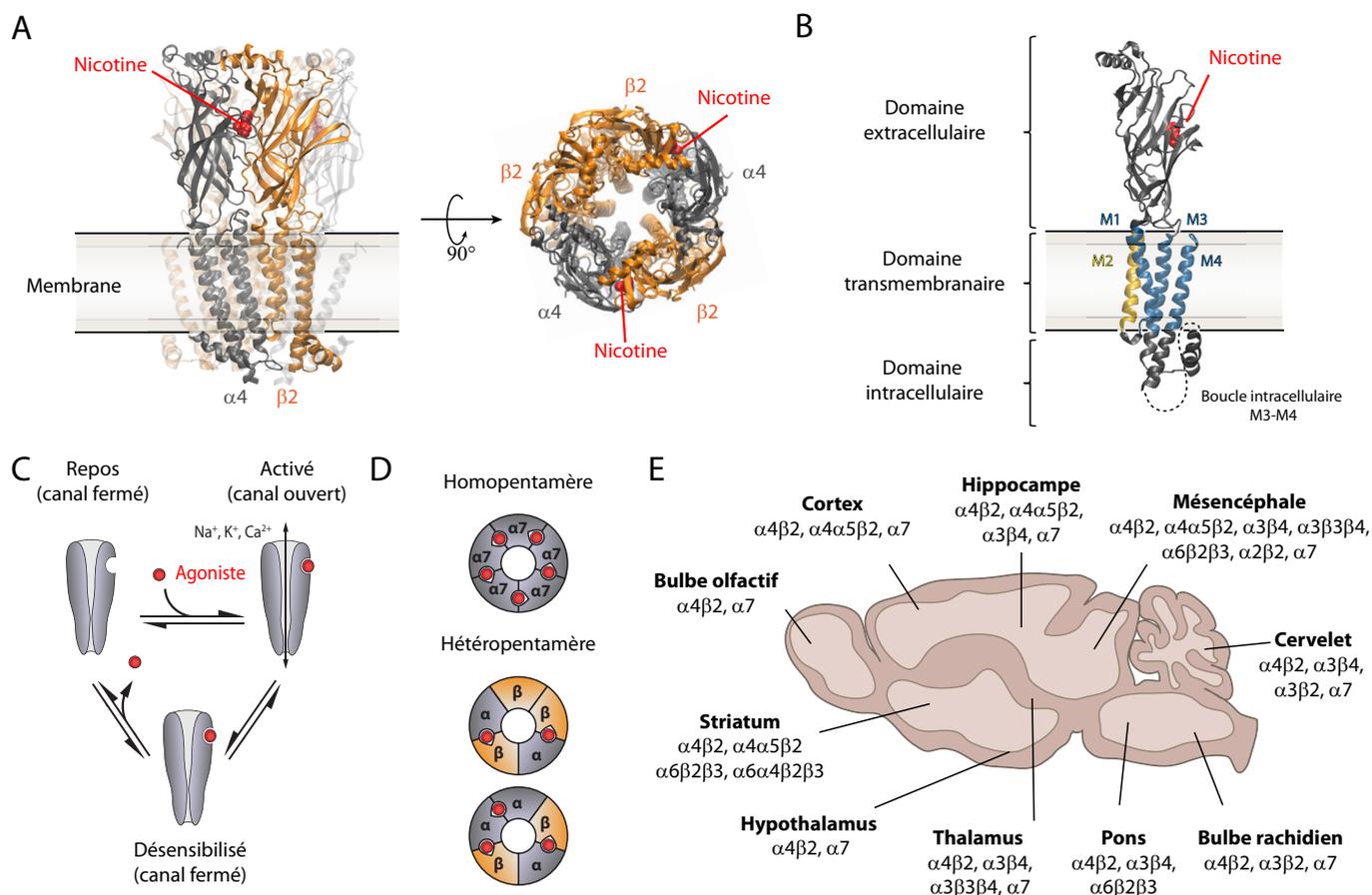


**Figure 1.** Pharmacologie, photopharmacologie et pharmacologie optogénétique. La pharmacologie classique souffre d'un manque de sélectivité et est limitée par les cinétiques de diffusion des molécules ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$  et pharmacocinétiques). La photopharmacologie repose sur l'utilisation de ligands photochromiques, qui changent de forme en fonction de la longueur d'onde ( $h\nu$ ). Elle permet d'avoir un contrôle spatial et temporel sur l'activité biologique du récepteur, mais souffre d'un manque de sélectivité. La pharmacologie optogénétique permet le contrôle optique d'un sous-type de récepteur particulier, de par l'ancrage du *photoswitch* sur un résidu muté en cystéine à la surface du récepteur. Deux longueurs d'onde différentes ( $h\nu_1$  et  $h\nu_2$ ) sont utilisées pour présenter ou retirer le ligand de son site de liaison.

composés cagés, qui libèrent un neurotransmetteur sous l'action de la lumière (Ellis-Davies, 2007), sont un autre type de composés photo-pharmacologiques, mais dont l'activation est irréversible, et ne seront pas traités ici.

La pharmacologie optogénétique (ou optogénétique chimique), quant à elle, repose sur l'ancrage covalent d'un ligand photochromique sur un récepteur génétiquement modifié (Kramer *et al.*, 2013; Berlin & Isacoff, 2017). L'introduction d'un résidu cystéine à la surface de la protéine permet l'attachement covalent d'un *photoswitch* à proximité du site de liaison du ligand (Figure 1). La pharmacologie optogénétique, en plus de la précision spatio-temporelle qu'offre la photopharmacologie, offre donc une spécificité pharmacologique et génétique : seul le mutant cystéine sera rendu photosensible après attachement du ligand photochromique (Tableau 1). La pharmacologie optogénétique a été appliquée à des canaux ioniques (Banghart *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2011; Sandoz *et al.*, 2012), des récepteurs canaux (Volgraf *et al.*, 2005; Szobota *et al.*, 2007; Janovjak *et al.*, 2010; Tochitsky *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014, 2015; Berlin *et al.*, 2016) et des récepteurs couplés aux protéines G (Levitz *et al.*, 2013). C'est une technique exigeante, notamment *in vivo*, car elle nécessite d'introduire un gène et de délivrer le ligand photochromique et la lumière de manière locale. Néanmoins, des stratégies émergent afin de déployer ces nouveaux outils chez l'animal, notamment chez le poisson zèbre (Wyart *et al.*, 2009; Janovjak *et al.*, 2010; Levitz *et al.*, 2013) et le rongeur (Caporale *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2015; Levitz *et al.*, 2016).

Un avantage certain de la photopharmacologie est qu'elle ne nécessite pas de manipulation génétique, et permet donc de photo-sensibiliser un tissu biologique en quelques minutes. De son côté, la pharmacologie optogénétique nécessite de manipuler génétiquement les tissus, mais offre une spécificité pharmacologie et génétique sans précédent. Dans cette revue nous nous focaliserons sur les stratégies de photopharmacologie et de pharmacologie optogénétique appliquées aux récepteurs nicotiques. Nous discuterons des possibilités qu'offrent ces outils, mais aussi des défis que représente la mise en œuvre de ces technologies *in vivo* chez le rongeur.



**Figure 2.** Structure, dynamique et diversité des nAChR neuronaux. (A) Structure tridimensionnelle aux rayons X du récepteur nicotinique ( $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ ) (PDB ID 5KXI) vue de profil (gauche) et du dessus (droite). Le ligand, ici la nicotine (rouge), se lie à l'interface de la sous-unité principale  $\alpha 4$  (grise) et de la sous-unité complémentaire  $\beta 2$  (orange); (B) Structure tridimensionnelle d'une sous-unité. Trois domaines distincts sont présentés: le domaine extracellulaire qui contient le site de liaison de l'agoniste, le domaine transmembranaire (quatre hélices, M1 à M4), et le domaine intracellulaire (boucle M3-M4) dont une partie n'a pas été résolue par cristallographie (pointillés); (C) Représentation schématique des différentes conformations allostériques des nAChR. Il existe trois états à l'équilibre du récepteur: repos, activé (canal ouvert) et désensibilisé; (D) Représentation schématique des différents types d'assemblages des nAChR: en homopentamère (majoritairement  $\alpha 7$ ), constitué de cinq sites agonistes et en hétéropentamère ( $(\alpha)_2(\beta)_3$  ou  $(\alpha)_3(\beta)_2$ ), avec deux ou trois sites agonistes; (E) Répartition des différents sous-types de nAChR dans le cerveau, d'après (Taly *et al.*, 2009).

## Diversité structurale et fonctionnelle des récepteurs nicotiques neuronaux

Très conservés au cours de l'évolution, les nAChR sont, comme les récepteurs ionotropes à la glycine, au GABA de type A (GABA<sub>A</sub>R) et à la sérotonine (5-HT<sub>3</sub>), des protéines allostériques transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs canaux à boucle cystéine (*Cys-loop receptors*) (Nys *et al.*, 2013). Les nAChR sont composés de cinq sous-unités qui vont s'organiser en rosette (Figure 2A) pour définir un canal perméable aux cations (Morales-Perez *et al.*, 2016). Chaque sous-unité présente quatre segments transmembranaires (M1-M4), avec les segments M2 tapissant la paroi interne du pore (Figure 2B). Les sites de liaison aux agonistes sont situés au niveau du domaine extracellulaire, à l'interface entre deux sous-unités adjacentes (Figure 2A, B). La distance entre le site de liaison et le pore exclut une action directe du

ligand sur le canal. L'ouverture de ce dernier est donc soumise à un changement conformationnel du récepteur permettant ainsi le passage des cations selon un gradient électrochimique. Ce type de changement conformationnel a été décrit en 1965 dans le modèle de transitions allostériques de Monod-Wyman-Changeux, par la suite étendu au nAChR (Changeux, 2010a) (Figure 2C). Le récepteur existe en trois états distincts: un état de repos où le canal est fermé, un état actif où le canal est ouvert, et un état désensibilisé dans lequel le canal est fermé malgré la présence de l'agoniste.

Au niveau neuronal, on dénombre neuf sous-unités  $\alpha$  et trois sous-unités  $\beta$  différentes. Ces sous-unités vont s'assembler en récepteurs canaux homopentamériques ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ) ou hétéropentamériques ( $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\alpha 6\beta 2$ , etc., Figure 2D), offrant ainsi une large palette de combinaisons aux propriétés très diverses (Taly *et al.*, 2009; Zoli *et al.*, 2015). De plus, les sous-unités accessoires

$\alpha 5$  ou  $\beta 3$ , qui ne participent pas au site de liaison de l'ACh, peuvent s'incorporer dans les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  ou  $\alpha 3\beta 4$ . Des études récentes suggèrent l'existence d'hétéropentamères  $\alpha 7\beta 2$  *in vivo* chez le rongeur (Wu *et al.*, 2016), ce qui rajoute encore à la diversité des nAChR et à la complexité de la modulation nicotinique dans le cerveau. Les travaux en immunohistochimie, hybridation *in situ* et marquages par radio-ligands ont permis de décrire la localisation des différentes sous-unités au niveau du SNC. Bien que l'expression des nAChR soit ubiquitaire (Figure 2E), on retrouve une forte densité au niveau de la rétine, du thalamus, de l'*area postrema*, de la voie habénulo-interpédonculaire (mHb-IPN), de la substance noire ainsi que de l'aire tegmentale ventrale (ATV). Chez les rongeurs, les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  sont les plus abondants au niveau cérébral et présentent une plus grande affinité pour la nicotine. Les sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 4$  sont quant à elles fortement co-exprimées, notamment au niveau de la glande pinéale, de la voie habénulo-interpédonculaire, du tractus solitaire, de l'*area postrema* et de la rétine. Au niveau subcellulaire, on retrouve également une grande diversité de localisation, les nAChR pouvant être retrouvés au niveau pré- ou post-synaptique, axonal, somatique ou encore dendritique.

La combinaison des différentes sous-unités génère une grande variété de types de récepteurs qui ont des propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques diverses, rendant leur réponse et leur sensibilité à l'agoniste variables d'une combinaison à une autre. Par exemple, les hétéropentamères  $\alpha 4\beta 2^*$  (\* : possédant au moins les sous-unités  $\alpha 4$  et  $\beta 2$ ) de haute affinité à la nicotine et l'ACh présentent une forte probabilité d'ouverture du canal, tandis que les homopentamères  $\alpha 7$ , de faible affinité, présentent une faible probabilité d'ouverture du canal, une forte conductance, une importante perméabilité calcique comparativement à sa perméabilité sodique et une vitesse de désensibilisation rapide. Les récepteurs  $\alpha 3\beta 4$  présentent une faible affinité à l'agoniste ainsi qu'une faible vitesse de désensibilisation. Pour une même sous-unité  $\alpha$  donnée, les oligomères  $\alpha i\beta 2$  désensibilisent plus rapidement que les  $\alpha i\beta 4$ . De même, les  $\alpha 3\beta j$  sont plus rapidement désensibilisés que les  $\alpha 2\beta j$  et les  $\alpha 4\beta j$  (pour revue, voir Le Novère *et al.*, 2002).

## Stratégies pharmacologiques et génétiques pour l'étude des nAChR

Ces différents récepteurs nicotiques ont été impliqués dans de nombreux comportements tels que le sommeil, la sensation de faim, l'apprentissage, la mémoire, la motivation ou encore la récompense. Ils jouent aussi un rôle important lors des processus de développement, de plasticité et de vieillissement cérébral. Les nAChR jouent bien sûr un rôle crucial dans les différentes étapes de l'addiction à la nicotine. En effet, ces récepteurs sont très exprimés au niveau de l'ATV, structure clé dans le renforcement aux drogues d'abus, ainsi qu'au niveau de la

voie habénulo-interpédonculaire qui a récemment été impliquée dans les mécanismes de rechute et dans la mise en place des symptômes du manque lors d'un sevrage nicotinique (Dani & De Biasi, 2013 ; Antolin-Fontes *et al.*, 2015). En dehors de ce rôle crucial dans la physiopathologie de l'addiction à la nicotine, une perturbation de la modulation nicotinique a aussi été reliée à la survenue de nombreuses pathologies telles que l'épilepsie, la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer (Posadas *et al.*, 2013).

## Outils pharmacologiques

Il existe une large gamme de composés, naturels comme synthétiques, qui agissent sur les nAChR musculaires et neuronaux. Ceux-ci incluent des agonistes entiers et partiels, des antagonistes compétitifs, des bloqueurs du canal, et des modulateurs allostériques positifs ou négatifs (Wonnacott & Barik, 2007). Étant donné que la séquence protéique est très conservée entre les différentes sous-unités nicotiques, peu de ces agents pharmacologiques sont sélectifs pour un sous-type particulier. Le récepteur  $\alpha 7$  est particulier car il existe de nombreux agents sélectifs pour ce sous-type, notamment les antagonistes compétitifs méthyllycaconitine (MLA) et  $\alpha$ -bungarotoxine, l'agoniste choline, ou le modulateur allostérique positif PNU 120596. Pour les récepteurs hétéromériques, il existe quelques composés relativement sélectifs, comme la dihydro- $\beta$ -érythroïdine (DH $\beta$ E, antagoniste  $\beta 2^*$ ), la mécamylamine (MEC) ou la 18-méthoxycoronaridine (18-MC, antagoniste sélectif  $\alpha 3\beta 4$ ). Certaines toxines peptidiques naturelles de venin de serpents ou d'escargots marins de la famille des conidae sont très sélectives pour un sous-type, mais ces composés ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, et leur utilisation *in vivo* n'est théoriquement possible qu'en injection locale. De plus, ces toxines ont en général une très haute affinité pour leur cible, ce qui rend leur effet quasi-irréversible. Un intérêt de la pharmacologie est de pouvoir activer/inhiber de manière aiguë et réversible un (ou plusieurs) sous-types de récepteurs. Par exemple, l'injection systémique de MEC est utilisée pour précipiter les symptômes de manque à la nicotine (Salas *et al.*, 2009). Un autre avantage de la pharmacologie est, en injection locale, d'avoir une précision anatomique. L'injection de 18-MC dans la mHb et l'IPN, par exemple, semble moduler l'auto-administration de nicotine (Glick *et al.*, 2011 ; Jackson *et al.*, 2013) ainsi que la libération de dopamine dans le noyau accumbens après application aiguë de nicotine (McCallum *et al.*, 2012), indiquant le rôle important de ces deux voies neuronales dans l'addiction à la nicotine.

## Délétion de gène

Les souris *knock-out* pour les différentes sous-unités ont permis de belles avancées dans la compréhension des circuits nicotiques (Changeux, 2010b ; Drenan & Lester, 2012). L'utilisation d'une lignée de souris *knock-out* pour

la sous-unité  $\beta 2$  ( $\beta 2^{-/-}$ ) a notamment permis de mettre en évidence le rôle de cette sous-unité dans le renforcement à la nicotine (Picciotto *et al.*, 1998) et dans les comportements sociaux (Granon *et al.*, 2003) et locomoteurs (Avale *et al.*, 2008). La sous-unité  $\alpha 4$  est souvent associée à la sous-unité  $\beta 2$  et de ce fait les souris  $\alpha 4^{-/-}$  présentent un phénotype assez proche des souris  $\beta 2^{-/-}$  : le relargage de dopamine et l'augmentation de la locomotion évoqués par la nicotine sont diminués (Marubio *et al.*, 2003) et l'auto-administration de nicotine est abolie chez ces souris (Pons *et al.*, 2008; Exley *et al.*, 2011). Les souris  $\alpha 6^{-/-}$  présentent un relargage réduit de dopamine dans le striatum consécutivement à l'administration de nicotine (Champtiaux *et al.*, 2002) et l'auto-administration intraveineuse de nicotine est abolie (Pons *et al.*, 2008). Les souris  $\beta 4^{-/-}$  sont moins anxieuses (Salas *et al.*, 2003) et présentent moins de symptômes de manque lors d'un sevrage nicotinique (Salas *et al.*, 2004). Les souris  $\alpha 3^{-/-}$  quant à elles meurent prématurément (Xu *et al.*, 1999). Les souris  $\alpha 7^{-/-}$  présentent des phénotypes subtils, avec notamment des déficits attentionnels (Young *et al.*, 2004), et pas d'altération de l'effet renforçant de la nicotine (Naylor *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2006). La sous-unité  $\alpha 5$  ne participe pas directement à la liaison de la nicotine, néanmoins les souris invalidées pour ce gène sont moins sensibles à la nicotine : elles s'auto-administrent à des doses plus élevées et consomment de plus fortes doses (Fowler *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2013) et ne présentent pas les symptômes somatiques du manque à la nicotine (Salas *et al.*, 2009).

### Gain de fonction

L'invalidation d'une sous-unité nicotinique permet de montrer que cette sous-unité est nécessaire à une fonction physiologique. Cependant, elle ne permet pas de montrer que cette sous-unité est suffisante à la fonction. De plus, la délétion d'un gène peut s'accompagner de compensations développementales. Afin de pallier ces limites, une approche pharmacogénétique a été développée, avec la création de lignées de souris exprimant des nAChR mutants hypersensibles (pour revue voir Drenan & Lester, 2012). Les mutations ponctuelles mises en jeu concernent un résidu leucine très conservé en position 9' du segment transmembranaire M2, et ont le plus souvent pour conséquence une augmentation de la sensibilité des nAChR aux agonistes. De faibles concentrations systémiques de nicotine, normalement « inertes », sont utilisées pour activer sélectivement ces récepteurs mutants, et ainsi délimiter leurs rôles *in vivo*. Cette stratégie a été appliquée aux sous-unités  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  et  $\alpha 9$ . Les mutations L9' sur  $\alpha 4$  ont notamment permis d'impliquer cette sous-unité dans l'anxiété (Labarca *et al.*, 2001) et la sensibilisation et le renforcement à la nicotine (Labarca *et al.*, 2001; Tapper *et al.*, 2004). Une mutation équivalente pour la sous-unité  $\alpha 6$  (L9'S) a permis de montrer un rôle de cette sous-unité dans l'hyperactivité locomotrice spontanée et induite par la nicotine (Drenan *et al.*, 2008, 2010). De plus, le relargage de dopamine semble altéré chez ces souris. Une autre

approche a consisté à générer une lignée de souris (appelée Tabac) dans laquelle la sous-unité  $\beta 4$  est surexprimée dans ses sites endogènes, à savoir principalement l'IPN et la mHb (Frahm *et al.*, 2011). Les souris Tabac montrent une augmentation des courants nicotiques dans la mHb, et une aversion à la nicotine, qui semble être médiée par la voie habénulo-interpédonculaire.

### Réexpression virale

Les souris transgéniques présentées ci-dessus ne peuvent cependant pas démontrer dans quelle région du cerveau les sous-unités exercent leurs rôles respectifs. Pour répondre à ses questions, et exclure d'éventuels problèmes développementaux, la technique de réexpression virale a été mise en œuvre. Cette technique consiste à réintroduire localement, à l'aide de vecteurs viraux, chez la souris *knock-out*, le gène codant pour la sous-unité manquante. La réintroduction de récepteurs  $\beta 2^*$  localement au niveau de l'ATV a notamment permis de restaurer le profil de décharge des neurones dopaminergiques et l'auto-administration de nicotine (Maskos *et al.*, 2005; Mameli-Engvall *et al.*, 2006; Tolu *et al.*, 2012), ainsi que la balance exploitation/exploration (Naudé *et al.*, 2016). Au niveau du cortex préfrontal, la réintroduction de  $\beta 2$  restaure les processus attentionnels (Guillem *et al.*, 2011) et l'exploration de la nouveauté (Bourgeois *et al.*, 2012), qui sont altérés chez les souris *knock-out*. La réexpression de la sous-unité  $\beta 4$  dans l'IPN et la mHb ont permis de renforcer l'hypothèse d'un rôle de la voie habénulo-interpédonculaire dans le renforcement à la nicotine chez la souris (Harrington *et al.*, 2016). La réexpression sélective d' $\alpha 6$  dans l'ATV permet de restaurer l'auto-administration de nicotine (Pons *et al.*, 2008). En ce qui concerne  $\alpha 5$ , la réexpression dans la mHb et l'ATV restaurent respectivement la consommation (Fowler *et al.*, 2011) et le renforcement pour de faibles doses de nicotine (Morel *et al.*, 2013).

Malgré des avancées considérables dans la compréhension de la modulation nicotinique des circuits neuro-naux, les modèles génétiques et pharmacologiques évoqués précédemment ne permettent pas de résoudre totalement les rôles des différents nAChR dans la physiopathologie des circuits où ils sont exprimés. La diversité dans l'assemblage des différentes sous-unités, les modifications de la stoechiométrie des pentamères, la distribution anatomique complexe des différents nAChR au niveau tissulaire et/ou subcellulaire ainsi que des profils d'expression complexes au cours du développement sont autant de défis que la recherche sur les nAChR impose aujourd'hui. Les outils pharmacologiques, même lorsqu'ils sont très sélectifs pour une isoforme, restent difficiles à utiliser, notamment *in vivo* en application locale où les concentrations réelles et les pharmacocinétiques sont non contrôlables. Il apparaît donc indispensable de développer de nouveaux outils permettant un contrôle des différents nAChR avec une excellente résolution spatio-temporelle (stimulation optique) et une spécificité pharmacologique.

## Photopharmacologie des récepteurs nicotiques

Les outils photopharmacologiques sont des ligands qui sont capables de changer de forme, et donc d'activité biologique, sous l'action de la lumière (Figure 1). Ils incorporent dans leur structure un groupement photo-isomérisable, tel l'azobenzène, qui change de configuration en fonction de la longueur d'onde utilisée. L'azobenzène possède de nombreux avantages qui expliquent son succès en photopharmacologie (Mouro *et al.*, 2013) :

- la photo-isomérisation induit un changement profond de la géométrie de la molécule, de plane et étendue (*trans*) à tridimensionnelle et recourbée (*cis*, Figure 3A), et une augmentation de sa polarité (de 0 à 3 Debye) ;
- la photo-isomérisation *trans-cis* s'effectue classiquement avec des longueurs d'onde dans l'UV proche (340–390 nm), tandis que la photoisomérisation *cis-trans* s'effectue soit lentement dans le noir (secondes-jours), soit rapidement dans le bleu-vert (440–520 nm). Il est à noter que les spectres d'absorption ainsi que les cinétiques de relaxation thermique dans le noir sont modulables, par l'introduction de groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs sur les cycles aromatiques de l'azobenzène ;
- les spectres d'absorption des deux isomères sont très différents (Figure 3B), ce qui permet d'obtenir une photo-conversion quasi-totale en utilisant les longueurs d'onde adéquates. Il est également possible de contrôler le pourcentage de chaque isomère, et donc le degré de photo-contrôle du processus biologique, en utilisant soit des longueurs d'onde intermédiaires, soit des intensités lumineuses différentes ;
- l'azobenzène est une molécule de petite taille, facile à modifier chimiquement, et pouvant être relativement aisément incorporée dans un pharmacophore ;
- la photo-isomérisation de molécules individuelles d'azobenzène se déroule dans des échelles de temps (picosecondes) bien plus rapides que les processus biologiques à contrôler ;
- l'azobenzène ne photo-blanchit pas, permettant un grand nombre de cycles de photo-isomérisation sans fatigue.

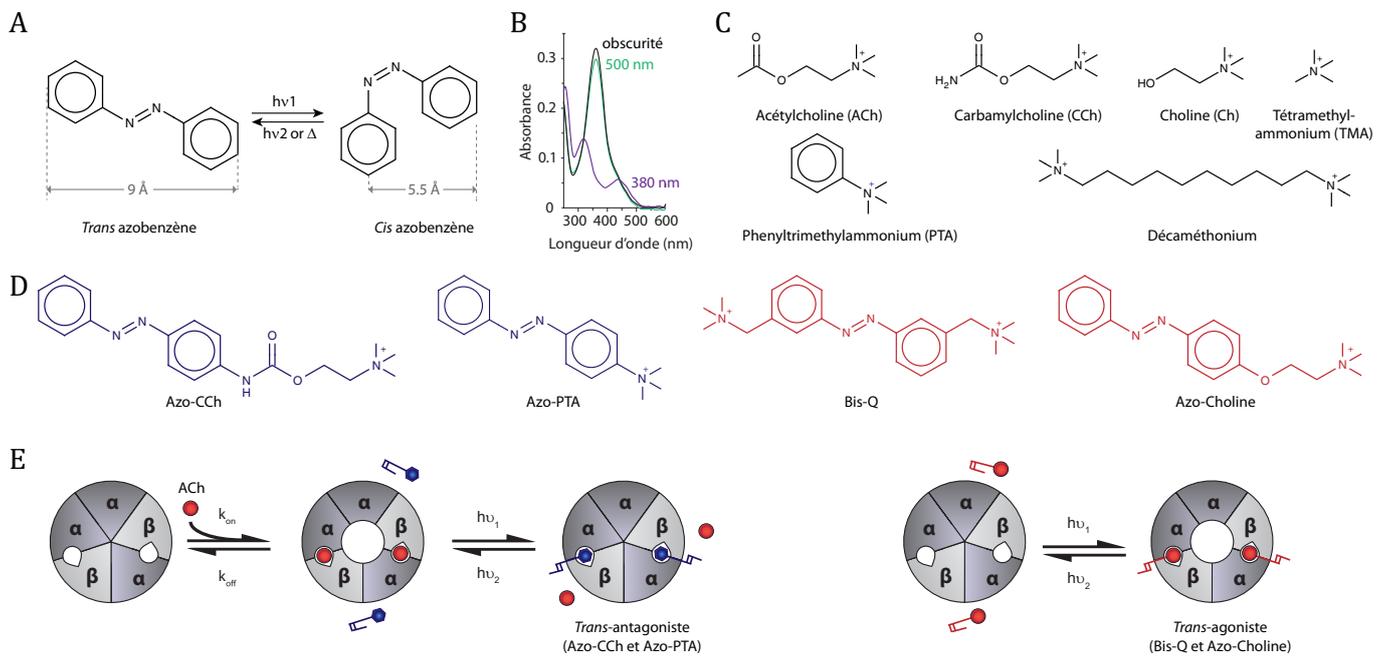
L'ensemble de ces propriétés photochimiques fait de l'azobenzène un candidat idéal pour le contrôle photopharmacologique de protéines natives.

Les nAChR musculaires sont les premiers récepteurs à avoir été contrôlés optiquement à l'aide de *photoswitches*, à la fin des années 1960, (pour revues, voir Gurney & Lester, 1987 ; Damijonaitis *et al.*, 2016). Plusieurs *photoswitches* ont été développés, en couplant des groupements azobenzène à différents agonistes comme la carbamylcholine (CCh), le phényltriméthylammonium (PTA), le tétraméthylammonium (TMA) ou la choline (Ch) (Figure 3C–D). L'azo-CCh et l'azo-PTA se sont en fait révélés être des antagonistes photosensibles plutôt que des agonistes (Deal *et al.*, 1969). Ces composés peuvent inhiber, de manière

photo-réversible, la dépolarisation induite par la CCh sur l'électroplaque de l'anguille électrique, en agissant sur les nAChR de type musculaire. Pour les deux *photoswitches*, l'inhibition est plus forte dans le noir ou sous lumière visible, quand les azobenzènes sont en *trans*, que sous illumination UV (320 nm), lorsqu'ils sont en *cis* : il s'agit donc de *trans*-antagonistes (Figure 3E). L'introduction du groupement azobenzène semble cependant convertir les agonistes CCh et PTA en antagonistes. Le mécanisme d'activation des nAChR passe par une constriction des sites ACh (Nemecz *et al.*, 2016) ; il est probable que le groupement azobenzène, de par son encombrement stérique, empêche les réorganisations structurales menant à l'ouverture du canal. Il a par ailleurs été montré que l'azo-CCh bloque aussi, de manière non compétitive, le pore du nAChR musculaire de façon photo-réversible, avec un meilleur blocage pour l'isomère *cis* (Lester *et al.*, 1979). Ce *photoswitch* a permis pour la première fois de démontrer, au niveau moléculaire, l'existence d'un mécanisme de bloqueur de canal ouvert. D'autres antagonistes photo-isomérisables ont par la suite été utilisés pour mesurer directement, par photo-isomérisation flash, les cinétiques de dissociation du récepteur (Krouse *et al.*, 1985).

Le premier agoniste photochromique des nAChR musculaires à avoir été développé est le BisQ (voir structure Figure 3D) (Bartels *et al.*, 1971). Ce *photoswitch* possède deux ammoniums quaternaires et ressemble structurellement au décaméthonium (Figure 3C), où la chaîne hydrocarbonée aurait été substituée par un groupement azobenzène. La photo-isomérisation permet de changer drastiquement la distance entre les deux ammoniums quaternaires, ce qui induit un changement tout aussi drastique d'activité biologique. Le *trans* BisQ est un agoniste puissant et sélectif : 500 fois plus puissant que la CCh et 50 fois plus puissant que l'ACh pour dépolariser l'électroplaque d'anguille électrique. Son efficacité est en revanche plus faible, similaire au décaméthonium, qui est un agoniste partiel du nAChR musculaire. L'isomère *cis* est quant à lui quasiment inactif (<1 %). Le BisQ est donc un *trans* agoniste (Figure 3E) (Wassermann *et al.*, 1979) qui a été utilisé pour photo-contrôler directement et réversiblement le potentiel de membrane de l'électroplaque. Les propriétés photochimiques et structurellement contraintes du BisQ ont également été mises à profit pour définir la topologie des sites agonistes du nAChR musculaire (Wassermann & Erlanger, 1981), et notamment montrer le caractère hydrophobe de ce site (Wassermann *et al.*, 1979). Des expériences de photo-isomérisation flash du BisQ ont permis de faire un saut de concentration ultra-rapide en agoniste (ordre de la  $\mu$ s) (Nass *et al.*, 1978 ; Chabala *et al.*, 1986), et de confirmer que le nAChR musculaire a besoin de deux molécules d'agonistes pour s'activer (Sheridan & Lester, 1982).

Le BisQ est cependant, comme le décaméthonium, sélectif des nAChR musculaires et ne permet pas de photo-sensibiliser les récepteurs neuronaux (Damijonaitis *et al.*, 2015). Afin de photo-sensibiliser les nAChR neuronaux  $\alpha 7$ , l'équipe de Dirk Trauner a récemment développé l'Azo-Ch (structure Figure 3D), un dérivé photo-isomérisable de la choline



**Figure 3.** Photo-pharmacologie des nAChR. (A) Structures chimiques des azobenzènes *trans* et *cis*. L'isomère *trans* est thermodynamiquement plus stable que le *cis* et prédomine dans l'obscurité. Une illumination avec une longueur d'onde courte ( $h\nu_1$ , classiquement dans l'UV proche 340–390 nm) photo-isomérise l'azobenzène en forme *cis*. L'isomère *cis* se relaxe en *trans* soit spontanément dans le noir ( $\Delta$ , s-jours), soit rapidement (ms) sous l'action d'une longueur d'onde plus grande ( $h\nu_2$ , classiquement dans le bleu ou le vert 440–520 nm); (B) Spectres d'absorption UV-visible dans un tampon PBS du MAHoCh, un ligand photo-isomérisable des nAChR (voir structure Figure 4) dans l'obscurité (*trans*), sous lumière verte 500 nm (principalement *trans*) et sous lumière UV 380 nm (principalement *cis*) (d'après Tochitsky *et al.*, 2012); (C) Structures chimiques de différents agonistes des nAChR. L'acétylcholine (ACh) et la carbamylcholine (CCh) sont des agonistes entiers non sélectifs. La choline (Ch) est un agoniste entier sélectif des nAChR  $\alpha 7$ . Les tétraméthylammonium (TMA), phényltriméthylammonium (PTA) et décaméthonium sont des agonistes partiels, sélectifs des nAChR musculaires; (D) Structures chimiques de quatre ligands photochromiques des nAChR (isomères *trans*). L'azo-CCh et l'azo-PTA (en bleu) sont des antagonistes des nAChR musculaires. Le Bis-Q (rouge) est un agoniste partiel sélectif des nAChR musculaires. L'azocholine (rouge) est un agoniste entier sélectif des nAChR  $\alpha 7$ ; (E) Schématisation d'un *trans* antagoniste (gauche, bleu) et d'un *trans* agoniste (droite, rouge) pour les nAChR. Le *trans* antagoniste inhibe la liaison de l'agoniste (rouge), et donc l'activation du récepteur, sous forme *trans* mais pas *cis*. Le *trans* agoniste se lie au récepteur et l'active sous forme *trans*, mais pas *cis*.

(Damijonaitis *et al.*, 2015). L'Azo-Ch est un agoniste puissant des nAChR  $\alpha 7$  sous forme *trans* (440 nm), mais pas *cis* (360 nm) (Figure 3E). Ce *photoswitch* a été utilisé *in vitro* pour dépolariser des neurones sensoriels de ganglions de la racine dorsale de rats où ces récepteurs sont exprimés, mais aussi *ex vivo* sur des tranches d'hippocampe de souris afin de moduler optiquement la décharge neuronale, et enfin *in vivo* pour contrôler le comportement de nage chez *C. elegans*.

## Pharmacologie optogénétique des récepteurs nicotiques

La pharmacologie optogénétique (Figure 1) combine la précision spatio-temporelle du contrôle optique et la spécificité du ciblage génétique (Kramer *et al.*, 2013). Le ciblage pharmacologique provient de l'ancrage covalent d'un *photoswitch* sur un récepteur génétiquement modifié.

Le point d'ancrage est incorporé à la surface du récepteur *via* une mutation ponctuelle en cystéine. La cystéine est un acide aminé de choix, car elle possède une fonction thiol nucléophile, qui va pouvoir réagir rapidement (quelques minutes), efficacement et très sélectivement avec des fonctions électrophiles de type maléimide. De plus, l'introduction d'une seule mutation cystéine ne perturbe généralement la fonction de la protéine cible que de manière minimale, voire inexistante. Enfin, bien que le maléimide puisse marquer d'autres protéines de surface ayant des cystéines accessibles, le photo-contrôle demeure spécifique de la protéine mutante, sans effet hors cible, et ceci pour deux raisons : premièrement, les cystéines libres sont peu nombreuses à la surface des cellules, mais surtout, la spécificité d'action de la lumière provient de l'ancrage du *photoswitch* à une distance extrêmement précise du site pharmacologique. Il est donc fort peu probable qu'une protéine non cible soit, après conjugaison avec le *photo-*

*switch*, rendue photosensible. Afin de trouver le point d'attache idéal, il est nécessaire de scanner la surface du récepteur à proximité du site de liaison, en mutant les acides aminés un à un en cystéine, et cette étape est grandement facilitée par la modélisation moléculaire (Lemoine *et al.*, 2016). Il n'existe en général qu'un nombre très limité de mutations cystéine qui permettent de photosensibiliser un récepteur, démontrant une nouvelle fois la spécificité de la méthode.

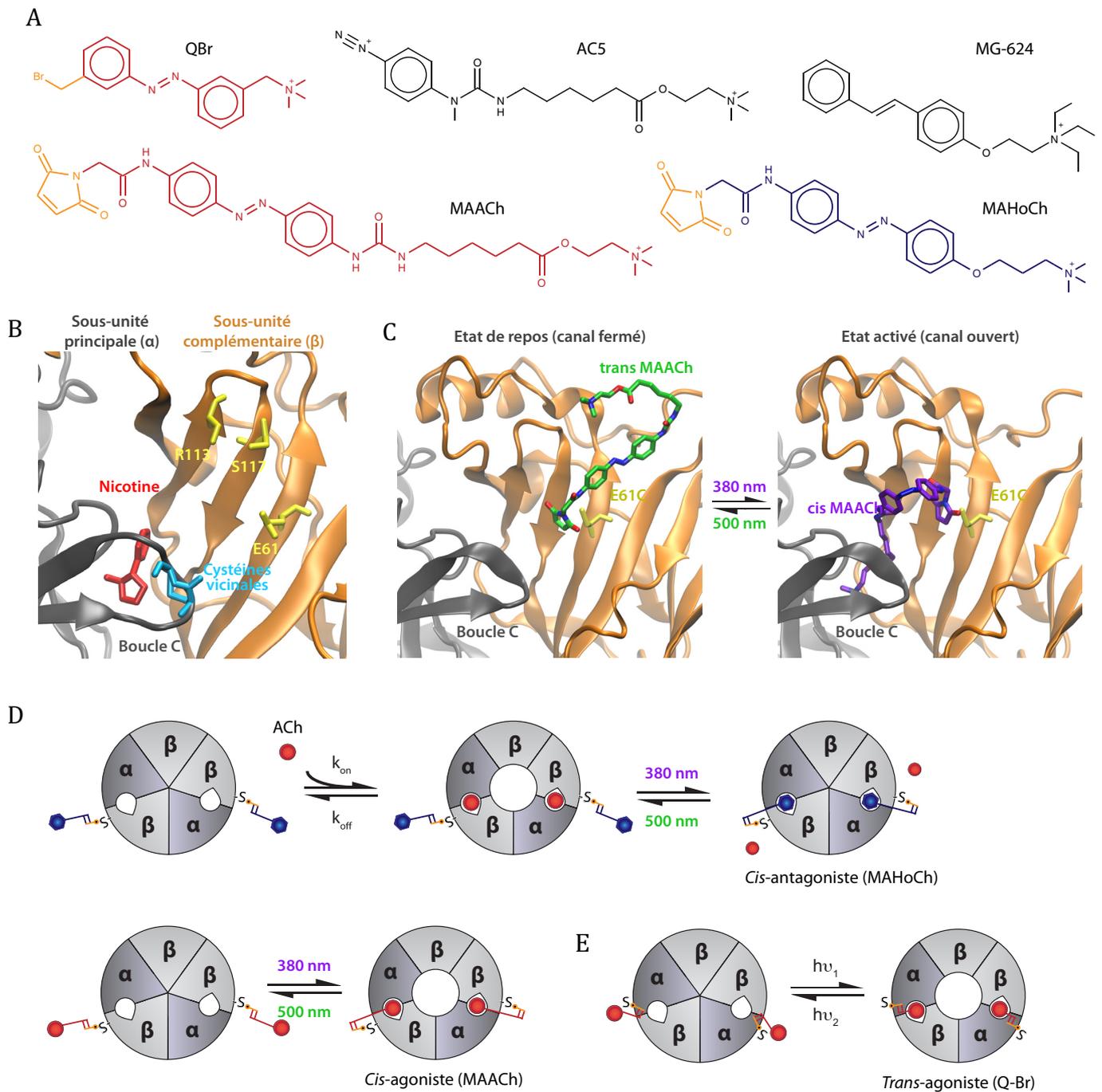
Le nAChR a de nouveau été le premier récepteur sur lequel a été greffé de manière covalente un ligand photochromique attachable (LPA), et ce bien avant que la biologie moléculaire ne permette d'incorporer des résidus cystéine par mutagenèse dirigée (Bartels *et al.*, 1971). Dans ce travail fondateur, les auteurs ont utilisé le *photoswitch* réactif aux cystéines QBr (Figure 4A), dérivé de l'agoniste photosensible BisQ (Figure 3D), et ont pris avantage de la présence fortuite dans le site ACh d'une paire de cystéines vicinales (Figure 4B). Ces cystéines sont naturellement engagées dans un pont disulfure, mais peuvent être réduites sélectivement par une faible concentration de dithiothréitol (DTT) afin d'être marquées par des agonistes covalents (Silman & Karlin, 1969). Comme pour le BisQ, QBr est un agoniste du nAChR musculaire et sa forme active après attachement covalent est l'isomère *trans* (Lester *et al.*, 1980). Ce *photoswitch* attaché a permis de montrer que les cinétiques d'ouverture du canal sont dominées par des transitions intramoléculaires, et semble suggérer, contrairement à ce qui était attendu, qu'une seule molécule d'agoniste pourrait ouvrir le canal, et ce de manière furtive (Lester *et al.*, 1980 ; Chabala & Lester, 1986). Les cystéines vicinales sont cependant présentes sur toutes les sous-unités  $\alpha$  des nAChR, ce qui ne permet pas l'attachement sélectif de QBr sur un sous-type de nAChR particulier. De plus, l'utilisation nécessaire d'un agent réducteur comme le DTT proscrit l'utilisation de QBr pour des approches physiologiques *in vivo*.

Avec l'avènement de la biologie moléculaire et de la biologie structurale, il est maintenant possible d'incorporer une mutation cystéine à une position désirée sur un récepteur, afin d'y attacher de manière sélective un LPA. Les premières structures atomiques des sites ACh du nAChR sont parvenues d'études cristallographiques de l'*acetylcholine binding protein* (AChBP) (Brejc *et al.*, 2001 ; Celie *et al.*, 2004), une protéine soluble homologue au domaine extracellulaire des nAChR. La structure de l'AChBP en complexe avec la CCh (Celie *et al.*, 2004) a notamment permis de concevoir rationnellement les premiers nAChR neuronaux photo-contrôlables (LinAChR) (Tochitsky *et al.*, 2012). La première structure tridimensionnelle du récepteur entier n'est devenue disponible que très récemment (Morales-Perez *et al.*, 2016). Deux types de LPA ont été conçus pour le photo-contrôle spécifique de nAChR neuronaux : un agoniste (maléimide azobenzène acétylcholine, ou MAACH) et un antagoniste (maléimide azobenzène homocholine, ou MAHoCh), dont les structures chimiques sont inspirées d'un marqueur de photo-affinité agoniste entier des

nAChR musculaires (AC5) (Mourot *et al.*, 2006) et d'un antagoniste compétitif (MG-624) (Gotti *et al.*, 1998), respectivement (structures Figure 4A). Pour le MAACH, un espaceur flexible a été placé entre les groupements ACh et azobenzène, indispensable pour conserver des propriétés agonistes (Mourot *et al.*, 2006 ; Krieger *et al.*, 2008). Pour le MAHoCh en revanche, l'azobenzène a été placé directement sur le groupement homocholine, afin de créer un encombrement stérique et d'empêcher la constriction du site, et donc l'activation du récepteur (Nemecz *et al.*, 2016). Pour l'attachement covalent du MAACH, sept mutants cystéine ponctuels de la sous-unité  $\beta_4$ , qui correspond à la partie complémentaire du site ACh, ont été générés. La position de ces cystéines a été choisie selon les résultats du *docking* virtuel de *trans* et *cis* MAACH dans le site ACh. Le but était d'obtenir un récepteur qui soit inerte dans le noir, et activable sous lumière violette, quand le MAACH est en *cis*. Le criblage a été réalisé en oocyte de xénope sur le récepteur  $\alpha_4\beta_4$  qui désensibilise très peu. Sur les sept mutants cystéine, trois peuvent être activés par la lumière violette et désactivés par la lumière verte (E61C, R113C et S117C, Figure 4B) après marquage avec le MAACH. Ces trois résidus sont équidistants du site agoniste (10,5–12 Å). La Figure 4C montre l'effet de la lumière sur le MAACH attaché à la cystéine en position 61, et qui positionne son groupement ACh dans le site agoniste uniquement en configuration *cis*. Les mutants  $\beta_4$  cystéines peuvent être exprimés avec  $\alpha_3$  pour produire des récepteurs  $\alpha_3\beta_4$  photo-activables. De plus, les mutations ont pu être transposées facilement sur la sous-unité  $\beta_2$ , qui est très homologue à  $\beta_4$ , pour produire des LinAChR  $\alpha_4\beta_2$  photo-activables. L'amplitude des courants induits par la lumière n'est que d'environ 7–17 % des courants induits par l'ACh saturante, car le MAACH est en fait un agoniste partiel des récepteurs hétéromériques neuronaux (A. Mourot, non publié). Le mutant E61C peut également servir de point d'ancrage pour l'antagoniste photo-isomérisable MAHoCh, pour produire des récepteurs  $\alpha_3\beta_4$  et  $\alpha_4\beta_2$  photo-inhibables. Le courant induit par l'ACh est alors inhibé sous lumière violette, mais inchangé sous lumière verte ou dans le noir. Les mutants  $\beta_4$  et  $\beta_2$  E61C permettent donc un contrôle bi-directionnel (photo-activation et –inhibition) des récepteurs hétéromériques neuronaux, après marquage avec MAACH ou MAHoCh, respectivement. De manière importante, que le récepteur soit marqué par MAACH ou MAHoCh, il reste activable par l'ACh dans le noir ou sous lumière verte (*photoswitch* en *trans*), avec des EC50 proches de celles du type sauvage, mais devient photo-contrôlable sous lumière violette (*cis*).

## Perspectives

Au niveau neuronal, l'acétylcholine active les nAChR et agit plus à la manière d'un neuromodulateur que d'un neurotransmetteur synaptique : elle altère l'excitabilité neuronale, influence le relargage de neurotransmetteurs, induit de la plasticité synaptique, coordonne la décharge neuronale de par sa transmission volumique, et donc modifie l'état global de réseaux de neurones (Picciotto



**Figure 4.** Pharmacologie optogénétique des nAChR. (A) Structures chimiques de ligands photochromiques attachables (LPA) et de ligands ayant servi à leur *design*. Le QBr est un agoniste photo-isomérisable utilisé sur le nAChR musculaire, structurellement analogue au BisQ (Figure 3D). Il possède une fonction bromoacétyl (orange) qui est réactive aux thiols. L'AC5 est un marqueur de photoaffinité aux propriétés agonistes ayant servi au *design* de MAACH, agoniste photo-isomérisable attachable. Le MG-624 est un antagoniste ayant servi au *design* du MAHoCh, antagoniste photo-isomérisable attachable. MAACH et MAHoCh possèdent tous les deux un groupement maléimide (orange) qui est réactif aux thiols ; (B) Structure tridimensionnelle du site agoniste du nAChR  $\alpha 4\beta 2$  (PDB ID : 5KXI) en complexe avec une molécule de nicotine (rouge). Le site agoniste est à l'interface entre la sous-unité principale  $\alpha$  (grise) et la sous-unité complémentaire  $\beta$  (orange). Les cystéines vicinales (voisines) (bleu) sur la boucle C sont conservées sur toutes les sous-unités  $\alpha$  du nAChR et sont engagées dans un pont disulfure. Ce pont peut être réduit par le DTT pour permettre l'ancrage covalent du QBr et la photo-activation du nAChR musculaire de type sauvage. La mutation ponctuelle des résidus E61, S113 ou R117 (jaune) en cystéine sur la sous-unité  $\beta 2$  ou  $\beta 4$  permet l'ancrage covalent du MAACH et la photo-activation des nAChR mutés. Seul le mutant E61C permet l'ancrage du MAHoCH et la photo-inhibition du nAChR. (C) Après attachement covalent sur le mutant E61C, le MAACH en configuration *trans* (dans le noir ou sous lumière verte) est dans l'impossibilité de positionner son groupement ACh dans le site agoniste, derrière la boucle C. Le récepteur reste donc fermé, mais fonctionnel, l'ACh pouvant s'y lier pour l'activer. Sous lumière

*et al.*, 2012). Les neurones cholinergiques projettent de manière très diffuse sur l'ensemble du SNC, et activent de nombreux nAChR différents, ce qui rend l'étude de ce système complexe. Pouvoir manipuler la neuromodulation nicotinique *in vivo*, avec une précision spatio-temporelle et possiblement pharmacologique, permettrait de réelles avancées dans la compréhension de ce système. La mise en œuvre *in vivo* chez le rongeur des outils photochimiques présentés ici nécessite cependant de surmonter les quelques défis suivants.

### Améliorer les propriétés pharmacologiques des *photoswitchs*

Les *photoswitchs* diffusibles des nAChRs sont tous actifs sous forme *trans* et inactifs sous forme *cis*. Étant donné que l'isomère *trans* prédomine dans le noir, il est nécessaire d'illuminer la préparation biologique avec la lumière UV proche si l'on veut que le composé soit inactif, ce qui engendre certaines contraintes expérimentales. Il est donc crucial de développer des agonistes et antagonistes, notamment pour les nAChR neuronaux hétéromériques, qui soient actifs sous forme *cis*, et donc inactifs dans le noir. Par ailleurs, il est crucial que la différence d'activité entre les deux isomères soit drastique, afin d'avoir un contrôle *on/off* maximal du processus biologique concerné. Ces deux conditions ont récemment été réunies, pour un inhibiteur « *photoswitchable* » de la dynamique des microtubules, qui est inactif en *trans* (dans le noir), et qui possède une différence d'activité de 250 fois entre les deux isomères (Borowiak *et al.*, 2015).

### Délivrer la lumière

La plupart des *photoswitchs* présentés dans cette revue ont besoin de lumière dans l'UV proche (340–390 nm) pour s'isomériser en *cis*. Ces longueurs d'onde pénètrent peu dans les tissus, et peuvent potentiellement être cytotoxiques. Il est cependant relativement facile de déplacer vers le rouge les spectres d'absorption de l'azobenzène, en ajoutant des groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs sur les cycles aromatiques (Mourot *et al.*, 2011, 2017; Kienzler *et al.*, 2013; Rullo *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2015). Certains de ces dérivés possèdent même un coefficient d'absorption 2-photons à 850 nm suffisant pour l'activation 2-photons profonde dans les tissus (Carroll

*et al.*, 2015). Les intensités lumineuses nécessaires pour photo-isomériser les groupements azobenzènes sont du même ordre de grandeur que celles utilisées pour les opsines microbiennes. Les technologies optiques (fibres optiques, LED, etc...) développées pour l'optogénétique classique (Deisseroth, 2015) sont donc utilisables pour la photochimie *in vivo*. De plus, de nouvelles méthodes optiques, telle l'holographie digitale (Vaziri & Emiliani, 2012), permettent de sculpter en trois dimensions une zone de photo-stimulation, ou même de photo-stimuler en parallèle plusieurs zones, ajoutant une nouvelle dimension à la précision spatiale qu'offre la lumière.

### Délivrer le *photoswitch*

Les *photoswitchs* sont de petites molécules solubles qui diffusent généralement bien dans les tissus. Ils doivent cependant être délivrés localement, notamment s'ils contiennent un groupement réactif aux cystéines comme le maléimide. Une simple application locale suffit pour les régions superficielles telles le cortex (Lin *et al.*, 2015) ou la cornée (Mourot *et al.*, 2012). Les *photoswitchs* peuvent également être injectés localement dans l'œil à l'aide d'une seringue (Tochitsky *et al.*, 2014) ou dans des régions profondes du cerveau à l'aide d'une canule et d'un appareil stéréotaxique (Durand-de Cuttoli, Mondoloni et Mourot, non publié). De nouveaux systèmes opto-fluidiques programmables sans fil ont été développés, permettant de délivrer localement une drogue et la lumière grâce à des LED miniatures, et pourraient faciliter l'utilisation d'agents photochimiques *in vivo* (Jeong *et al.*, 2015).

### Délivrer le gène

Pour la pharmacologie optogénétique, le gène codant pour le mutant cystéine doit être également délivré dans le système nerveux. Le gène peut être surexprimé localement à l'aide de virus, mais la surexpression peut potentiellement conduire à un niveau non physiologique d'expression du transgène. Dans le cas du nAChR ou du récepteur GABA<sub>A</sub>, qui sont tous les deux des récepteurs canaux pentamériques, le mutant cystéine doit s'assembler avec d'autres sous-unités endogènes, qui vraisemblablement vont réguler les niveaux d'expression du récepteur à la surface (Lin *et al.*, 2015). Une alternative, certes plus coûteuse en temps et argent, est de développer une souris

---

violette, le MAACH passe en configuration *cis* recourbée, et son groupement ACh peut atteindre le site agoniste et photo-activer le récepteur. Le retour à l'état fermé se fait rapidement sous lumière verte, ou lentement à l'obscurité; (D) Photo-régulation de l'activité des LinAChR par un LPA *cis* antagoniste (haut, MAHoCh) et d'un LPA *cis* agoniste (bas, MAACH). L'introduction d'une cystéine proche du site de liaison du ligand sur la sous-unité  $\beta$  sert de point d'ancrage au LPA. Le MAHoCh et le MAACH possèdent un groupement cystéine-réactif, le maléimide, qui permet d'attacher de manière covalente le LPA sur le récepteur, et ainsi de rendre le nAChR photosensible. En configuration *trans*, dans le vert ou à l'obscurité, le récepteur conserve son activité endogène, puisque le ligand du LPA est éloigné du site de liaison du ligand, ne modifiant pas l'activité naturelle du récepteur. Un flash de lumière violette est suffisant pour que LPA passe d'une configuration *trans* à *cis*, permettant d'amener le ligand dans son site de liaison, et donc de photo-inhiber le récepteur (haut, MAHoCh) ou de photo-activer le récepteur (bas, MAACH); (E) Photo-activation des nAChR par un LPA *trans* agoniste (QBr). Le QBr possède un groupement cytéine-réactif qui permet la liaison covalente du LPA sur les cystéines vicinales (réduites) des sous-unités  $\alpha$ . Le passage d'une configuration *cis* à *trans* permet d'amener le ligand dans son site de liaison et de photo-activer le récepteur musculaire.

transgénique qui porte naturellement la mutation cystéine et respecte les sites et niveaux d'expression endogènes du récepteur. La transduction virale a néanmoins l'avantage de pouvoir cibler l'expression du transgène sur un type cellulaire donné, en utilisant, par exemple, le système Cre-Lox (Deisseroth, 2015), ou dans une région anatomiquement définie, et ainsi de pouvoir étudier distinctement les rôles pré- vs post-synaptiques d'un sous-type de récepteur dans la transmission neuronale.

## Marquage covalent

Pour la pharmacologie optogénétique encore, le *photo-switch* doit s'ancrer de manière covalente sur le mutant cystéine. Cette cystéine doit donc être disponible et non oxydée. Un agent réducteur tel le TCEP peut être utilisé (Lin *et al.*, 2015) mais, selon notre expérience, n'est pas indispensable (Durand-de Cuttoli, Mondoloni et Mourot, non publié). Il existe également d'autres alternatives au marquage maléimide-cystéine. Le *photoswitch* peut, par exemple, être conjugué à un *SNAP tag* (Broichhagen *et al.*, 2015). Le *SNAP tag* est un domaine catalytique, plus volumineux que la substitution cystéine (19,4 kDa), mais pouvant être fusionné à n'importe quelle protéine d'intérêt, ou incorporé à la surface de cellules ciblées génétiquement (Shields *et al.*, 2017), et permettant un marquage covalent extrêmement spécifique et efficace. Une autre alternative est de photo-sensibiliser les récepteurs de manière totalement génétique, sans recourir à la chimie. Il existe, par exemple, des domaines de protéines de plante, tels les domaines LOV, qui sont naturellement photosensibles et peuvent être fusionnés à des protéines pour les rendre photo-contrôlables (pour revue, voir Zhou *et al.*, 2015). Les cinétiques de photo-isomérisation des domaines LOV sont néanmoins bien inférieures à celles des azobenzènes. Enfin, la technique d'incorporation d'acides aminés non naturels permet de photo-sensibiliser récepteurs et canaux, et cette technologie a récemment été mise en œuvre chez la souris *in vivo*, ouvrant de nouvelles possibilités dans la photo-régulation de protéines endogènes (Kang *et al.*, 2013).

Les techniques optiques, optogénétiques et chémogénétiques, permettant de contrôler de manière aiguë, réversible et ciblée l'activité de protéines endogènes continuent de croître et de se diversifier. Ces techniques vont indubitablement changer la façon dont on manipule et étudie le système nerveux au niveau moléculaire, et nous éclairer sur les différentes fonctions des récepteurs et canaux membranaires.

*Remerciements.* Ce travail a été soutenu par l'ANR-JCJC Nicopto, un financement NARSAD Young Investigator de la fondation *Brain & Behavior Research*, et la fondation Medisite. RDC a reçu une bourse de thèse du DIM Cerveau & Pensée, programme de la région Ile-de-France, et une bourse de quatrième année de thèse de la FRM (FDT20170437427). Le laboratoire fait partie du réseau de l'école des neurosciences de

Paris Ile-de-France RTRA et du LABEX BIO-PSY. Nous remercions Philippe Faure (NPS-IBPS) pour la relecture du manuscrit.

## Références

- Antolin-Fontes, B., Ables, J.L., Görlich, A., Ibañez-Tallon, I. (2015). The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. *Neuropharmacology*, 96, 213-222.
- Avale, M.E.M., Faure, P., Pons, S., Robledo, P.P., Deltheil, T. T., David, D.J.D., Gardier, A.M.A., Maldonado, R.R., Granon, S.S., Changeux, J.-P., Maskos, U. (2008). Interplay of beta2\* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc Nat Acad Sci USA*, 105, 15991-15996.
- Banghart, M.R., Borges, K., Isacoff, E.Y., Trauner, D., Kramer, R.H. (2004). Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci*, 7, 1381-1386.
- Banghart, M.R., Mourot, A., Fortin, D.L., Yao, J.Z., Kramer, R.H., Trauner, D. (2009). Photochromic blockers of voltage-gated potassium channels. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 9097-9101.
- Barber, D.M., Schönberger, M., Burgstaller, J., Levitz, J., Weaver, C.D., Isacoff, E.Y., Baier, H., Trauner, D. (2016). Optical control of neuronal activity using a light-operated GIRK channel opener (LOGO). *Chem Sci*, 7, 2347-2352.
- Bartels, E., Wassermann, N.H., Erlanger, B.F. (1971). Photochromic activators of the acetylcholine receptor. *Proc Nat Acad Sci USA*, 68, 1820-1823.
- Berlin, S., Isacoff, E.Y. (2017) Synapses in the spotlight with synthetic optogenetics. *EMBO Rep*, 18, 677-692.
- Berlin, S., Szobota, S., Reiner, A., Carroll, E.C., Kienzler, M.A., Guyon, A., Xiao, T., Trauner, D., Isacoff, E.Y. (2016). A family of photoswitchable NMDA receptors. *eLife*, 5, e12040, 2016 Mar 1, doi: [10.7554/eLife.12040](https://doi.org/10.7554/eLife.12040).
- Borowiak, M., Nahaboo, W., Reynders, M., Nekolla, K., Jalinot, P., Hasserodt, J., Rehberg, M., Delattre, M., Zahler, S., Vollmar, A., Trauner, D., Thorn-Seshold, O. (2015). Photoswitchable inhibitors of microtubule dynamics optically control mitosis and cell death. *Cell*, 162, 403-411.
- Bourgeois, J.P., Meas-Yeadid, V., Lesourd, A.M., Faure, P., Pons, S., Maskos, U., Changeux, J.-P., Olivo-Marin, J.C., Granon, S. (2012). Modulation of the mouse prefrontal cortex activation by neuronal nicotinic receptors during novelty exploration but not by exploration of a familiar environment. *Cereb Cortex*, 22, 1007-1015.
- Brejck, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 411, 269-276.
- Broichhagen, J., Damijonaitis, A., Levitz, J., Sokol, K.R., Leippe, P., Konrad, D., Isacoff, E.Y., Trauner, D. (2015). Orthogonal optical control of a G Protein-coupled receptor with a SNAP-tethered photochromic ligand. *ACS Cent Sci*, 1, 383-393.
- Caporale, N., Kolstad, K.D., Lee, T., Tochitsky, I., Dalkara, D., Trauner, D., Kramer, R.H., Dan, Y., Isacoff, E.Y., Flannery, J.G. (2009). LiGluR restores visual responses in rodent models of inherited blindness. *Mol Ther*, 19, 1212-1219.
- Carroll, E.C., Berlin, S., Levitz, J., Kienzler, M.A., Yuan, Z., Madsen, D., Larsen, D.S., Isacoff, E.Y. (2015). Two-photon brightness of azobenzene photoswitches designed for glutamate receptor optogenetics. *Proc Nat Acad Sci USA*, 112, E776-785
- Celie, P.H.N., van Rossum-Fikkert, S.E., van Dijk, W.J., Brejck, K., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP Crystal structures. *Neuron*, 41, 8-8.

- Chabala, L.D., Lester, H.A. (1986). Activation of Acetylcholine receptor channels by covalently bound agonists in cultured rat myoballs. *J Physiol*, 379, 83-108.
- Chabala, L.D.L., Gurney, A.M., Lester, H.A. (1986). Dose-response of acetylcholine receptor channels opened by a flash-activated agonist in voltage-clamped rat myoballs. *J Physiol*, 371, 407-433.
- Champtiaux, N., Han, Z.-Y., Bessis, A., Rossi, F.M., Zoli, M., Marubio, L., McIntosh, J.M., Changeux, J.-P. (2002). Distribution and pharmacology of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci*, 22, 1208-1217.
- Changeux, J.-P. (2010a). Allosteric receptors: from electric organ to cognition. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 1-38.
- Changeux, J.-P. (2010b). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci*, 11, 1-13.
- Damijonaitis, A., Broichhagen, J., Urushima, T., Hüll, K., Nagpal, J., Laprell, L., Schönberger, M., Woodmansee, D.H., Rafiq, A., Sumser, M.P., Kummer, W., Gottschalk, A., Trauner, D. (2015). AzoCholine enables optical control of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in neural networks. *ACS Chem Neurosci*, 6, 701-707.
- Damijonaitis, A., Barber, D.M., Trauner, D. (2016). The photopharmacology of nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotransmitter*, 3, e1292.
- Dani, J.A., De Biasi, M. (2013). Mesolimbic dopamine and habenulo-interpeduncular pathways in nicotine withdrawal. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3, a012138-8.
- Deal, W.J., Erlanger, B.F., Nachmansohn, D.D. (1969). Photoregulation of biological activity by photochromic reagents. 3. Photoregulation of bioelectricity by acetylcholine receptor inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*, 64, 1230-1234.
- Deisseroth, K. (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci*, 18, 1213-1225.
- Dong, M., Babalhavaeji, A., Samanta, S., Beharry, A.A., Woolley, G.A. (2015). Red-shifting azobenzene photoswitches for *in vivo* use. *Acc Chem Res*, 48, 2662-2670.
- Drenan, R.M., Lester, H.A. (2012). Insights into the neurobiology of the nicotinic cholinergic system and nicotine addiction from mice expressing nicotinic receptors harboring gain-of-function mutations. *Pharmacol Rev*, 64, 869-879.
- Drenan, R.M., Grady, S.R., Whiteaker, P., McClure-Begley, T., McKinney, S., Miwa, J.M., Bupp, S., Heintz, N., McIntosh, J.M., Bencherif, M., Marks, M.J., Lester, H.A. (2008). *In vivo* activation of midbrain dopamine neurons via sensitized, high-affinity  $\alpha 6$  nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron*, 60, 123-136.
- Drenan, R.M., Grady, S.R., Steele, A.D., McKinney, S., Patzlaff, N.E., McIntosh, J.M., Marks, M.J., Miwa, J.M., Lester, H.A. (2010). Cholinergic modulation of locomotion and striatal dopamine release is mediated by  $\alpha 6\alpha 4^*$  nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*, 30, 9877-9889.
- Ellis-Davies, G.C.R. (2007). Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods*, 4, 619-628.
- Exley, R., Maubourguet, N., David, V., Eddine, R., Evrard, A., Pons, S., Marti, F., Threlfell, S., Cazala, P., McIntosh, J.M., Changeux, J.-P., Maskos, U., Cragg, S.J., Faure, P. (2011). Distinct contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 and subunit alpha6 to the reinforcing effects of nicotine. *Proc Nat Acad Sci USA*, 108, 7577-7582.
- Fortin, D.L., Dunn, T.W., Fedorchak, A., Allen, D., Montpetit, R., Banghart, M.R., Trauner, D., Adelman, J.P., Kramer, R.H. (2011). Optogenetic photochemical control of designer  $K^+$  channels in mammalian neurons. *J Neurophysiol*, 106, 488-496.
- Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., Kenny, P.J. (2011). Habenular A5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature*, 471, 597-601.
- Frahm, S., Slimak, M.A., Ferrarese, L., Santos-Torres, J., Antolin-Fontes, B., Auer, S., Filkin, S., Pons, S., Fontaine, J.-F., Tsetlin, V., Maskos, U., Ibañez-Tallon, I. (2011). Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of beta4 and alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron*, 70, 522-535.
- Frank, J.A., Moroni, M., Moshourab, R., Sumser, M., Lewin, G.R., Trauner, D. (2015). Photoswitchable fatty acids enable optical control of TRPV1. *Nat Commun*, 6, 1-11.
- Glick, S.D., Sell, E.M., McCallum, S.E., Maisonneuve, I.M. (2011). Brain regions mediating A3 $\beta$ 4 nicotinic antagonist effects of 18-MC on nicotine self-administration. *Eur J Pharmacol*, 669, 71-75.
- Gotti, C., Balestra, B., Moretti, M., Rovati, G.E., Maggi, L., Rossoni, G., Berti, F., Villa, L., Pallavicini, M., Clementi, F. (1998). 4-Oxystilbene compounds are selective ligands for neuronal nicotinic alphasubunit receptors. *Brit J Pharmacol*, 124, 1197-1206.
- Granon, S., Faure, P., Changeux, J.-P. (2003). Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 100, 9596-9601.
- Guillen, K., Bloem, B., Poorthuis, R.B., Loos, M., Smit, A.B., Maskos, U., Spijker, S., Mansvelter, H.D. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunits in the medial prefrontal cortex control attention. *Science*, 333, 888-891.
- Gurney, A.M., Lester, H.A. (1987). Light-flash physiology with synthetic photosensitive compounds. *Physiol Rev*, 67, 583-617.
- Harrington, L., Viñals, X., Herrera-Solis, A., Flores, A., Morel, C., Tolu, S., Faure, P., Maldonado, R., Maskos, U., Robledo, P. (2016). Role of  $\beta 4^*$  nicotinic acetylcholine receptors in the habenulo-interpeduncular pathway in nicotine reinforcement in mice. *Neuropsychopharmacology*, 41, 1790-1802.
- Jackson, K.J., Sanjakdar, S.S., Muldoon, P.P., McIntosh, J.M., Damaj, M.I. (2013). The A3 $\beta 4^*$  nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine reward and physical nicotine withdrawal signs independently of the A5 subunit in the mouse. *Neuropharmacology*, 70, 228-235.
- Janovjak, H., Szobota, S., Wyart, C., Trauner, D., Isacoff, E.Y. (2010). A light-gated, potassium-selective glutamate receptor for the optical inhibition of neuronal firing. *Nat Neurosci*, 13, 1027-1032.
- Jeong, J.-W., McCall, J.G., Shin, G., Zhang, Y., Al-Hasani, R., Kim, M., Li, S., Sim, J.Y., Jang, K.-I., Shi, Y., Hong, D.Y., Liu, Y., Schmitz, G.P., Xia, L., He, Z., Gamble, P., Ray, W.Z., Huang, Y., Bruchas, M.R., Rogers, J.A. (2015). Wireless optofluidic systems for programmable *in vivo* pharmacology and optogenetics. *Cell*, 162, 662-674.
- Kang, J.-Y., Kawaguchi, D., Coin, I., Xiang, Z., O'Leary, D.D.M., Slesinger, P.A., Wang, L. (2013). *In vivo* expression of a light-activatable potassium channel using unnatural amino acids. *Neuron*, 80, 358-370.
- Kienzler, M.A., Reiner, A., Trautman, E., Yoo, S., Trauner, D., Isacoff, E.Y. (2013). A red-shifted, fast-relaxing azobenzene photoswitch for visible light control of an ionotropic glutamate receptor. *J Am Chem Soc*, 135, 17683-17686.
- Kim, C.K., Adhikari, A., Deisseroth, K. (2017). Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 18, 222-235.
- Kramer, R.H., Mourot, A., Adesnik, H. (2013). Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat Neurosci*, 16, 816-823.

- Krieger, F., Mourot, A., Araoz, R., Kotzbyba-Hibert, F., Molgó, J., Bamberg, E., Goeldner, M. (2008). Fluorescent agonists for the torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *Chem Bio Chem*, 9, 1146-1153.
- Krouse, M.E.M., Lester, H.A., Wassermann, N.H., Erlanger, B. F. (1985). Rates and equilibria for a photoisomerizable antagonist at the acetylcholine receptor of electrophorus electroplaques. *J Gen Physiol*, 86, 235-256.
- Labarca, C., Schwarz, J., Deshpande, P., Schwarz, S., Nowak, M. W., Fonck, C., Nashmi, R., Kofuji, P., Dang, H., Shi, W., Fidan, M., Khakh, B.S., Chen, Z., Bowers, B.J., Boulter, J., Widner, J.M., Lester, H.A. (2001). Point mutant mice with hypersensitive alpha 4 nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proc Nat Acad Sci USA*, 98, 2786-2791.
- Laprell, L., Repak, E., Franckevicius, V., Hartrampf, F., Terhag, J., Hollmann, M., Sumser, M., Rebola, N., DiGregorio, D.A., Trauner, D. (2015). Optical control of NMDA receptors with a diffusible photoswitch. *Nat Commun*, 6, 1-11.
- Le Novère, N., Corringer, P.-J., Changeux, J.-P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol*, 53, 447-56.
- Lemoine, D., Durand-de Cuttoli, R., Mourot, A. (2016). Optogenetic control of mammalian ion channels with chemical photoswitches. *Methods Mol Biol*, 1408, 177-193.
- Lerch, M.M., Hansen, M.J., van Dam, G.M., Szymanski, W., Feringa, B.L. (2016). Emerging targets in photopharmacology. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55, 10978-10999.
- Lester, H.A., Krouse, M.E., Nass, M.M., Wassermann, N.H., Erlanger, B.F. (1979). Light-activated drug confirms a mechanism of ion channel blockade. *Nature*, 280, 509-510.
- Lester, H.A., Krouse, M.E.M., Nass, M.M., Wassermann, N.H., Erlanger, B.F. (1980). A covalently bound photoisomerizable agonist: comparison with reversibly bound agonists at electrophorus electroplaques. *J GenPhysiol*, 75, 207-232.
- Levitz, J., Pantoja, C., Gaub, B., Janovjak, H., Reiner, A., Hoagland, A., Schoppik, D., Kane, B., Stawski, P., Schier, A. F., Trauner, D., Isacoff, E.Y. (2013). Optical control of metabotropic glutamate receptors. *Nature Neurosci*, 16, 507-516.
- Levitz, J., Popescu, A.T., Reiner, A., Isacoff, E.Y. (2016). A toolkit for orthogonal and *in vivo* optical manipulation of ionotropic glutamate receptors. *Front Mol Neurosci*, 9, 163.
- Lin, W.-C., Davenport, C.M., Mourot, A., Vytla, D., Smith, C.M., Medeiros, K.A., Chambers, J.J., Kramer, R.H. (2014). Engineering a light-regulated GABAA receptor for optical control of neural inhibition. *ACS Chem Biol*, 9, 1414-1419.
- Lin, W.-C., Tsai, M.-C., Davenport, C.M., Smith, C.M., Veit, J., Wilson, N.M., Adesnik, H., Kramer, R.H. (2015). A comprehensive optogenetic pharmacology toolkit for *in vivo* control of GABA(a) receptors and synaptic inhibition. *Neuron*, 88, 879-891.
- Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T.H., Changeux, J.-P., Faure, P. (2006). Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron*, 50, 911-921.
- Marubio, L.M., Gardier, A.M., Durier, S., David, D., Klink, R., Arroyo-Jimenez, M.M., McIntosh, J.M., Rossi, F., Champ-tiaux, N., Zoli, M., Changeux, J.-P. (2003). Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci*, 17, 1329-1337.
- Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., Dufour, N., Cloëz-Tayarani, I., Bemelmans, A.P., Mallet, J., Gardier, A.M., David, V., Faure, P., Granon, S., Changeux, J.-P. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, 436, 103-107.
- McCallum, S.E., Cowe, M.A., Lewis, S.W., Glick, S.D. (2012). A3β4 Nicotinic acetylcholine receptors in the medial habenula modulate the mesolimbic dopaminergic response to acute nicotine *in vivo*. *Neuropharmacology*, 63, 434-440.
- Morales-Perez, C.L., Noviello, C.M., Hibbs, R.E. (2016). X-ray structure of the human A4β2 nicotinic receptor. *Nature*, 538, 411-415.
- Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y.A., Marti, F., Lambolez, B., De Biasi, M., Lathrop, M., Fratta, W., Maskos, U., Faure, P. (2013). Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatry*, 19, 930-936.
- Mourot, A., Rodrigo, J., Kotzbyba-Hibert, F., Bertrand, S., Bertrand, D., Goeldner, M. (2006). Probing the reorganization of the nicotinic acetylcholine receptor during desensitization by time-resolved covalent labeling using [3H] AC5, a photoactivatable agonist. *Mol Pharmacology*, 69, 452-461.
- Mourot, A., Kienzler, M.A., Banghart, M.R., Fehrentz, T., Huber, F.M.E., Stein, M., Kramer, R.H., Trauner, D. (2011). Tuning photochromic ion channel blockers. *ACS Chem Neurosci*, 2, 536-543.
- Mourot, A., Fehrentz, T., Le Feuvre, Y., Smith, C.M., Herold, C., Dalkara, D., Nagy, F., Trauner, D., Kramer, R.H. (2012). Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nat Methods*, 9, 396-402.
- Mourot, A., Tochitsky, I., Kramer, R.H. (2013). Light at the end of the channel: optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches. *Front Mol Neurosci*, 6, 1-15.
- Mourot, A., Herold, C., Kienzler, M.A., Kramer, R.H. (2017). Understanding and improving photo-control of ion channels in nociceptors with azobenzene photoswitches. *Brit J Pharmacol*, doi: [10.1111/bph.13923](https://doi.org/10.1111/bph.13923), sous presse.
- Nargeot, J., Lester, H.A., Birdsall, N.J., Stockton, J., Wassermann, N.H., Erlanger, B.F. (1982). A photoisomerizable muscarinic antagonist. Studies of binding and of conductance relaxations in frog heart. *J Gen Physiol*, 79, 657-678.
- Nass, M.M., Lester, H.A., Krouse, M.E. (1978). Response of acetylcholine receptors to photoisomerizations of bound agonist molecules. *Biophys J*, 24, 135-160.
- Naudé, J., Tolu, S., Dongelmans, M., Torquet, N., Valverde, S., Rodriguez, G., Pons, S.E.P., Maskos, U., Mourot, A., Marti, F., Faure, P. (2016). Nicotinic receptors in the ventral tegmental area promote uncertainty-seeking. *Nat Neurosci*, 19, 471-478.
- Naylor, C., Quarta, D., Fernandes, C., Stolerman, I.P. (2005). Tolerance to nicotine in mice lacking alpha7 nicotinic receptors. *Psychopharmacology*, 180, 558-563.
- Nemecz, Á., Prevost, M.S., Menny, A., Corringer, P.-J. (2016). Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligand-gated ion channels. *Neuron*, 90, 452-470.
- Nys, M., Kesters, D., Ulens, C. (2013). Structural insights into cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem Pharmacol*, 86, 1042-1053.
- Picciotto, M.R., Zoli, M., Rimondini, R., Léna, C., Marubio, L.M., Pich, E.M., Fuxe, K., Changeux, J.-P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391, 173-177.

- Picciotto, M.R., Higley, M.J., Mineur, Y.S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76, 116-129.
- Polosukhina, A., Litt, J., Tochitsky, I., Nemargut, J., Sychev, Y., De Kouchkovsky, I., Huang, T., Borges, K., Trauner, D., Van Gelder, R.N., Kramer, R.H. (2012). Photochemical restoration of visual responses in blind mice. *Neuron*, 75, 271-82.
- Pons, S., Fattore, L., Cossu, G., Tolu, S., Porcu, E., McIntosh, J. M., Changeux, J.-P., Maskos, U., Fratta, W. (2008). Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *J Neurosci*, 28, 12318-12327.
- Posadas, I., López-Hernández, B., Ceña, V. (2013). Nicotinic receptors in neurodegeneration. *Current Neuropharmacol*, 11, 298-314.
- Quandt, G., Höfner, G., Pabel, J., Dine, J., Eder, M., Wanner, K.T. (2014). First photoswitchable neurotransmitter transporter inhibitor: light-induced control of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter 1 (GAT1) activity in mouse brain. *J Med Chem*, 57, 6809-6821.
- Rullo, A., Reiner, A., Reiter, A., Trauner, D., Isacoff, E.Y., Woolley, G.A. (2014). Long wavelength optical control of glutamate receptor ion channels using a tetra-ortho-substituted azobenzene derivative. *Chem Commun*, 50, 14613-14615.
- Salas, R., Pieri, F., Fung, B., Dani, J.A., De Biasi, M. (2003). Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor. *J Neurosci*, 23, 6255-6263.
- Salas, R., Pieri, F., De Biasi, M. (2004). Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J Neurosci*, 24, 10035-10039.
- Salas, R., Sturm, R., Boulter, J., De Biasi, M. (2009). Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J Neurosci*, 29, 3014-3018.
- Sandoz, G., Levitz, J., Kramer, R.H., Isacoff, E.Y. (2012). Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABAB signaling. *Neuron*, 74, 1005-1014.
- Schönberger, M., Trauner, D. (2014). A photochromic agonist for  $\mu$ -opioid receptors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53, 3264-3267.
- Schönberger, M., Althaus, M., Fronius, M., Clauss, W., Trauner, D. (2014). Controlling epithelial sodium channels with light using photoswitchable amilorides. *Nat Chem*, 6, 712-719.
- Sheridan, R.E., Lester, H.A. (1982). Functional stoichiometry at the nicotinic receptor. The photon cross section for phase 1 corresponds to two Bis-Q molecules per channel. *J Gen Physiol*, 80, 499-515.
- Shields, B.C., Kahuno, E., Kim, C., Apostolides, P.F., Brown, J., Lindo, S., Mensh, B.D., Dudman, J.T., Lavis, L.D., Tadross, M.R. (2017). Deconstructing behavioral neuropharmacology with cellular specificity. *Science*, 356.
- Silman, I., Karlin, A. (1969). Acetylcholine receptor: covalent attachment of depolarizing groups at the active site. *Science*, 164, 1420-1421.
- Stein, M., Middendorp, S.J., Carta, V., Pejo, E., Raines, D.E., Forman, S.A., Sigel, E., Trauner, D. (2012). Azo-propofols: photochromic potentiators of GABAA receptors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51, 10500-10504.
- Stein, M., Breit, A., Fehrentz, T., Gudermann, T., Trauner, D. (2013). Optical control of TRPV1 channels. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52, 9845-9848.
- Szobota, S., Gorostiza, P., Del Bene, F., Wyart, C., Fortin, D.L., Kolstad, K.D., Tulyathan, O., Volgraf, M., Numano, R., Aaron, H.L., Scott, E.K., Kramer, R.H., Flannery, J.G., Baier, H., Trauner, D., Isacoff, E.Y. (2007). Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron*, 54, 535-545.
- Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 1-18.
- Tapper, A.R., McKinney, S.L., Nashmi, R., Schwarz, J., Deshpande, P., Labarca, C., Whiteaker, P., Marks, M.J., Collins, A.C., Lester, H.A. (2004). Nicotine activation of alpha4\* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*, 306, 1029-1032.
- Tochitsky, I., Banghart, M.R., Mourot, A., Yao, J.Z., Gaub, B., Kramer, R.H., Trauner, D. (2012). Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Chem*, 4, 105-111.
- Tochitsky, I., Polosukhina, A., Degtyar, V.E., Gallerani, N., Smith, C.M., Friedman, A., Van Gelder, R.N., Trauner, D., Kaufer, D., Kramer, R.H. (2014). Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells. *Neuron*, 81, 800-813.
- Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., Zemdegs, J., Pagès, C., Hay, Y.A.H., Lambolez, B., Caboche, J., Gutkin, B., Gardier, A.M., Changeux, J.-P., Faure, P., Maskos, U. (2012). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol Psychiatry*, 18, 382-393.
- Vaziri, A., Emiliani, V. (2012) Reshaping the optical dimension in optogenetics. *Curr Opin Neurobiol*, 22, 128-137.
- Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R.H., Isacoff, E.Y., Trauner, D. (2005). Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol*, 2, 47-52.
- Volgraf, M., Gorostiza, P., Szobota, S., Helix, M.R., Isacoff, E. Y., Trauner, D. (2007). Reversibly caged glutamate: a photochromic agonist of ionotropic glutamate receptors. *J Am Chem Soc*, 129, 260-261.
- Walters, C.L., Brown, S., Changeux, J.-P., Martin, B., Damaj, M.I. (2006). The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology*, 184, 339-344.
- Wassermann, N.H., Erlanger, B.F. (1981). Agents related to a potent activator of the acetylcholine receptor of *Electrophorus electricus*. *Chem Biol Interact*, 36, 251-258.
- Wassermann, N.H., Bartels, E., Erlanger, B.F. (1979). Conformational properties of the acetylcholine receptor as revealed by studies with constrained depolarizing ligands. *Proc Nat Acad Sci USA*, 76, 256-9.
- Wonnacott, S., Barik, J. (2007) Nicotinic ACh Receptors. *Tox Reviews*, 28, 1-20.
- Wu, J., Liu, Q., Tang, P., Mikkelsen, J.D., Shen, J., Whiteaker, P., Yakel, J.L. (2016). Heteromeric  $\alpha 7 \beta 2$  Nicotinic acetylcholine receptors in the brain. *Trends Pharmacol Sci*, 37, 562-574.
- Wyart, C., Del Bene, F., Warp, E., Scott, E.K., Trauner, D., Baier, H., Isacoff, E.Y. (2009). Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature*, 461, 407-410.

- Xu, W., Gelber, S., Orr-Urtreger, A., Armstrong, D., Lewis, R. A., Ou, C.N., Patrick, J., Role, L., De Biasi, M., Beaudet, A.L. (1999). Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Nat Acad Sci USA*, 96, 5746-51.
- Young, J.W., Finlayson, K., Spratt, C., Marston, H.M., Crawford, N., Kelly, J.S., Sharkey, J. (2004). Nicotine improves sustained attention in mice: evidence for involvement of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropsychopharmacology*, 29, 891-900.
- Yue, L., Pawlowski, M., Dellal, S.S., Xie, A., Feng, F., Otis, T.S., Bruzik, K.S., Qian, H., Pepperberg, D.R. (2012). Robust photoregulation of GABAA receptors by allosteric modulation with a propofol analogue. *Nat Commun*, 3, 1095.
- Zhou, X.X., Pan, M., Lin, M.Z. (2015). Investigating neuronal function with optically controllable proteins. *Front Mol Neurosci*, 8, 37.
- Zoli, M., Pistillo, F., Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*, 96, 302-311.
- Zussy, C., Gómez-Santacana, X., Rovira, X., De Bundel, D., Ferrazzo, S., Bosch, D., Asede, D., Malhaire, F., Acher, F., Giraldo, J., Valjent, E., Ehrlich, I., Ferraguti, F., Pin, J.-P., Llebaria, A., Goudet, C. (2016). Dynamic modulation of inflammatory pain-related affective and sensory symptoms by optical control of amygdala metabotropic glutamate receptor 4. *Mol Psychiatry*, doi: [10.1038/mp.2016.223](https://doi.org/10.1038/mp.2016.223). (sous presse)