

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTÉ DE SANTÉ  
DÉPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2022THESE

2022 / TOU3 / 2033

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

**BOURZIK INESS**

**L'APPORT DE L'OPTOGÉNÉTIQUE EN MÉDECINE**

14 juin 2022

Directeur de thèse : Lajoie-Mazenc Isabelle

JURY

Président : Couderc Bettina

1<sup>er</sup> assesseur : Delcourt Nicolas

2<sup>ème</sup> assesseur : Sainte-Marie Yannis

3<sup>ème</sup> assesseur : Delcamp Clement



---

## RÉSUMÉ

---

L'optogénétique associe le domaine optique et le domaine génétique. La méthode consiste à introduire un gène qui code pour une protéine photosensible, appelée opsine, dans une cellule cible afin de la rendre photosensible. Son illumination l'activera ou l'inhibera en fonction du type d'opsine exprimée.

Nommée méthode de l'année par la revue « Nature methods », l'optogénétique permet ainsi un contrôle spatio-temporel précis, en temps réel et réversible afin d'étudier et manipuler la fonctionnalité d'une cellule ou de réseaux cellulaires d'un animal vivant.

La diversité des opsines a permis de développer le domaine de l'optogénétique et d'atteindre des buts variés lors d'expériences *ex-vivo* ou *in-vivo*.

D'abord cantonnée aux neurosciences, aujourd'hui la technique apporte beaucoup à la médecine en termes de connaissances fondamentales et compréhensions physiopathologiques : diverses expériences sur des rongeurs ont été menées pour mieux comprendre certains troubles neurologiques, psychiatriques et ophtalmiques.

Elle trouve également de plus en plus sa place dans la thérapeutique puisque depuis octobre 2021 le premier traitement optogénétique expérimental a vu le jour : l'essai de thérapie génique GS030 a été développé pour la rétinopathie pigmentaire non syndromique et a permis à un homme aveugle de retrouver (partiellement) la vue.

La neuromodulation optogénétique est une approche indépendante des mutations pour restaurer des fonctions physiologiques, telle que la vision, chez un sujet malade, ce qui est une réelle avancée. Cette technologie ouvre donc la voie à d'autres applications dans des maladies ophtalmiques ou neurologiques.

**Mots clefs :** *optogénétique – génétique – optique – opsine – photosensible – neurosciences - médecine – neurologie – psychiatrie – ophtalmologie - neuromodulation – cibles thérapeutiques – traitement – GS030 – rétinopathie pigmentaire.*

---

## ABSTRACT

---

### Contribution of optogenetics in medicine

Optogenetics combines the optical and genetic domains. The method consists in introducing a gene that codes for a photosensitive protein, called opsin, to target cell in order to make it photosensitive. Its illumination will activate or inhibit it according to the type of opsin expressed. Named method of the year by the journal "Nature methods", optogenetics allows a precise, real-time, and reversible spatio-temporal control in order to study and manipulate the functionality of cellular networks in a living animal. The diversity of opsins has allowed the development of the field of optogenetics and the achievement of various goals in *ex-vivo* or *in-vivo* experiments. Initially confined to the neurosciences, today the technique brings a lot to medicine in terms of fundamental knowledge and physio-pathological understanding various experiments on rodents have been conducted to better understand various neurological, psychiatric and ophthalmic disorders. It is also finding its place in therapeutics, as since October 2021, the first experimental optogenetic treatment has been developed: GS030 is indicated for non-syndromic retinopathy of pigment and allows a blind man to recover (partially) his vision. Optogenetic neuromodulation is a mutation-independent approach to restoring physiological functions, such as vision, in a sick subject, which is a real advance. This technology opens the way to other applications in ophthalmic or neurological diseases.

**Keywords:** *optogenetics - genetics - optics - opsin - photosensitive - neuroscience - medicine - neurology - psychiatry - ophthalmology - neuromodulation - therapeutic targets - treatment - GS030 – retinosis pigmentosa.*

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé**  
**au 4 avril 2022**

**Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

## Maîtres de Conférences des Universités

### Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme LARGEAUD L	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

### Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme AMRANE Dyhia	Chimie Thérapeutique
------------------	----------------------

*À ma mère,  
À mes Grands-Parents,*

---

## REMERCIEMENTS

---

*L'achèvement de ce travail procure une grande satisfaction. Il est l'occasion de se remémorer les personnes qui m'ont permises d'en arriver là.*

*Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse et notamment ma directrice Madame **Isabelle Lajoie-Mazenc**, pour son intérêt et son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse.*

*Je remercie le Jury composé de Madame **Bettina Couderc**, Monsieur **Nicolas Delcourt** et Monsieur **Yannis Sainte-Marie** de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse d'exercice en pharmacie.*

*Je remercie celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années. Je suis redevable à ma mère, **Lamia Anbry** et à mes grands-parents, **Kenza** et **Mohammed Anbry**, pour leur soutien moral et matériel ainsi que pour leur confiance indéfectible dans mes choix.*

*À ma tante, **Chemsy Lestrat**, ma confidente préférée qui me fait toujours rire et qui a toujours été là pour moi. Je n'oublierai jamais nos moments passés à Toulouse.*

*À mes oncles, **Youssef Anbry**, **Hicham Anbry** et **Phillipe Lestrat** qui ont toujours été présent et qui ont su me soutenir dans les moments importants.*

*À mes cousins, cousines : **Yamina Anbry**, **Yanis Lestrat**, **Lara Lestrat**, **Yanis Anbry** et **Kenza- Ana Anrby**.*

*À mes chères sœurs, **Salma** et **Meryem** et mon cher frère **Hamza** qui ont le privilège de me supporter pendant plus de vingt ans.*

*Je tiens à remercier **tout le reste de ma famille** qui a contribué de près ou de loin à ce que je suis devenue.*

*Je tiens également à remercier mes amis, ceux qui m'ont permis de décompresser et souffler entre la rédaction de deux chapitres de thèse, ceux qui me soutiennent, qui ont su m'apporter confiance et écoute à tous les moments depuis que j'ai déposé mes valises à Toulouse, il y a sept ans: **Léa Bouvard**, **Heloise Cochez**, **Sonia Merad**, **Noémie Abadie**, **Yasmine Mossazadeh**, **Inès Chaoui** et **Adélina Mahieu**, je vous remercie pour tous ces beaux moments passés ensemble à rigoler, danser, faire la fête, mais également pour tous ces moments passés à la bibliothèque à réviser et à faire le point sur notre vie.*

*Je n'oublie pas, **Selma Essafir**, mon amie de longue date, qui est là pour moi depuis mon plus jeune âge.*

*Enfin, mais non des moindres, tous mes remerciements à mon conjoint bien aimé, **Loïc Dombideau**, qui me soutient tous les jours et qui a pris le temps de relire cette thèse.*

*Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive et je remercie tous ceux et celles qui me connaissent et qui me permettent de me sentir exister...*

---

## TABLE DE MATIÈRES

---

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>II. BASES DE L'OPTOGENETIQUE.....</b>	<b>11</b>
<b>I.1 Principe général.....</b>	<b>11</b>
<b>I.2 Les protéines photosensibles : les opsines .....</b>	<b>11</b>
I.2.1 Structure générale des opsines.....	12
I.2.2 Fonctions des opsines.....	13
I.2.3 Les principales opsines naturelles .....	15
<b>I.3 Partie optique de l'optogénétique .....</b>	<b>17</b>
I.3.1 Photosensibilité et photo-isomérisation des rhodopsines .....	17
I.3.2 Amélioration des opsines pour une utilisation en optogénétique .....	18
I.3.2.1 Améliorer les propriétés des opsines par des mutations ponctuelles .....	18
I.3.2.2 La création des variants bistables ou SFO (Step Fuction Opsin).....	19
I.3.2.3 La création des hybrides chimériques à partir de Channelrhodopsine .....	21
I.3.2.4 Améliorer l'expression membranaire du candidats NpHR par l'ajout d'un motif de signal d'exportation.....	22
I.3.2.5 Modification des outils optogénétiques pour arriver à une modulation intracellulaire .....	22
<b>I.4 Partie génétique de l'optogénétique.....</b>	<b>25</b>
I.4.1 Utilisation des vecteurs viraux en optogénétique .....	25
I.4.1.1 Le principe de vecteur viral et les types de virus utilisés .....	25
I.4.1.2 Application des vecteurs viraux en optogénétique.....	26
I.4.2 Utilisation des animaux transgéniques en optogénétique .....	27
I.4.2.1 Avantages et limites de l'utilisation des vecteurs viraux en optogénétique.....	28
<b>II LES APPORTS SCIENTIFIQUES DE L'OPTOGENETIQUE ET SES POTENTIELS THERAPEUTIQUES :</b>	<b>29</b>
<b>II.1 Apports majeurs de l'optogénétique en neuroscieence .....</b>	<b>29</b>
<b>II.2 Apport de l'optogénétique pour les troubles neurologiques .....</b>	<b>32</b>
II.2.1 Maladie de Parkinson .....	33
II.2.1.1 Symptomatologie et physiopathologie de la maladie de Parkinson .....	33
II.2.1.2 Approches optogénétiques dans la maladie de Parkinson .....	34
II.2.2 Épilepsie et optogénétique.....	35
II.2.2.1 Symptomatologie et physiopathologie de l'épilepsie .....	35
II.2.2.2 Approche optogénétique dans l'épilepsie.....	35
II.2.3 Apport optogénétique pour la douleur chronique .....	37
II.2.3.1 Symptomatologie et physiopathologie de la douleur chronique.....	37
II.2.3.2 Apport de l'optogénétique dans la douleur au niveau du système nerveux central (SNP) et périphérique (SNP) .....	37
<b>II.3 Apport de l'optogénétique dans les troubles psychiatriques .....</b>	<b>40</b>
II.3.1 Dysfonctionnement social et optogénétique .....	41
II.3.2 Trouble de l'éveil et optogénétique .....	42
II.3.3 Les troubles anxieux et Optogénétique.....	43
II.3.4 La dépression et optogénétique .....	44
II.3.5 Addiction et optogénétique.....	45
<b>III PREMIER ESSAI CLINIQUE UTILISANT L'OPTOGENETIQUE.....</b>	<b>47</b>
<b>III.1 Mécanisme de la vision.....</b>	<b>47</b>
<b>III.2 Physiopathologie et symptomatologie des Rétinopathies Pigmentaires (RPs) .....</b>	<b>50</b>

<b>III.3</b>	<b>Approches thérapeutiques dans les rétinopathies pigmentaires .....</b>	<b>50</b>
III.3.1	Approches thérapeutiques classiques de la rétinopathie pigmentaire .....	50
III.3.2	Approche par optogénétique des rétinopathies pigmentaires chez l'animal.....	51
III.3.3	Approche thérapeutique de l'optogénétique sur un homme .....	52
<b>IV</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>57</b>
<b>V</b>	<b>ANNEXE .....</b>	<b>59</b>
<b>VI</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>62</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AAV</b> : Virus associé aux adénovirus	<b>NAC</b> : Noyau Accubens
<b>AG</b> : Appareil de Golgi	<b>NbA</b> : Noyau basal de l'amygdale
<b>AMPc</b> : Adénosine monophosphate cyclique	<b>NLP</b> : No light perception
<b>Arch</b> : Archæorhodopsine	<b>NpHR</b> : Halorhodopsine
<b>ATV</b> : Aire tegmentale ventral	<b>NST</b> : Noyau sous-thalamique
<b>BLA</b> : Terminaisons basolatérales de l'amygdale	<b>OFT</b> : Open-field
<b>BR</b> : Bactériorhodopsine	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>CAMKII</b> : protéine kinase Ca <sup>2+</sup> /calmoduline dépendante	<b>PET Scan</b> : Positron Emission Tomography Scan
<b>CCA</b> : Cortex cingulaire antérieur	<b>PLR</b> : Pupillary light reflexes
<b>CCK</b> : Cellules épidermales de Merkel	<b>PV</b> : Parvalbumine
<b>CCK</b> : Cholécytokine	<b>RCPG</b> : Récepteur Couplé à une protéine G
<b>CeA</b> : Noyau central de l'amygdale	<b>RE</b> : Réticulum endoplasmique
<b>CeL</b> : Noyau central latéral	<b>RP</b> : Rétinopathie pigmentaire
<b>CeM</b> : Noyau central médian	<b>SCP</b> : Stimulation cérébrale profonde
<b>CF</b> : Counting Fingers	<b>SFO</b> : Step Function Opsin
<b>ChR</b> : ChannelRhodopsine	<b>SOM</b> : Somatostatine
<b>CMV</b> : CytoMegalovirus	<b>SSPT</b> : Stress Post-Traumatique
<b>CPF</b> : Cortex Prefrontal	<b>VD</b> : VentroDorsale
<b>CPFm</b> : Cortex Prefrontal Median	<b>VL</b> : VentroLatéral
<b>CPP</b> : Préférence de lieu conditionné	<b>VGLuT3</b> : Vesicular Glutamate Transporter Type 3
<b>CRACM</b> : ChR2-assisted circuit mapping	<b>VM</b> : VentroMédial
<b>DA</b> : Dopamine	<b>VMR</b> : Visceromotor response
<b>DAG</b> : DiAcilGlycérol	
<b>DIO</b> : Double Floxed Orientation	
<b>DRG</b> : Ganglion de la Racine Dorsale	
<b>DSI</b> : Diffusion Spectrum Imaging	
<b>DWI</b> : Diffusion Weighted IRM	
<b>EEG</b> : ElectroEncephaloGramme	
<b>EF1a</b> : Human Elongation factor 1 alpha	
<b>EPM</b> : Elevated plus maze	
<b>FDA</b> : Food Drug and Administration	
<b>FLEX</b> : Flip-Excision	
<b>Gad2</b> : Acide glutamique decarboxylase 2	
<b>Glu</b> : Glutamate	
<b>GMPc</b> : Guanosine monophosphate cyclique	
<b>HM</b> : Hand motion	
<b>HSV</b> : Virus Herpès simplex	
<b>HSyn</b> : Human synapsin	
<b>IEG</b> : Gènes Précoces Immédiats	
<b>IP3</b> : Inositol TriPhosphate	
<b>IRM</b> : Imagerie par Résonance Magnétique	
<b>LC</b> : Locus Coeruleus	
<b>LP</b> : Light Perception	
<b>mGluR5</b> : Métabolic Glutamate Récepteur 5	

## I. INTRODUCTION

L'optogénétique est un **nouveau domaine de recherche et d'application qui combine l'optique à la génétique**. Le principe est de faire exprimer des protéines photosensibles dans une cellule cible de façon à la rendre sensible à la lumière et donc « manipulable » à distance (Cf. figure 1). Le terme est proposé en 2006 par l'un des principaux pionniers dans le domaine, **Karl Deisseroth**, qui montre l'intérêt de l'utilisation de sondes, marquées et activables par la lumière, lors d'études *in vivo* sur la dynamique et le comportement des neurones (1). Cette technologie s'appuie également sur l'observation en 1979, du biologiste britannique **Francis Crick** qui souligne le potentiel des propriétés de la lumière comme outil intéressant pour étudier les tissus nerveux, en comparaison avec les électrodes qui sont invasives et qui ne sont pas aussi précises (2). Ce domaine est par la suite essentiellement basé sur l'utilisation de protéines photosensibles qui possèdent la capacité à être activées par la lumière et induire ensuite une réponse cellulaire régulée dans le temps et dans l'espace (3).

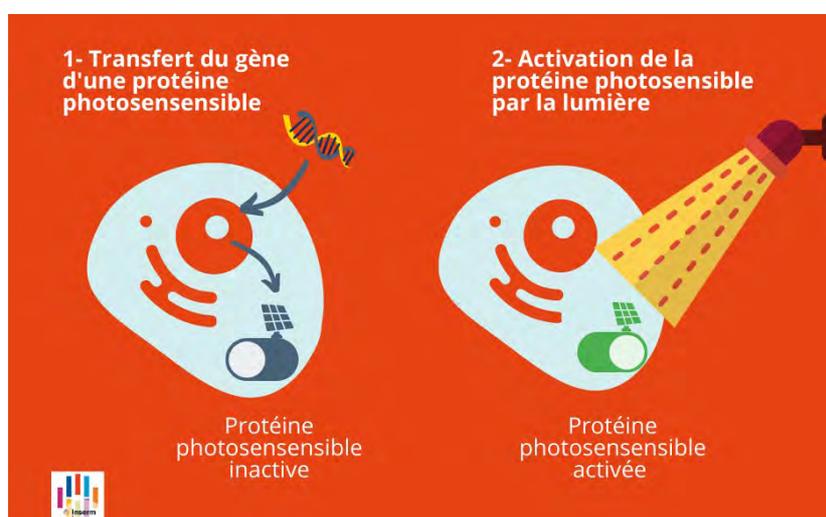


Figure 1 – Schéma du principe de l'optogénétique (Inserm, 2021) (3)

En 2010, la technique a été nommée « **méthode de l'année** » par la revue « Nature methods », qui attribue son succès et son développement aux progrès réalisés tant au niveau des techniques de microscopie, des stratégies d'expression génique, et des techniques permettant de mesurer les effets biologiques induits (4).

L'optogénétique s'est initialement cantonnée aux **neurosciences** (5). En 2005, a lieu la première étude sur mammifère démontrant que l'introduction d'une **opsine, famille de protéines photosensibles, induit une réponse de cellules neuronales sélectionnées** (6). Cette technique a été ensuite utilisée sur une plus large zone de tissu nerveux, afin d'**étudier comment l'information est transmise dans les différents réseaux de neurones** dans le but de mieux comprendre le fonctionnement du cerveau en conditions physiologiques et pathologiques (7).

L'optogénétique désigne aujourd'hui **l'utilisation d'outils moléculaires génétiquement ciblés pour l'observation et la manipulation de structures cellulaires à l'aide de la lumière avec une haute résolution temporelle et spatiale** (1). De plus, des applications en médecine commencent à émerger avec un premier succès qui a permis à un homme aveugle, atteint de rétinopathie pigmentaire, de retrouver partiellement la vue (8).

Dans une première partie de cette thèse nous décrivons les bases de l'optogénétique puis nous présenterons les apports en médecine et le potentiel thérapeutique de l'approche dans diverses pathologies, enfin nous verrons la place de l'optogénétique se concrétiser dans le domaine thérapeutique en abordant un essai clinique sur des patients aveugles suite à une rétinopathie pigmentaire de stade avancé.

## II. BASES DE L'OPTOGENETIQUE

### I.1 Principe général

L'optogénétique consiste à modifier génétiquement des cellules afin qu'elles deviennent sensibles à la lumière grâce à l'expression de protéines photosensibles (Cf. Figure 1) (9). Par conséquent, la première étape est de modifier génétiquement – à l'aide d'une méthode biotechnologique – les cellules cibles pour qu'elles expriment ces protéines (Cf. Figure 2) (10). La deuxième étape est d'utiliser la lumière à la bonne longueur d'onde afin d'éclairer – par une fibre optique - la protéine pour l'activer (Cf. figure 3) (10). La résultante, en fonction du type de protéine photosensible utilisée, sera une **activation** ou une **inhibition** des fonctions de la cellule modifiée génétiquement.

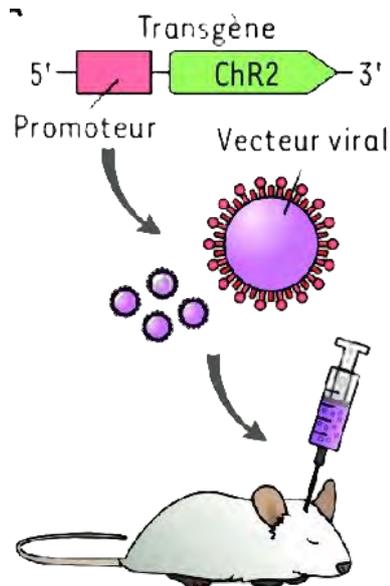


Figure 2 - Schéma d'expression de protéines photosensibles à l'aide d'un vecteur viral dans les neurones de souris (10).

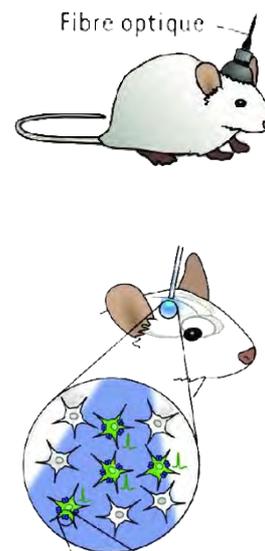


Figure 3 - Schéma de photo-activation par une fibre optique des protéines photosensibles exprimées par les cellules (10).

### I.2 Les protéines photosensibles : les opsines

Au fil des années, différentes protéines photosensibles ont été découvertes dans la nature. La première est la **Bactériorhodopsine**, découverte en 1971 par deux biochimistes américains, Walter Stoeckenius et Daniel Oesterhelt (11). S'ensuit, la découverte de l'**Halorhodopsine** en 1977(12) et la **Channelrhodopsine** (ChR) en 2002 (13).

Ces protéines appartiennent à la famille des **opsines**. Les gènes codant les opsines sont divisés en 2 superfamilles distinctes : les opsines microbiennes dites de **type I** et les opsines animales dites de **type II** (14) :

- Les gènes d'opsines de **type I** se trouvent chez les procaryotes, les algues et les champignons. Ces opsines contrôlent diverses fonctions (phototaxie, stockage d'énergie et biosynthèse rétinienne) (15).
- Les gènes d'opsine de **type II** ne sont présents que chez les eucaryotes supérieurs et sont principalement responsables de la vision (16). Une partie des opsines II joue également un rôle dans le rythme circadien et la régulation pigmentaire (1).

L'optogénétique est principalement basée sur les opsines de type I et plus particulièrement la Channelrhodopsine, une protéine sensible à la lumière bleue découverte chez une algue unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, dans les mécanismes de phototaxis (13).

### I.2.1 Structure générale des opsines

Les **opsines** sont capables de réagir à l'énergie lumineuse par leur liaison avec un chromophore : le **rétinal**. L'association de la molécule opsine avec son chromophore est appelée **rhodopsine** (Cf. figure 4) (17) (18). Ces protéines sont impliquées dans la grande majorité des processus de photosensibilité chez les organismes vivants.

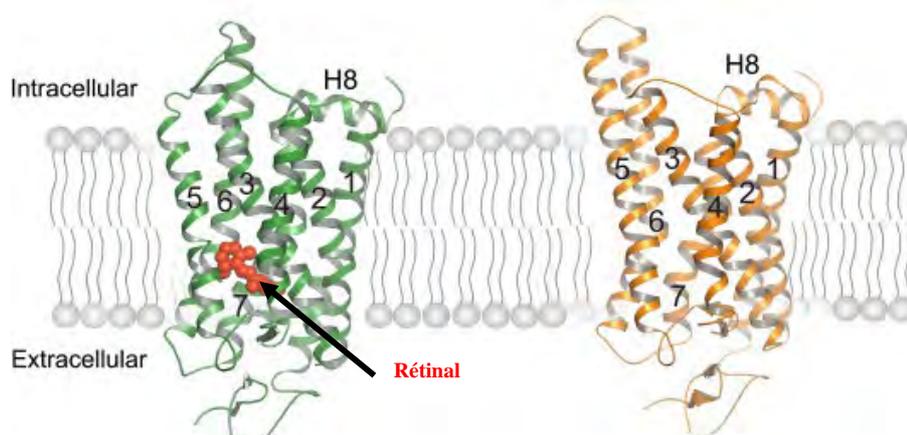


Figure 4 - Schéma de cristallisation d'une rhodopsine (en vert) et d'une opsine (en orange) (18)

La rhodopsine est une **protéine transmembranaire**, sous forme hélicoïdale (19,20), contenant 348 acides aminés, qui s'organisent en 7 hélices transmembranaires (nommées H-I à H-VII) reliées par des boucles extracellulaires (NH<sub>2</sub>-T, E-I, E-II et E-III) et cytoplasmiques (COOH- T, C-I, C-II, C-III). Le chromophore ou rétinal est lié par une liaison covalente à la lysine 296 dans l'hélice VII (Cf. figure 5) (21) (22).

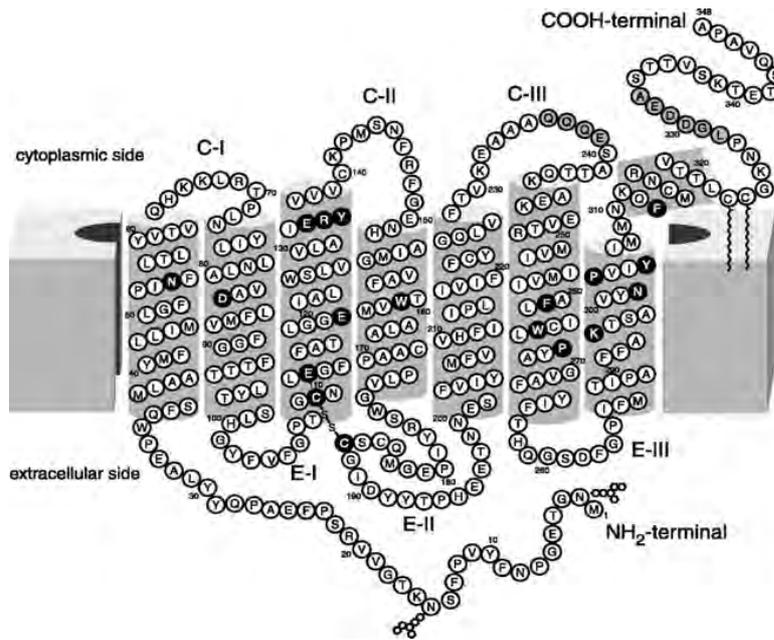
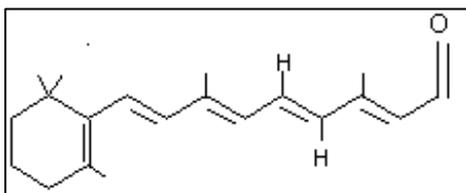


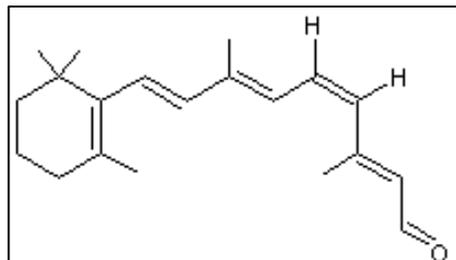
Figure 5 - Modèle bidimensionnel de la rhodopsine bovine (22)

**Le rétinol**, également appelé rétinaldéhyde est l'une des trois formes de vitamine A. C'est un aldéhyde polyinsaturé capable d'absorber la lumière (13). Mot dérivé de « rétine », le rétinol constitue la base moléculaire du cycle de la vision régi par sa photo-isomérisation. Cette réaction d'isomérisation est à la base de l'activation d'une opsin par son changement de conformation.

**La rhodopsine** est donc formée de l'opsin liée de manière covalente au *11-cis* rétinol (groupe amine -NH<sub>2</sub>) ou au *tout-trans* rétinol (groupe imine =N-) (Cf. figure 6) (24)(25).



Rétinol trans ou (E) (20)



Rétinol Cis ou (Z) (21)

Figure 6 - Structures chimiques du rétinol (24,25)

### 1.2.2 Fonctions des opsines

Les opsines sont **soit des canaux ioniques (7) soit des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)** (26). En d'autres termes, leur activation par la lumière induit soit une ouverture du canal laissant entrer ou sortir des ions (Cf. figure 7) (27), soit une activation d'une protéine G permettant la transduction d'un signal intracellulaire (Cf. figure 8) (28).

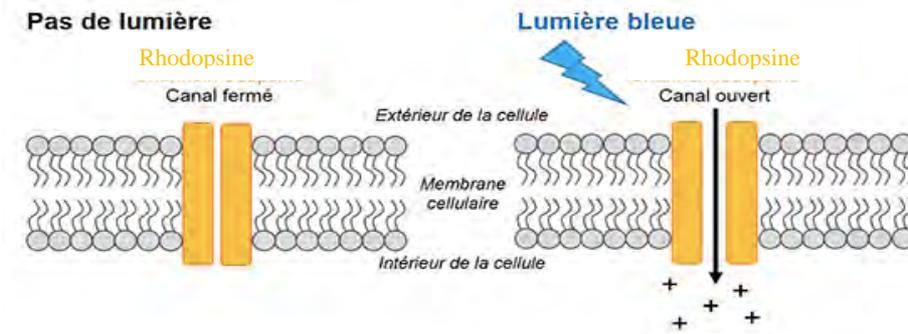


Figure 7 - Schéma du fonctionnement d'une rhodopsine canal ionique (27)

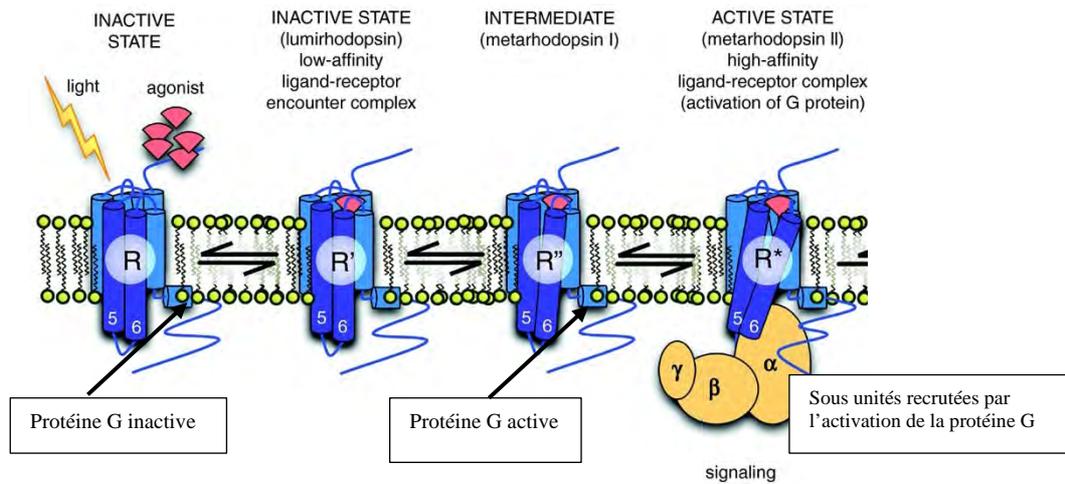


Figure 8 - Schéma du fonctionnement d'une rhodopsine RCPG (28)

La fonction « canal ionique » est responsable d'une propriété universelle aux membranes cellulaires : la génération d'un potentiel transmembranaire étant à la base de la régulation de l'activité cellulaire (29). Ces canaux jouent un rôle essentiel dans l'excitabilité cellulaire, le déclenchement et la propagation du potentiel d'action. En fonction du type d'opsine, du type d'ions et du sens du flux, la réponse de la cellule varie, pouvant être une **activation** ou une **inhibition** du potentiel membranaire.

La fonction « RCPG » est modulatrice. Cela correspond à l'activation d'une protéine G du récepteur suivit d'une activation enzymatique induisant une modification biochimique intracellulaire. La réponse cellulaire dépend du type de protéine G et donc du type d'opsine utilisée.

Les différentes familles impliquées dans les 3 types de réponses sont décrites dans le tableau ci-dessous (tableau 1), et seront traitées indépendamment dans la partie 1.2.3 et 1.3.2.2.

Tableau 1 : Classification des principales rhodopsines par leur fonction :

Fonction ACTIVATRICE	Fonction INHIBITRICE		Fonction MODULATRICE	
<b>Channelrhodopsine type 1, type 2</b> (ChR1 et ChR2), et leurs variants.	<b>Halorhodopsine</b> (NpHr), <b>Archeorhodopsine</b> (Arch) et <b>Bactéorhodopsine</b> (BR).		<b>OptoXR</b> (Opto- $\alpha$ 1AR, Opto-B2)	
Canaux cationiques non sélectifs, ils conduisent le Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> et H <sup>+</sup> vers l'intérieur (30,31).	<b>BR et Arch</b>  Pompes ou canaux cationiques sélectifs à protons vers l'extérieur (32)(33)	<b>NpHR</b>  Pompes ou canaux cationiques sélectifs à chlorure vers l'intérieur (34)	<b>Opto- <math>\alpha</math>1AR :</b>  RCPG Adénylate cyclase qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (35)	<b>Opto- <math>\beta</math>2AR :</b>  RCPG Phospholipase C qui induit à son tour une augmentation de la concentration IP3 et DAG (35)

### 1.2.3 Les principales opsines naturelles

Différentes opsines ont été découvertes dans la nature. Ces protéines ont toutes le même principe de fonctionnement : ce sont des protéines activées par la lumière. Les opsines sauvages restent néanmoins plus ou moins différentes entre elles, avec des caractéristiques et des cinétiques d'action qui leur sont propres. Un tel panel d'opsines naturelles a permis de développer le domaine de l'optogénétique et d'atteindre des buts et des fins variés lors d'expériences *ex-vivo* ou *in-vivo*.

#### **Bactérorhodopsine (BR)**

Cette protéine est retrouvée dans la membrane pourpre de l'archée halophile *Halobacterium salinarum* (36). La protéine BR est sous forme d'homotrimère (37) ; Chacune des trois unités a une structure identique composée de 248 acides aminés organisés en 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires emprisonnant le rétinol, lié au résidu lysine 216 par une base de Schiff (38). La BR est **un canal ionique sélectif photosensible** qui correspond à une **pompe à protons (H<sup>+</sup>)** utilisant **l'énergie lumineuse** pour générer un gradient de protons à travers la membrane cellulaire (34,39). Ce gradient de protons permet à son tour de produire de l'ATP, permettant d'alimenter les réactions qui font vivre la cellule (40) (41). La BR a une **cinétique de désintégration ( $\tau_{off}$ ) dite lente**. Pour l'activer, il faut une **exposition continue à une lumière verte** (absorption maximale entre 560-570 nm) **de faible intensité** (42). Aujourd'hui, elle est très peu utilisée en optogénétique.

#### **Halorhodopsine (NpHR)**

Cette protéine est retrouvée chez une classe d'archées nommée *Halobacteria*. (12) Sa structure est semblable à la BR. Il s'agit d'un **canal ionique photosensible sélectif** correspondant à une **pompe chlorure (Cl<sup>-</sup>)** dirigée vers l'intérieur (32). Pour activer NpHR, il faut une exposition à **une lumière jaune / verte** (le pic d'absorption se situe autour de 580 nm). Son excitation provoque **une hyperpolarisation** avec une **inhibition** consécutive de la cellule cible.

#### **Channelrhodopsine (ChR)**

Cette sous-famille est retrouvée chez les unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii* (30,43). Il existe 2 types de channelrhodopsine : **La channelrhodopsine 1 (ChR1)** et **la channelrhodopsine 2 (ChR2)**. Au niveau structural, les channelrhodopsines sont des protéines à 7 hélices transmembranaires, contenant le chromophore *tout trans*-rétinal relié de manière covalente par une base de Schiff

protonée (44). Au niveau fonctionnel, la ChR est un **canal cationique non sélectif photosensible**. Ce type de rhodopsine conduit le Ca<sup>2+</sup> Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et H<sup>+</sup>(43,45,46). ChR1 et ChR2 **activent** les cellules dans lesquelles elles sont exprimées par **dépolarisation**. Elles se distinguent par leurs caractéristiques cinétiques, spectrales et par leur perméabilité plus ou moins importante pour certains cations (Cf. tableau 2) :

Tableau 2 : Caractéristiques différentielles des channelrhodopsines :

Caractéristiques	ChR1	ChR2
<b>Sélectivité</b>	Plus sélective pour les protons (H <sup>+</sup> ) (47)	Conduit tous les cations Ca <sup>2+</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> et H <sup>+</sup>
<b>Spectre d'action</b>	Spectre d'action à 500 nm (13)	Spectre d'action à 460 nm (13)
<b>Cinétique de désintégration</b> ou $\tau_{off}$ (cinétique de récupération post-lumière)	À la lumière les ChR restent activées pendant un temps déterminé puis s'inactivent. ChR2 s'inactive plus rapidement que ChR1 à la lumière. (45)	

Parmi ces deux protéines, la ChR2 a reçu le plus d'attention en tant qu'outil neuroscientifique car elle incorpore naturellement et plus facilement le *tout-trans*-rétinal endogène des cellules. Ceci permet ainsi aux expérimentateurs d'exciter ou d'inhiber sélectivement des cellules génétiquement ciblées sans ajout de cofacteurs exogènes (48).

### **Volvox Carterie ChR1 (VChR1)**

En 2008, **Volvox Carterie ChR1 (VChR1)** a été identifié dans l'algue *Volvox carterie* (49). Sa structure est semblable aux ChR. Son mécanisme d'action est le même que celui des channelrhodopsines ; c'est un **canal cationique non sélectif** perméable pour les 4 cations H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> avec une conductance plus importante pour Na<sup>+</sup> (50). Le pic d'activation est à **545 nm** avec une activation pouvant aller jusqu'à 590 nm. L'excitation maximale est décalée vers le rouge d'environ 70 nm par rapport à la ChR2. VChR1 **active** les cellules en les **dépolarisant**. Cette version fonctionne ainsi comme la ChR2 en tant que canal cationique tout en permettant d'étendre le spectre optique d'excitation cellulaire **vers le jaune**.

### **Channelrhodopsine (MChR1)**

En 2011, a été découvert la nouvelle **channelrhodopsine MChR1** au sein de l'espèce d'algues vertes *Mesostigma viride*. Elle possède un spectre d'action similaire à la ChR1, décalé vers le rouge (51,52).

### **Archaerhodopsine (Arch)**

Entre 2010 et 2011, des inhibiteurs optiques efficaces ont été découverts chez des archaebactéries et sont nommés les Archaerhodopsine (**Arch**). Les Arch possèdent 7  $\alpha$ -hélices transmembranaires et un feuillet  $\beta$  extracellulaire à 2 brins (53,54). Ce sont **des canaux ioniques sélectifs photosensibles qui correspondent à des pompes à protons (H<sup>+</sup>)** vers l'extérieur. Ces canaux **hyperpolarisent** les cellules en faisant sortir les H<sup>+</sup> de la cellule et donc permettent l'**inhibition** de celles-ci (55). Ils possèdent le même spectre d'activation que les opsines de type I (56). Leur maximum d'excitation est à **566 nm** et donc sensible à la lumière **verte-jaune** (55). Les courants médiés par Arch présentent **une excellente cinétique d'activation** de la lumière et **de récupération post-lumière**. Sous un éclairage continu, les photocourants induits par Arch finissent par diminuer mais contrairement à toutes les halorhodopsines, Arch récupère spontanément la fonction en quelques secondes en post-illumination (57). Plusieurs expériences *in-vitro* (neurones en culture) et *in-vivo* (souris, mammifères) prouvent qu'Arch pourrait être particulièrement efficace pour un « silencing » neuronal optique (57)

La figure 9, ci-dessous, résume les rhodopsines activatrices et inhibitrices, leurs longueurs d'ondes excitatrices et leurs affinités ionique (58).

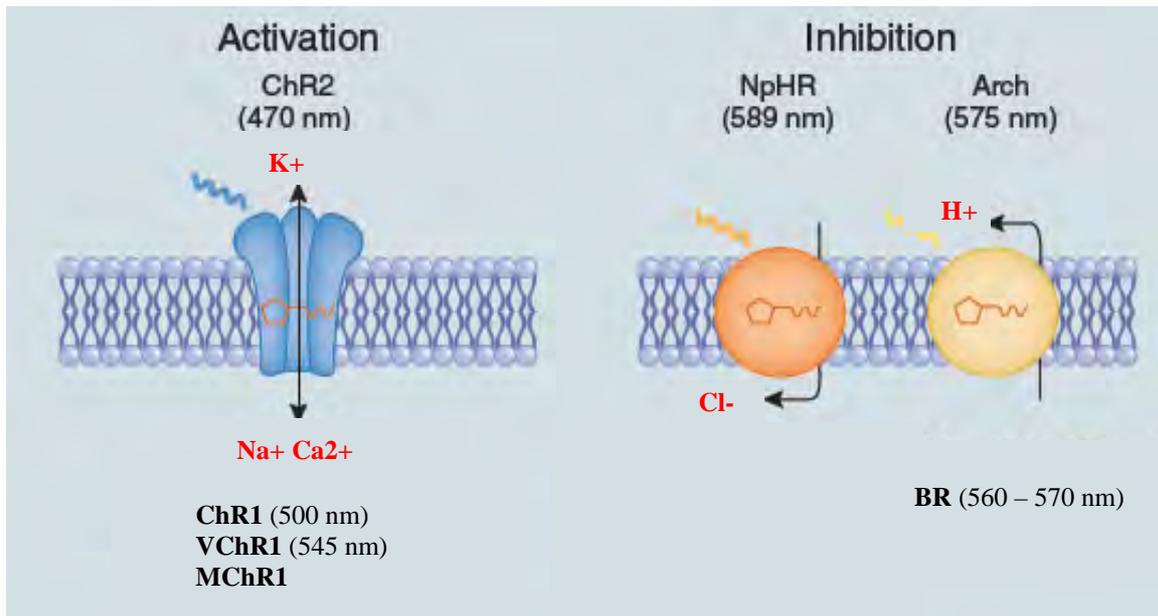


Figure 9 - Résumés des rhodopsines naturelles avec leurs longueurs d'ondes (58)

Les bases du principe optogénétique étant à présent abordées, nous allons à présent nous focaliser, dans un premier temps, sur la partie optique de la technique puis, dans un second temps, sur la partie génétique.

### I.3 Partie optique de l'optogénétique

Les opsines sont à la base même de l'optogénétique par leur photosensibilité et leur fonction de canal ionique ou de RCPG. Ces protéines présentent l'avantage d'être **un système monocomposant** où le domaine de détection de la lumière (le capteur) et le domaine effecteur sont codés sur un seul gène. Elles peuvent donc être considérées comme des composants de photosensibilisation précis et modulables à introduire dans des cellules non sensibles à la lumière pour permettre un contrôle optique rapide.

#### I.3.1 Photosensibilité et photo-isomérisation des rhodopsines

La **photosensibilité** est la faculté de certains organismes de réagir à l'action des radiations lumineuses. Dans le cas de l'optogénétique, elle représente la capacité à recevoir de la lumière pour la transformer en réponse cellulaire. En effet, la réception d'un photon par la rhodopsine va entraîner une photo-isomérisation du chromophore (59).

La **photo-isomérisation** est un processus photochimique réversible, conduisant une isomérisation du substrat, soit par rotation de liaison, soit par réarrangement du squelette ou par transfert d'atomes ou groupe d'atomes.

Dans les opsines de type I le rétinol est sous forme *tout-trans* à l'obscurité alors que les opsines de type II le rétinol est sous forme *11-cis*. À la lumière, il y a **isomérisation de la base de Schiff** (un composé comportant une double liaison C=N (60)) : le rétinol de l'opsine type I adopte une configuration *11-cis* alors que le rétinol de l'opsine type II devient *tout-trans* (Cf. figure 10) (15) (61).

Cette isomérisation est déclenchée par l'absorption d'un photon apporté par la lumière, qui initie un changement conformationnel dans l'opsine (Cf. figure 11) (62).

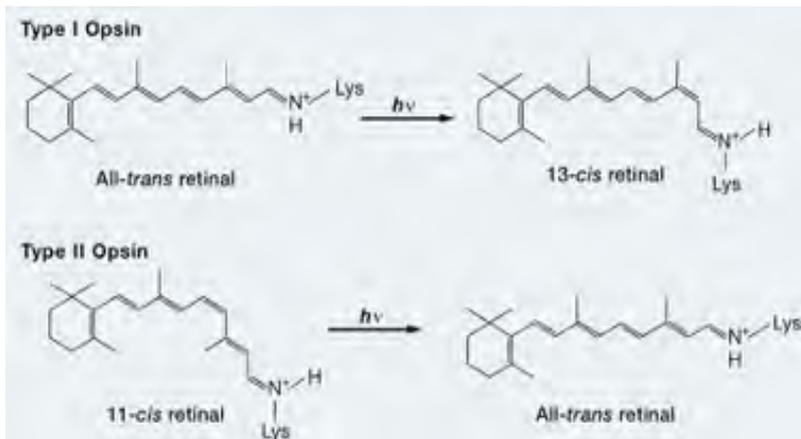


Figure 10 - Réaction chimique de photoisomérisation des rhodopsines de type I et II (15)

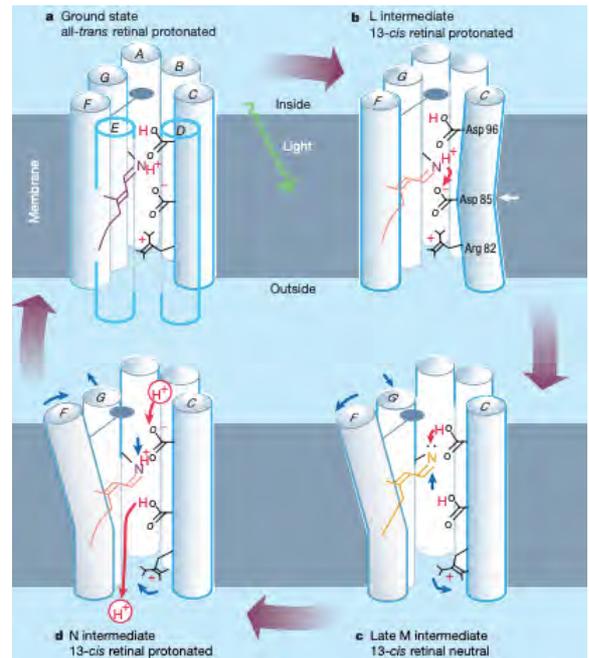


Figure 11 – Exemple de mécanisme d'isomérisation de bactériorhodopsine (62)

### 1.3.2 Amélioration des opsines pour une utilisation en optogénétique

Après identification dans la nature de protéines photosensibles comme candidats d'outils pour l'optogénétique, des limites se sont révélées. En effet, certaines propriétés intrinsèques des opsines ne sont pas optimales, comme la **faible conductance** et la **cinétique lente et inactivante** des canaux ChR1 et ChR2 (49). A ce jour, l'opsine la plus utilisée en optogénétique est la **Channelrhodopsine 2 (ou ChR2)**. Elle peut être utilisée en toute sécurité pour contrôler l'activité de populations neuronales génétiquement définies dans des modèles allant de la mouche au singe (9).

Pour développer le domaine de l'optogénétique, il a donc fallu lever ces obstacles afin de maximiser l'efficacité des outils et la compatibilité des protéines membranaires d'origines microbiennes avec leur utilisation dans les cellules de mammifères. Pour cela, différentes manipulations génétiques ont été menées sur les opsines naturelles de type I afin d'améliorer leurs performances et permettre une utilisation optimale. Ces manipulations ont consisté soit à introduire des mutations dans les opsines existantes pour améliorer leurs propriétés soit à créer des protéines hybrides, soit à rajouter des séquences de localisation membranaire pour une meilleure expression.

#### 1.3.2.1 Améliorer les propriétés des opsines par des mutations ponctuelles

Les études se sont concentrées au préalable sur **l'amélioration de la sensibilité de l'opsine à la lumière et l'augmentation des photocourants induits par celle-ci**. Pour cela, de simples mutations sur la molécule ChR2 sauvage(wt) ont été réalisées. L'idée était de cribler les mutations dans la poche de liaison rétinale de ChR2 affectant les propriétés des canaux telles que la sélectivité des ions transportés, la cinétique et les longueurs d'ondes absorbées (46). Des mutants « **gain de fonction** » sont alors générés.

Les différentes mutations ponctuelles permettent de rendre plus efficace l'activation de l'opsine, de façon à augmenter le photocourant sans pour autant augmenter son expression cellulaire (Cf. tableau 3).

Tableau 3 : Différentes mutations simples de ChR2 et leurs conséquences fonctionnelles :

	ChR2(H134R)	ChR2(T159C)	ChR2(L132C)	CHETA	Chrimson, ChrimsonR
Mutation	Histidine (H) en position 134 par l'arginine (R) (63) en position 134	Thréonine (T) par Cystéine (C) en position 159	Mutation de la leucine (L) par Cystéine (C) en position 132	Mutation du glutamate (E) en thréonine (T) ou en Alanine (A) en position 123 (76)	Mutation de la lysine (K) en Arginine (R) en position 176 (64)
Avantage du mutant par rapport à ChR2(WT)	Augmentation de l'amplitude des photocourants (63)	Augmentation de la sensibilité lumineuse (33), Augmentation des photocourants (33)	Augmentation de la sensibilité lumineuse Augmentation de la durée d'ouverture du canal. Augmentation du photocourant.	Augmentation de la cinétique (deux fois plus rapide que ChR2). Stimulation haute fréquence (jusqu'à 200Hz contre 20Hz pour ChR2). Une meilleure précision temporelle (65) (66)	Spectre d'action décalé vers le rouge (64)  Pour <b>ChrimsonR</b> augmentation de la cinétique du canal (64)

Ainsi, les ChR à simple mutation répondent à certaines limites des ChR sauvages. Cependant, certaines de ces mutations qui améliorent la cinétique peuvent réduire les amplitudes des photocourants, par exemple ChETA (65). D'autres mutations permettant d'augmenter l'amplitude des photocourants, induisent un ralentissement de la cinétique du canal, ce qui peut interférer avec la précision de l'induction du potentiel d'action (67).

La conception des doubles variants voit alors le jour et permet de surpasser ces nouvelles limites (Cf. tableau 4).

Tableau 4 : Différentes mutations doubles de ChR2 et leurs conséquences fonctionnelles :

	ChR2(H134R/E123T)	ChR2 (T159C/E123T)
Mutations	Mutation Histine (H) en arginine (R) à la position 134, combinée avec la mutation de l'acide glutamique (E) en Threonine (T) à la position 123	Mutation Threonine (T) en Cysteine (C) à la position 159 combinée avec la mutation de l'acide glutamique (E) en Threonine (T) à la position 123.
Intérêts de la combinaison des deux mutation	Les photocourants qui ont presque atteint l'amplitude des courants ChR2 (wt) tout en préservant une cinétique accélérée favorable (68).	Délivre des photocourants rapides avec de grandes amplitudes et augmente la précision de l'induction du potentiel d'action sur une large gamme de fréquence

### 1.3.2.2 La création des variants bistables ou SFO (Step Fuction Opsin)

En **2008**, Les **channelrhodopsines bistables (ChR2-Step ou SFO pour Step Fuction Opsin)** ont été générées (69). Chez les variants bistables, les photocourants peuvent être initiés et terminés, sous l'impulsion de **différentes longueurs d'ondes** de lumières. Les versions SFOs s'ouvrent par une illumination d'environ 470 nm (lumière rouge) et se ferment par une illumination allant de 550 à 595 nm (lumière bleu-verte) (Cf. figure 12) (7).

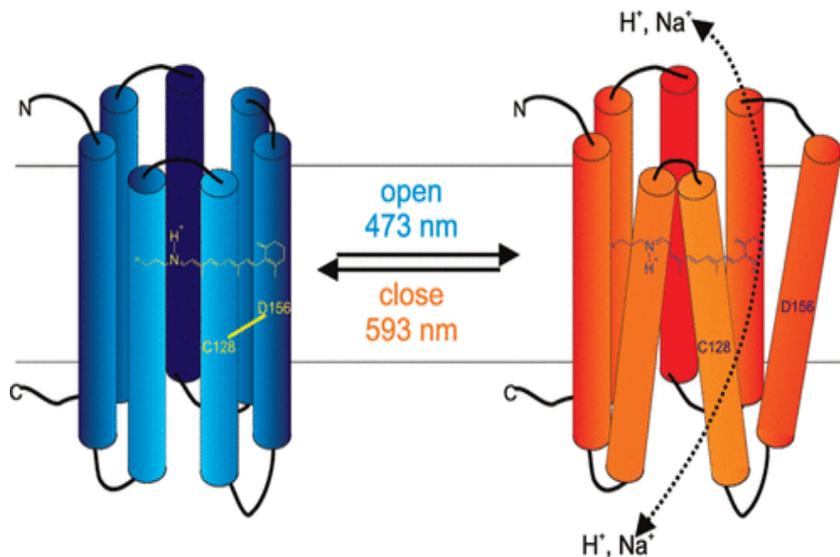


Figure 12 - Schématisation du fonctionnement SFO (7)

Des mutations ponctuelles permettent à la fois aux opsines de prolonger (de plus de 100 fois) la durée de vie de leur état ouvert (69,70) et de pouvoir se lier directement à un *11-cis* rétinale ou un *tout-trans* rétinale qui seront inter-convertibles lors de l'absorption de la lumière. De cette manière, l'activation (ouverture du canal) est induite par une première lumière. Quant à la désactivation (fermeture du canal), elle est la résultante par une seconde lumière à longueur d'onde différente (Cf. figure 13)(71) (68). Les SFO sont également appelées « mutants lents », on peut commencer à parler de **manipulation optogénétique à long terme** avec une stabilité remarquable de l'état actif jusqu'à 30 min (72).

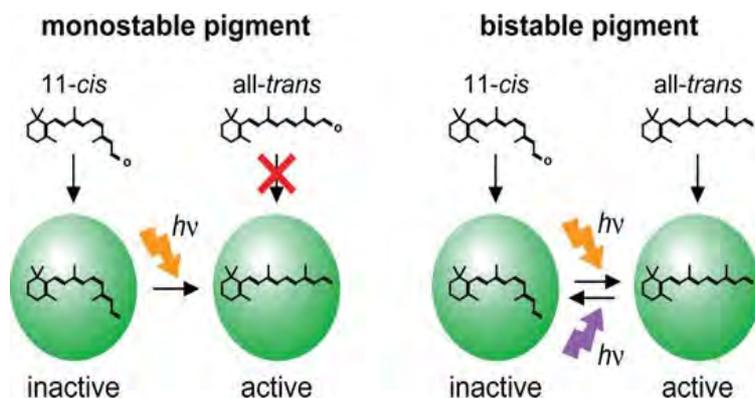


Figure 13 - comparaison du schéma d'activation entre une opsine II monostable et une opsine II bistable (71)

Ces mutations sont des altérations de la poche de liaison au chromophore dans le gène ChR2. Plusieurs mutations sont possibles : notamment en C128 et D156, lieux de déterminants structurels importants pour la réaction de fermeture du canal (52) (33) (67) (73).

Tableau 5 : Les différentes channelrhodopsines SFO et leurs mutations :

	<b>ChR2(C128S)</b>	<b>ChR2 (D156A)</b>	<b>ChR2 (C128S/D156A)</b>
Mutation	Cytosine (C) par la sérine (S) en position 128 dans l'hélice transmembranaire de ChR2 (52) (67)	Asparate (D) par l'alanine (A) en position 156 dans l'hélice transmembranaire (52) (67)	Combinaison des deux précédentes mutations (66)

### 1.3.2.3 La création des hybrides chimériques à partir de Channelrhodopsine

La première **Channelrhodopsine chimérique** a été créée en 2011, nommée **C1V1** (Cf. tableau 6). Elle est composée de parties de Channelrhodopsine-1 de *Chlamydomonas reinhardtii* et *Volvox carteri* (72). C1V1 est un canal cationique non sélectif pour Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> et H<sup>+</sup>. Les autres hybrides chimériques de ChR sont créés à partir d'apoptéines découvertes chez le *Chlamydomonas reinhardtii*, (13) : les apoptéines Channelopsin 1 (Chop 1) et 2 (Chop2). Elles partagent 65% d'homologie de séquence dans le domaine transmembranaire avec les opsines microbiennes (13). L'expression des domaines transmembranaires N-terminaux de Chop1 et Chop2 se trouve être suffisante pour la formation de canaux fonctionnels dans les cellules de mammifères lorsque le *tout-trans*-rétinal est présent. Les chimères ont été construites en fusionnant la partie N-terminale de Chop1 et la partie C-terminale de Chop2 (56).

Ces chimères sont des **canaux cationiques non sélectifs** pour Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> et H<sup>+</sup>. Elles diffèrent par le site de fusion ou les mutations présentes, impliquant des caractéristiques différentes (Cf. tableau 6).

Tableau 6 : Les différentes hybrides chimériques et leurs avantages :

<b>Chimères ChR</b>	<b>Avantages en comparaison aux Channelrhodopsines classiques</b>
<b>ChEF</b>	Obtention d'un <b>contrôle temporel plus précis</b> de la dépolarisation et des trains de potentiel d'action qui ressemblent davantage à des schémas de pointes naturels (74).
<b>ChD</b>	Réduction du temps que met l'opsine pour se désactiver après illumination. Ce canal a le taux de désactivation le plus rapide ce qui limitera son utilisation pour les expériences où il est souhaitable d'induire de courtes rafales de points (< 200 ms) (74).
<b>ChF</b>	Contrôle temporel plus précis de la dépolarisation. La chimère construite à partir de Chop1 et Chop2 avec un site de croisement près de l'extrémité de l'hélice F (74)
<b>ChIEF</b>	Une mutation ponctuelle de l'isoleucine en 170 de ChEF (au niveau de chop2) en valine donne cet hybride. Ce variant chimérique permet <b>d'accélérer le taux de fermeture du canal par rapport à ChEF</b> , conduisant à des réponses plus cohérentes lorsqu'il est stimulé au-delà de 25 Hz (47) (74)
<b>ChRGR</b>	Cette modification a permis <b>de retarder le photocourant de ChR1</b> . La version obtenue possède <b>une cinétique rapide</b> et une <b>désensibilisation minimale</b> (74) (75)
<b>C1V1</b>	C1V1 est caractérisée par une <b>réponse cinétique rapide et décalée vers le rouge</b> . Cette nouvelle version permet une <b>meilleure expression membranaire</b> comparé à VChR1 et des photocourants améliorés. <b>Les photocourants de C1V1 se décomposent plus lentement</b> que VChR1 et ChR2, restant plus longtemps activés (52). Des mutations à C1V1 ont été réalisées pour améliorer la cinétique de celle-ci, donnant : <ul style="list-style-type: none"> <li>- C1V1(E122T)</li> <li>- C1V1(E162T)</li> <li>- C1V1(E122T / E162T) ou C1V1(T/T)</li> </ul>

### 1.3.2.4 Améliorer l'expression membranaire du candidats NpHR par l'ajout d'un motif de signal d'exportation

L'halorhodopsine archéenne (NpHR) présente une localisation subcellulaire altérée lorsqu'elle est exprimée à des niveaux élevés dans les neurones mammifères (76)(77) conduisant à des accumulations (bulles) intracellulaires toxiques (78). Ceci est dû à une mauvaise exportation du réticulum endoplasmique (RE) vers la membrane plasmique. De cette observation, les chercheurs ont rajouté une séquence d'exportation pour le RE : NANS FCYENEV AKTSK (77) donnant la 2<sup>ème</sup> génération **eNpHR 2.0**. Cette opération améliore le ciblage membranaire et diminue la formation de bulles intracellulaires (76). Ainsi, ces améliorations permettent une expression à long terme bien tolérée (76) (79) et une augmentation de l'efficacité de NpHR (77).

Une 3<sup>ème</sup> génération **eNpHR 3.0** a été générée et correspond à eNpHR 2.0 avec un signal de **trafic Kir2.1** permettant l'exportation de l'appareil de Golgi (AG) vers la membrane plasmique optimisant son expression. Une étude montre que les photocourants produits par eNpHR 3.0 sont environ **20 fois plus importants que 2.0** (79).

Ce type d'approche a été utilisée sur la bactériorhodopsine (BR), également modifiée pour exprimer un motif d'exportation et d'un signal de trafic donnant **eBR** (78).

Ci-dessous un schéma résumant les principales rhodopsines avec leurs variants, ainsi que leurs longueurs d'onde d'activation, utilisées en optogénétique (Cf. figure 17) (80).

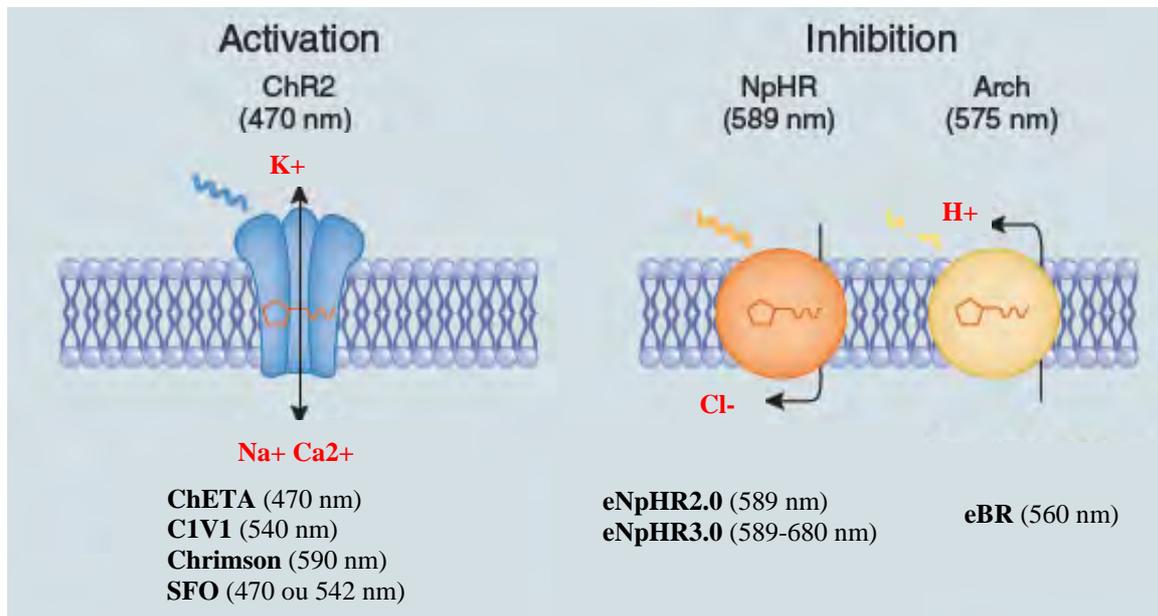


Figure 14 - Résumés des rhodopsines naturels avec les principaux variants (les plus utilisées) (80)

### 1.3.2.5 Modification des outils optogénétiques pour arriver à une modulation intracellulaire

La large application dans les neurosciences de la channelrhodopsine et des formes mutées, a fortement promu le domaine de l'optogénétique. Ce succès a motivé l'utilisation de nouvelles protéines activées par la lumière, codées génétiquement pour moduler d'autres paramètres cellulaires généraux comme la génération de seconds messagers. (Il n'est donc plus question

d'uniquement activer ou inhiber une cellule par l'ouverture d'un canal mais de **moduler une cascade de signalisation intracellulaire** (cf figure 6) (81).

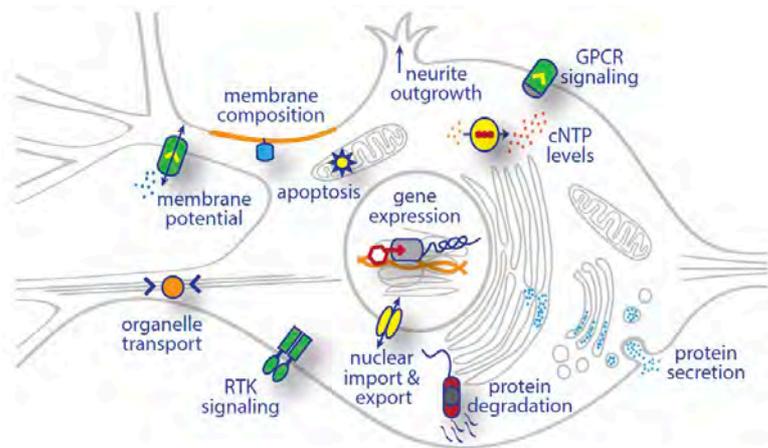


Figure 15 - cibles des outils en optogénétique (79)

Ces molécules sont basées sur les opsines de type II possédant une fonction de RCPG. Elles sont composées de la **protéine Gt** (ou Gta ou transducine). L'activation de cette dernière implique une réaction en chaîne : la stimule la GMPc phosphodiesterase, l'hydrolyse de **GMPc** (Guanosine Monophosphate cyclique) et enfin la diminution de la concentration intracellulaire de GMPc (Fig. 6) (35). Ces chimères tirent parti des relations structure-fonction communes entre l'opsine et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) pour activer et contrôler les cellules qui l'expriment (82).

Parmi ces protéines, **OptoXR** est une famille de chimères d'opsines. Les boucles intracellulaires de cette dernière sont remplacées par des boucles de récepteurs adrénergiques  $\alpha-1$  (à protéine **Gq**) ou  $\beta-2$  (à protéine **Gs**) (5) (35). La photostimulation d'Opto- $\alpha-1$  active une phospholipase C qui induit à son tour une augmentation de la concentration **IP3** (Inositol Triphosphate) et **DAG** (Diacylglycérol). La photostimulation d'Opto- $\beta-2$  active une adénylate cyclase induisant une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire (Cf. figure 16). Ainsi, sur une cellule exprimant un des 2 récepteurs, il est possible d'activer une de ces 2 voies de signalisation par simple illumination.

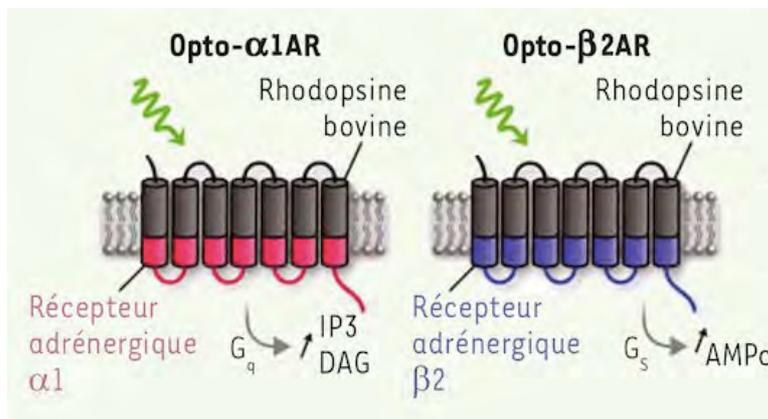


Figure 16 - Schéma des opsines Opto-XR (5)

Une approche similaire a été réalisée avec le domaine C-terminal (CT) du récepteur à la sérotonine 5HT1A qui est couplé à une protéine **Gi/o** (5)(83). L'opsine obtenue est **Rh-CT (5HT1A)** avec une distribution intracellulaire proche à celle du récepteur 5-HT1A au niveau des

membranes plasmiques des neurones postsynaptiques. La lumière permet alors de stimuler le **Rh-CT (5HT1A)** comme la sérotonine (Cf. figure 17).

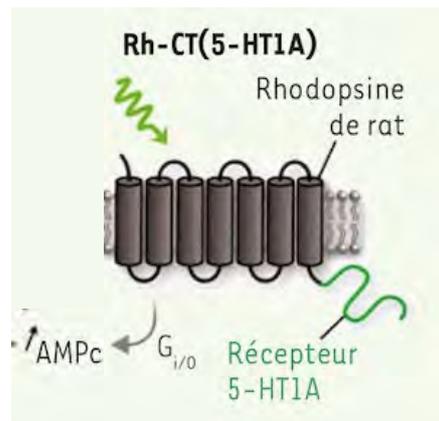


Figure 17 - Schéma de l'opsine Rh-CT(5-HT1A) (5)

Il est à noter dans cette partie, qu'un deuxième type d'approche complémentaire s'est développé en utilisant directement des enzymes photosensibles, capables d'augmenter la concentration intracellulaire de seconds messagers, appelées **commutateurs optiques**.

Nous avons abordé tous les outils optogénétiques. Pour conclure cette partie, voici un schéma récapitulatif des opsines (Cf. figure 18). En A est représenté les familles d'opsines avec les ions transportés et les voies de signalisations impliquées. En B, les attributs cinétiques ( $\tau_{off}$ ) en abscisse et spectrales en ordonnée ( $\lambda_{max}$ ) (84).

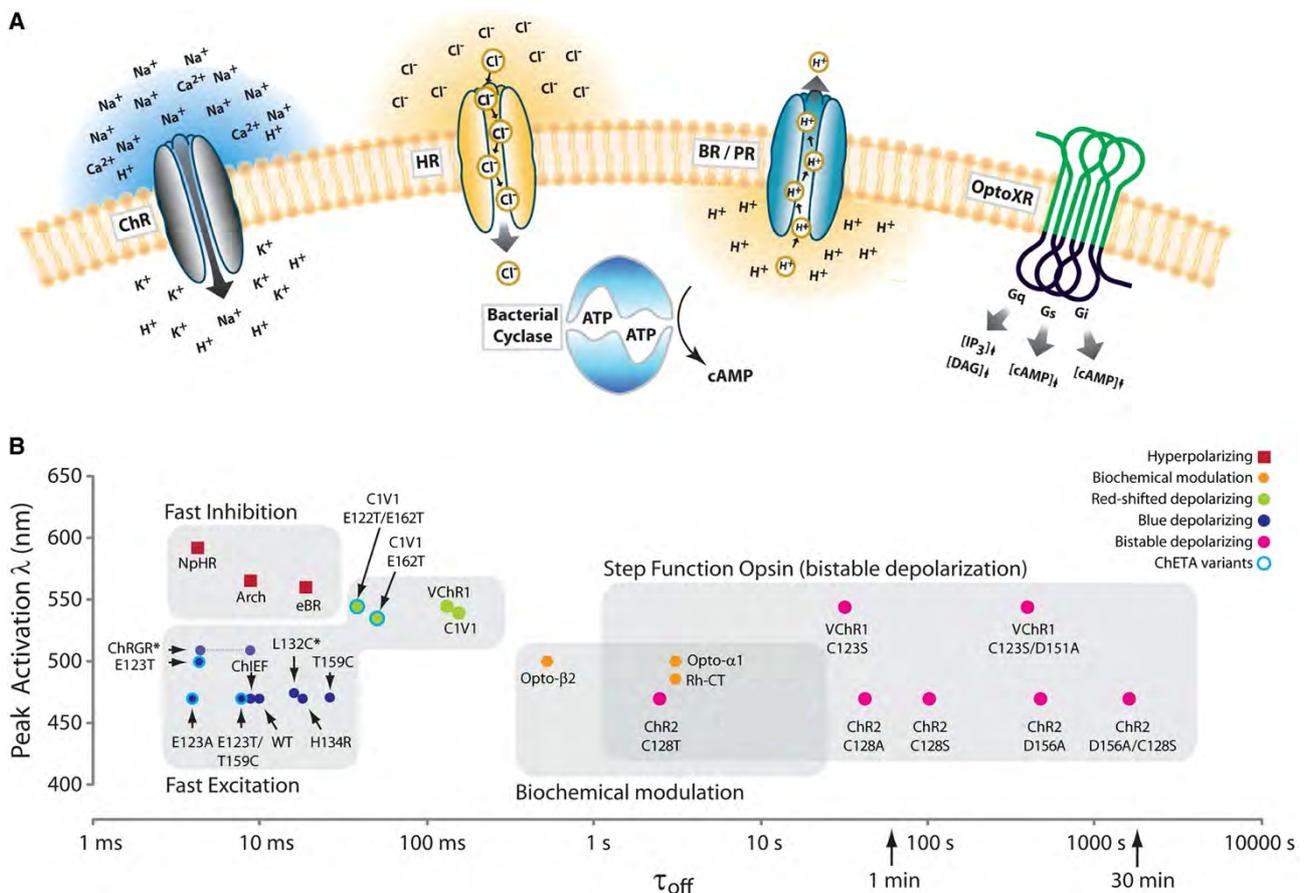


Figure 18 - Récapitulatif des outils optogénétiques et leur propriétés cinétiques et spectrales (84)

## I.4 Partie génétique de l'optogénétique

Dans cette partie nous développerons les **différentes méthodes biotechnologiques** permettant d'**insérer, dans le génome de cellules ciblées, le gène de l'opsine ou une de ses formes modifiées**. Deux possibilités sont utilisées pour faire exprimer une opsine dans des cellules : l'utilisation de **vecteurs viraux et la création d'animaux transgéniques**. Il est à noter que l'utilisation de vecteurs synthétiques type liposomes n'a pas montrée une efficacité suffisante pour ces approches (10).

### I.4.1 Utilisation des vecteurs viraux en optogénétique

#### I.4.1.1 Le principe de vecteur viral et les types de virus utilisés

L'utilisation des vecteurs viraux est basée sur la capacité des virus à entrer dans une cellule et à détourner l'activité de celle-ci pour se reproduire. Ces vecteurs sont des virus modifiés par génie génétique pour fonctionner comme un « cheval de Troie ». Ils sont composés d'une capsidie identique à celle du virus de départ, renfermant un génome viral recombinant porteur du **gène** qui doit être exprimé. Ils sont modifiés pour ne plus pouvoir se répliquer dans la cellule. De ce fait, lorsqu'un virus infecte des cellules, celui-ci les « reprogramme » par transfert de son génome modifié à ses hôtes, et permettre l'expression du gène d'intérêt.

Pour produire un vecteur viral (Cf. figure 19), la première étape est d'éliminer les gènes pathogènes du virus et de conserver les gènes nécessaires à son fonctionnement – les gènes codant la protéine enveloppe, les gènes codant la capsidie, et les gènes assurant la régulation de la réplication – pour les intégrer chacun dans un plasmide. En parallèle, le gène d'intérêt est également intégré dans un plasmide avec un élément de signal (S) qui permet la réplication et l'empaquetage. La deuxième étape est d'introduire tous ces plasmides dans une culture de cellules pour produire le vecteur viral, les gènes viraux vont alors être transcrits et traduits, donnant des protéines pour former le virus, alors que le gène d'intérêt va seulement se répliquer. La troisième étape correspondra à la formation du vecteur viral dans la cellule avec empaquetage du gène d'intérêt dans l'enveloppe virale (85,86).

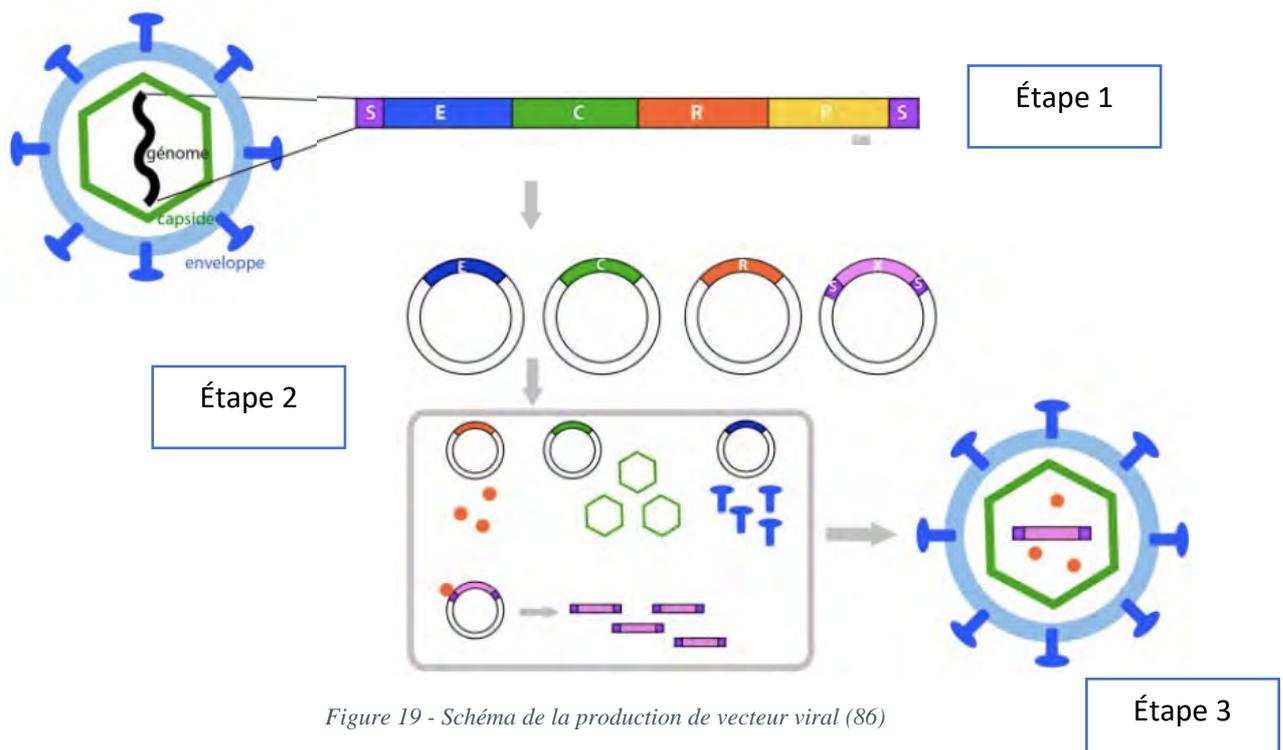


Figure 19 - Schéma de la production de vecteur viral (86)

Il existe plusieurs types de vecteurs viraux. Les virus les plus couramment utilisés pour le transfert du gène codant les opsines sont : les **Adénovirus**, les **AAV** ou Virus associés aux adénovirus, et les **lentivirus** appartenant à la famille des rétrovirus (10). Ces 3 types de virus ont des caractéristiques différentes et par conséquent des capacités d'utilisations différentes avec pour certains des limites (Cf. tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques des virus utilisés en tant que vecteurs :

	<b>Adénovirus</b>	<b>AAV</b>	<b>Lentivirus</b>
<b>Classification</b>	Virus à ADN dépourvu d'enveloppe (87)	Virus défectif associé à un virus auxiliaire nécessaire pour la reproduction dans l'hôte (87)	Rétrovirus associé à une transcriptase inverse (87)
<b>Génome viral</b>	ADN double brin (87)	ADN simple brin (87)	ARN double brin (87)
<b>Taille des particules virales (Diamètre)</b>	<b>Grande taille</b> (60 à 90 nm)	<b>Petite taille</b> : meilleure diffusion et donc une transduction de volumes étendus (80 nm)	Sa diffusion reste plus réduite que AAV (88) (80 à 100nm)
<b>Capacité de transport et taille maximale du transgène</b>	<b>Forte</b> 30 à 40 kb	<b>Faible</b> 5kb	<b>Moyenne</b> 10kb
<b>Intégratif ou non intégratif *</b>	<b>Non intégratif (89)</b>	<b>Non intégratif (89)</b>	<b>Intégratif (89)</b>
<b>Type de cellules cibles</b>	<b>En division ou quiescentes</b> (90)	<b>En division ou quiescentes</b> (90)	<b>En division</b> (90)
<b>Immunogénicité**</b>	<b>Forte</b> , ceci peut induire une perte rapide d'expression du transgène (91)	<b>Faible</b> , car c'est un vecteur de petite taille. A prouvé son innocuité dans plusieurs essais thérapeutiques de phase I (92,93)	<b>Faible</b> , les injections répétées sont possibles (94) A démontré son innocuité (88)

\*\*La capacité du vecteur à induire des réactions inflammatoires et immunitaires lorsqu'il est injecté dans l'organisme du sujet (95).

\*Intégratif veut dire que l'ADN du vecteur viral s'intègre dans l'ADN de l'hôte. Contrairement à non intégratif pour lequel le gène d'intérêt demeure dans la cellule sans intégrer le génome de la cellule hôte (90)

Les vecteurs viraux peuvent être utilisés aussi bien sur des cellules en culture, que sur des organismes entiers.

#### 1.4.1.2 Application des vecteurs viraux en optogénétique

Les vecteurs viraux, et en particulier les AAV, ont fait leur preuve en optogénétique (10). Ils sont impliqués dans plus de 75% des essais cliniques de thérapie génique (90). Par exemple, dans l'étude de Nathanson et al, apparue en 2009, les AAV sont utilisés pour cibler les neurones inhibiteurs et y faire exprimer une opsine (96). Plusieurs essais thérapeutiques de phase I ont permis d'établir l'innocuité de l'injection d'AAV dans le système nerveux central (93,97,98).

Deux systèmes d'expression ont été développés pour une application en optogénétique.

- Les premiers utilisent des promoteurs spécifiques qui aide l'expression de l'opsine dans des cellules choisies (Cf. figure 20a),
- Les deuxièmes utilisent des systèmes d'expressions à deux composants du type Cre-Lox. L'expression de l'opsine est alors sous le contrôle d'un promoteur avec une activité

transcriptionnelle plus forte permettant de conditionner l'expression pour les cellules positives à la recombinaise Cre (Cf. figure 20b). Différentes évolutions de ce système ont été développées par la suite comme FLEx (Flip-Excision) ou Cre-DIO (Double-floxed Orientation) (99,100).

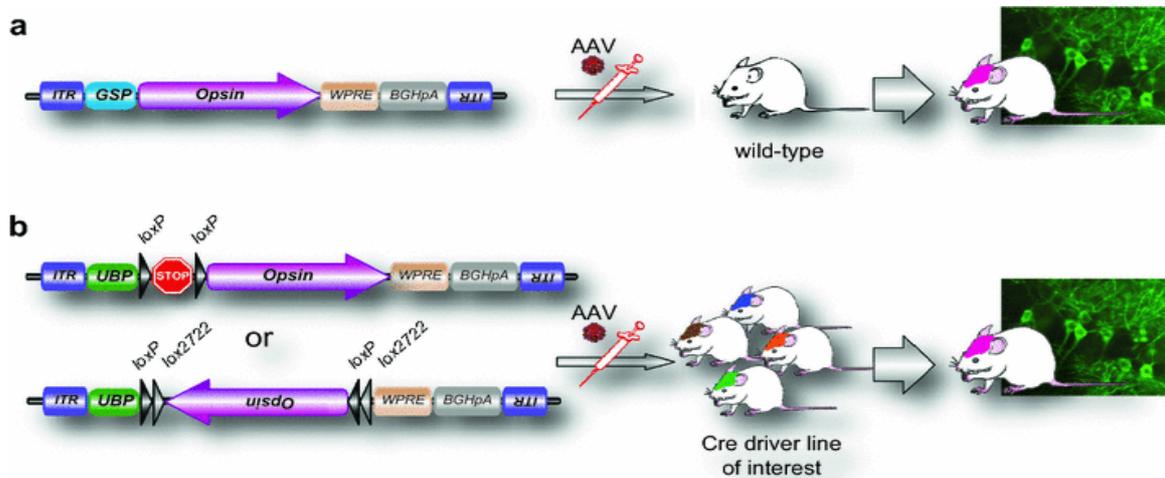


Figure 20 - livraison ciblée d'opsine au cerveau de souris basée sur des virus adéno-associés (AAV) (1)

AAV : Virus Adéno-Associé, ITR : Répétition terminale inversée, GSP : Promoteur spécifique du gène, UBP : Promoteur ubiquitaire, STOP : Termineur transcriptionnel, WPRE : Virus de l'hépatite de la marmotte pos transcriptionnel, BGHpA : Signal poly A de l'hormone de croissance bovine, LoxP (flèche): Système de recombinaison creLoxP

#### 1.4.2 Utilisation des animaux transgéniques en optogénétique

Aujourd'hui, plusieurs lignées de souris transgéniques ont été générées exprimant la channelrhodopsine (101,102).

L'obtention de souris transgéniques repose sur l'utilisation de cultures de cellules souches embryonnaires isolées au stade de blastocystes. La première étape est la construction d'un vecteur incluant une cassette de sélection et le gène de l'opsine (103). Ce vecteur est transfecté dans les cellules souches où se produit une recombinaison homologue intégrant le gène de l'opsine dans le matériel génomique des cellules souches. Les cellules sélectionnées par le gène de « sélection » sont ensuite injectées à un blastocœle d'un embryon implanté dans une souris gestante permettant ainsi la naissance de souris « mosaïque » à partir desquelles on obtiendra des souris hétérozygotes et homozygotes pour le gène de l'opsine (103). Diverses zones cérébrales et types de cellules peuvent être efficacement ciblées (104).

Des systèmes d'expression conditionnelle ont également été générés, basés sur l'utilisation du système de la recombinaise Cre, en utilisant des lignées des souris transgéniques conductrices de Cre (101,102). Tout comme l'utilisation dans les virus, cela permet de cibler l'expression dans des populations cellulaires, et d'augmenter l'expression de la protéine photosensible (Cf. figure 21) (1)(5). La figure 21 présente une version classique d'une transgénèse avec le système Cre-Lox. Cela consiste à croiser une souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle d'un promoteur (spécifique) avec une souris « rapportrice ». Cette dernière exprime l'opsine sous le contrôle d'un promoteur (fort) devant lequel est rajouté un codon STOP flanqué par des sites loxP. Ce codon STOP empêche l'expression du transgène en absence de la recombinaise Cre. Pour les souris F1 issues de ce croisement, le codon STOP est excisé uniquement dans les cellules exprimant Cre, ce qui permet la transcription du gène de l'opsine de manière ciblée (1)(5).

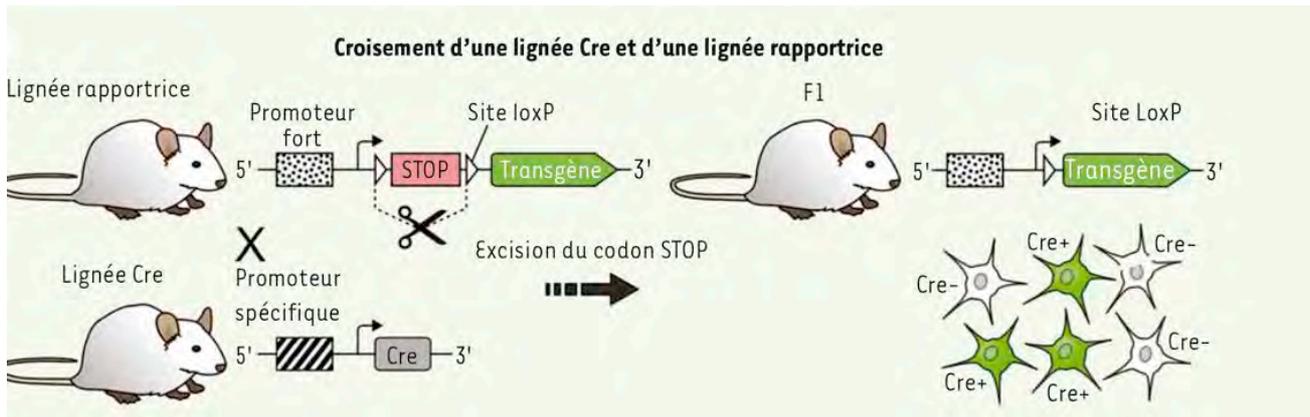


Figure 21 - Approches transgéniques pour l'expression d'opsine dans le cerveau de souris (5)

**BGHPA** : Signal poly A de l'hormone de croissance bovine, **GOI** : Gène d'intérêt, **GSP** : Promoteur spécifique du gène, **RES** : Côté entrée ribosomique interne, **STOP** : Termineur transcriptionnel, **UBP** : Promoteur ubiquitaire, Flèche : système cre-<LoxP

#### 1.4.2.1 Avantages et limites de l'utilisation des vecteurs viraux en optogénétique

D'une façon générale, la conception des vecteurs viraux **simplifie** l'approche expérimentale. En effet, il faut seulement quelques semaines pour produire un virus et exprimer une opsine de manière stable, étendue et durable dans des cellules. Cependant, il existe quelques **inconvenients et limites** d'utilisation. Il faut maîtriser certains risques comme les risques inhérents à l'expression induite par ces vecteurs viraux qui peuvent conduire à une surexpression d'opsine. Également, prendre en compte la photo-toxicité de la longueur d'onde qui sera utilisée pour activer le gène d'intérêt.

La **surexpression des opsines risque** d'altérer les propriétés de la cellule. Plusieurs mécanismes toxiques sont possibles (105) :

- L'accumulation intracellulaire en elle-même peut être nocive.
- L'opsine peut modifier les propriétés de la membrane plasmique, ce qui peut être nuisible à la cellule.
- Enfin, les effets délétères peuvent être dû à un influx excessif de type d'ion particulier au cours de la stimulation lumineuse chronique (105).

Par exemple, l'activation répétée de l'opsine ChR2 – tout en connaissant la perméabilité non négligeable en calcium – peut induire un recrutement des voies de signalisation pro-apoptotiques dépendantes du Ca<sup>2+</sup>(106).

Pour éclairer des volumes suffisamment étendus, la concentration de l'intensité lumineuse doit être assez forte. Ceci induit un **échauffement local du tissu** qui peut perturber les cellules (105). Par exemple, la lumière bleue sur un tissu neuronal peut induire une modulation artéfactuelle de l'activité neuronale au-delà du seuil d'irradiation de 300-500 mw/m<sup>2</sup>. La photo-toxicité peut être atténuée par l'utilisation d'une opsine à spectre d'activation décalé vers le rouge (rayonnement lumineux plus pénétrant et moins porteur d'énergie) (107–109).

Depuis 1980, de nombreuses études expérimentales sur des animaux utilisent l'optogénétique. Les résultats sont de plus en plus prometteurs au fil des années apportant de nouvelles connaissances à la médecine. C'est le point abordé dans la deuxième partie de cette thèse.

## II LES APPORTS SCIENTIFIQUES DE L'OPTOGENETIQUE ET SES POTENTIELS THERAPEUTIQUES :

Les apports de l'optogénétique en médecine se résument en trois grands axes. Le premier est de **compléter le savoir physiopathologique** de certaines maladies. La technique permet de manipuler de nouveaux éléments du circuit pathologique et de rendre plus précis l'origine du dysfonctionnement ou de mettre en évidence de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

S'en suit, l'ensemble des **caractéristiques innovantes en comparaison avec les techniques existantes**. Ceci comprend l'observation et le contrôle spatio-temporel des cellules avec précision et rapidité, la manipulation à distance par la lumière, la manipulation sur un modèle animal vivant (permettant d'observer un comportement par exemple), la possibilité d'expérimenter sur le même groupe animal (le groupe témoin est le groupe contrôle) afin d'éviter les variabilités interindividuelles ou encore l'aspect peu invasif de la technique.

Enfin, son **potentiel à se développer en stratégie thérapeutique**. En effet, si la technique peut activer ou inhiber des éléments du circuit pathologique et mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques, alors il paraît évident que cette-dernière peut agir comme un traitement thérapeutique.

L'optogénétique est une méthode surtout utilisée dans le domaine des **neurosciences** et dans les **maladies neurologiques**. En effet, les caractéristiques évoquées plus haut font d'elle une des rares techniques permettant de cibler et manipuler des cellules difficiles à atteindre avec précision, les neurones (5). Ainsi, la photo-stimulation de populations neuronales ciblées *in vivo*, enrichi d'une part nos connaissances sur le fonctionnement cérébral et envisage d'autre part d'intervenir sur le système nerveux dans les troubles neurologiques associés. En effet, pendant longtemps, les stimulations électriques ou les agents pharmacologiques étaient les seuls outils pour mesurer et contrôler l'activité électrique neuronale. Ces outils présentent plusieurs limites, notamment des dommages mécaniques infligés au tissu cible, le manque de précision de la stimulation ou la nécessité d'une dissection (110) (111). Pendant longtemps, les chercheurs ont essayé de trouver une méthode permettant d'analyser les circuits neuronaux avec précision tout en évitant d'endommager le tissu. L'utilisation de la lumière et des protéines photosensibles pour modifier l'activité des neurones a semblé être une solution.

Dès 2006, l'optogénétique a permis un contrôle fiable de la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice (6), en d'autres termes, c'est devenu **une nouvelle technique de neuromodulation en temps réel et d'une précision spatio-temporelle inégalée**. (33) (112) (113,114) (115).

Tout au long de cette deuxième partie nous évoquerons plusieurs expériences illustrant les 3 grands axes « d'apports » évoqués ci-dessus. Nous développerons dans un premier temps les innovations de l'optogénétique en neurosciences en termes d'observation et de compréhension générale du cerveau, par la suite nous aborderons les points pour les troubles neurologiques, psychiatriques et ophtalmiques en abordant diverses expériences optogénétiques sur des modèles d'animaux pathologiques.

### II.1 Apports majeurs de l'optogénétique en neurosciences

La possibilité d'activer ou d'inhiber spécifiquement des neurones a permis une meilleure compréhension du connectome du cerveau. Le **connectome** est une carte complète de connexions neuronales dans le cerveau (116,117). À l'échelle microscopique, la connectomique ou étude des connectomes, décrit la disposition des neurones et des synapses dans le système nerveux d'un

organisme. À l'échelle macroscopique, elle étudie la connectivité fonctionnelle et structurelle entre toutes les aires corticales et sous-corticales du cerveau.

Les fonctions dépendantes du cerveau sont le fruit d'interactions entre de nombreuses zones cérébrales éloignées les unes des autres. Cartographier les connectivités synaptiques permet aux chercheurs en neurosciences d'en savoir plus sur des fonctions telles que la motricité, la perception, la mémoire, le langage ou encore les prises de décision. De plus, les pathologies neurologiques correspondent à un dysfonctionnement du cerveau ou du système nerveux. Leurs origines et les mécanismes cellulaires impliqués sont souvent mal connus dues aux limites des techniques d'analyse (Cf. tableau 8).

Il existe plusieurs méthodes pour **cartographier un cerveau** mais elles sont sujettes à des limites à l'échelle spatiale (Cf. tableau 8). En utilisant l'optogénétique, l'aspect spatial est contrôlable grâce à l'expression génétique spécifique de l'opsine dans les neurones cibles. L'utilisation de la ChR2 a permis de cartographier par simple photostimulation les circuits entre les neurones présynaptiques et les neurones post-synaptiques (48,118).

La méthode se nomme **CRACM** pour « **ChR2-assisted circuit mapping** » ou cartographie de circuit assistée par ChR2 (118).

Tableau 8 : Les méthodes classiques de cartographie du cerveau et leurs limites :

Méthode actuelle	Résultat cartographique	Limite spatiale	Apport de l'optogénétique
<b>Microscope optique</b> (119)	Cartographie à l'échelle de <b>micro-synapse</b> .	On ne peut pas voir de <b>quelles régions du cerveau sont issus les axones connectés</b> aux dendrites observées au microscope.	On peut voir à la fois la synapse, les terminaisons dendritiques et les faisceaux d'axones impliqués (48). De cette manière, on peut comprendre quelles zones du cerveau, même éloignées, sont connectées entre elles.
<b>Techniques de traçage de voies nerveux</b> (Coloration Brainbow) (120)  <b>Techniques d'imageries classiques</b> (EEG, PET scan, IRM) (121)  <b>Imageries de diffusion</b> (IRM de diffusion, DWI, DSI) (122)	Cartographier les <b>grands faisceaux</b> de fibres nerveuses qui se déploient dans tout le cerveau	Leur résolution est insuffisante pour voir les <b>détails des synapses</b> où les faisceaux d'axones se connectent entre eux.	
<b>Paired-recording</b> ou Les enregistrements appariés (123)	Tester les <b>connexions entre plusieurs neurones</b> .	Limités dans le <b>nombre de neurones</b> pouvant être enregistrés.	Pas de limite de nombre de neurones, l'expression de l'opsine cible autant de neurones souhaités. Permet d'examiner un large champ de vision sur plusieurs couches et une grande population de cellules.
<b>Uncaging</b> (123)	Examiner les <b>connexions sur une longue portée</b> .	<b>Manque de spécificité</b> de type cellulaire.	Spécifique au type cellulaire grâce à l'expression génique par promoteur spécifique. Cela permet d'examiner des connexions avec des types de cellules spécifiques plutôt qu'avec des types de cellules inconnus.

La **cartographie par CRACM** consiste à faire exprimer ChR2 dans une population de **neurones** ciblés. En même temps que la photostimulation des neurones ChR2+, **un neurone individuel** est enregistré par une méthode électrophysiologique. Tous les neurones ChR2+ activés et connectés au neurone enregistré provoquent **une réponse électrophysiologique**. La totalité des réponses électrophysiologiques génère une carte thermique des connexions entre le neurone enregistré et les neurones environnants.

Le moment, le nombre et la localisation spatiale de ces potentiels d'action sont contrôlés avec précision par la lumière, permettant ainsi une cartographie fonctionnelle des circuits corticaux.

Alors que les techniques existantes sont limitées aux circuits neuronaux locaux, la CRACM peut ainsi être utilisée pour étudier les projections à longue portée. Grâce aux progrès technologiques, la CRACM permet de concentrer la stimulation à des couches spécifiques, à la taille de la zone à examiner et aux neurones à illuminer. La CRACM est donc un outil puissant permettant aux scientifiques d'étudier les circuits neuronaux vastes et complexes (124).

Plusieurs études (Cf. tableau 9) ont été menées sur les modèles murins en faisant exprimer ChR2 – par vecteurs viraux ou par animaux transgéniques - dans les neurones de la zone ciblée à cartographier. Le but étant soit de faire une simple cartographie des connexions (48) soit de comprendre le fonctionnement des zones cérébrales impliquées dans des fonctions cognitives (125)(126). La technique permet également de mettre en évidence les défaillances de connexions synaptiques spécifiques chez des souris malades (123).

Tableau 9 : Expériences utilisant CRACM chez la souris :

Méthode Optogénétique	Objectif	Modèle/cellules ciblées	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : Thy1.2 <b>Modèle animal</b> : Souris transgéniques par injection pronucléaire standard (127)	Cartographie de microcircuits d'une large région corticale ciblée.	Les neurones corticaux de la couche V*, pyramidaux de l'hippocampe, les fibres dans le cervelet et divers neurones dans le thalamus, mésencéphale et le tronc cérébral inférieur	Cartographie réussie de la distribution spatiale des circuits synaptiques reliant les neurones dans le cortex cérébrale.	(48)
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : Thy1.2 <b>Modèle animal</b> : Souris avec le syndrome de l'X fragile (Knock-out pour le gène Fmr1)	Démontrer les différences significatives dans la façon dont un modèle animal du syndrome de l'X fragile code les informations en étudiant les connexions dans V1.	Cellules couche V et IV* de l'aire V1**	Perte de la potentialisation des cellules de la couche V à la IV. Dépression significative des neurones des couches V à IV.	(123)
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : CamKII <b>Vecteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : Souris transgéniques saines.	Comprendre les connexions entre les cellules principales du noyau basal de l'amygdale (NbA) avec les interneurons de la régions (PV et CCK***) pour les <b>fonctions</b>	Expression ChR2 dans les interneurons (PV et CCK).  Enregistrement des cellules principale du noyau basal de l'amygdale.	Les 2 interneurons contrôlent avec la même puissance l'activation des cellules principales du NbA mais ils sont activés différemment par les cellules principales.	(125)

	<b>d'apprentissage de mémoire.</b>			
<b>Outil</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : hSyn ou CamKII ou EF1a <b>Vecteur</b> : AAV1 ou AAV9 <b>Modèle animal</b> : Souris Cre ou DIO ou FLEX transgéniques saines.	Comprendre comment le thalamus cible des types de cellules spécifiques dans la couche L1 du cortex préfrontal (PFC) pour <b>les fonctions cognitives et l'éveil.</b>	Expression ChR2 dans les neurones du thalamus ventromédial (VM) ou médiodorsal (MD).  Enregistrement des Interneurones dans le PFC prélimbique.	Les noyaux thalamiques engagent des micro-circuits inhibiteurs distincts qui influencent le PFC. Le thalamus VM et VD engagent 2 classes d'interneurones L1 dans le PFC.	(126)

\*Couche V ou couche pyramidale interne est une des 6 couches du cortex cérébrale.

Couche VI ou couche polymorphe est une des 6 couche du cortex cérébrale (la plus profonde).

\*\*Aire V1 est l'aire ou cortex visuel(le) primaire.

\*\*\* PV sont des interneurones exprimant la parvalbumine et CCK sont des interneurones exprimant la cholécystokinine.

Ainsi, il a été montré que dans le syndrome de L'X fragile les connexions des neurones impliqués sont moins puissantes. L'optogénétique a également permis de comprendre quels types de connexions existent entre les neurones du noyau basale de l'amygdale impliqués dans les fonctions d'apprentissages et de mémoire. Enfin, nous découvrons l'engagement de 2 classes d'interneurones L1 dans le PFC pour les fonctions cognitives et l'éveil.

En plus de faire une image à l'instant T du cerveau, l'optogénétique permet également d'agir sur la plasticité synaptique. Les modifications des connexions correspondent à **la plasticité synaptique** qui est nécessaire au bon fonctionnement du cerveau et à la base de l'apprentissage et de la mémoire (128).

## II.2 Apport de l'optogénétique pour les troubles neurologiques

La physiopathologie des troubles neurologiques n'est pas toujours expliquée. Elle met en cause le dysfonctionnement d'une partie d'un circuit cérébral (à la suite d'un déséquilibre de neurotransmetteur ou le dysfonctionnement d'une synapse par exemple).

Il existe deux grands types de traitements pour certains troubles neurologiques :

- Le traitement pharmacologique en première intention,
- La stimulation cérébrale profonde (SCP) en deuxième intention

Les traitements pharmacologiques sont des molécules, prises par ma voix orale en général, agissant sur une molécule ou cellule impliquée dans le mécanisme pathologique. L'inconvénient de ce type de traitement est la possibilité pour le principe actif d'agir sur d'autres tissus de l'organisme et donc d'induire des effets secondaires.

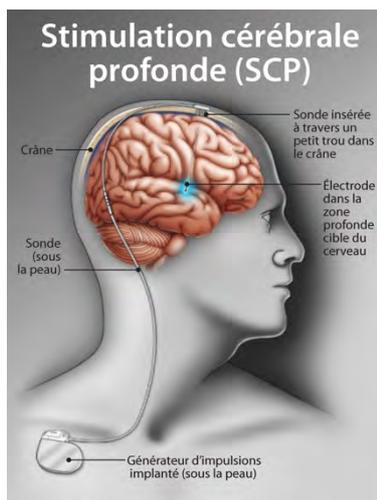


Figure 22 - Le système de SCP (129).

La SCP est un traitement neurochirurgical consistant en une opération de positionner 2 électrodes au niveau du noyau sous-thalamique. Ces électrodes sont reliées par des fils (sous la peau) à deux stimulateurs électriques situés au niveau des clavicules (sous la peau). Les stimulateurs envoient des impulsions électriques qui activent les cellules nerveuses défaillantes (129) (Cf. figure 22).

Elle est utilisée lorsque le patient est pharmaco-résistant dans certaines maladies neurologiques telles que Parkinson et l'épilepsie et certaines maladies psychiatriques comme la dépression sévère.

Ce traitement implique plusieurs inconvénients. Notamment des effets secondaires dus à l'imprécision de la zone stimulée et les risques lors de la mise en place du matériel (risque hémorragique préopératoire et post-opératoire et risque infectieux) (130) (131).

Quelle que soit la cible anatomique et la maladie à traiter, la SCP ne bloque jamais complètement la progression de cette dernière et s'ensuit une aggravation des symptômes (129).

L'idéal pour un traitement est d'atteindre l'élément précis du circuit causant le dysfonctionnement de celui-ci afin de minimiser les effets secondaires. Les caractéristiques de l'opogénétique permettent de se rapprocher de cet idéal.

Nous allons d'abord aborder la symptomatologie de certaines maladies neurologiques puis découvrir l'apport de l'opogénétique en termes de compréhension physiopathologique et thérapeutique pour chacune d'elles.

### II.2.1 Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson touche 6,5 millions de personnes dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 200 000 en France et 25 000 nouveaux cas diagnostiqués par an. 1% des plus de 65 ans sont concernés (132).

#### II.2.1.1 Symptomatologie et physiopathologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est **une maladie neurologique dégénérative** (132)(133). Les **neurones dopaminergiques** dégèrent pour disparaître progressivement induisant une diminution importante de dopamine.

La dopamine est un neurotransmetteur impliqué dans le contrôle des mouvements volontaires, la cognition, la motivation et les affects en stimulant **le noyau sous-thalamique (NST)** (134). Chez un patient parkinsonien **le noyau sous-thalamique n'est donc pas suffisamment stimulé** dû à la diminution de dopamine, expliquant les symptômes (la triade de symptômes moteurs et psychologiques) (132)(133) (135,136).

Aujourd'hui, la principale approche thérapeutique pour lutter contre le déficit en dopamine consiste à administrer son précurseur naturel direct, la **lévodopa (L-DOPA)**, par voie orale. Ce traitement corrige l'activité pathologique et allège les symptômes moteurs mais il devient inefficace à moyen terme en entraînant des fluctuations motrices ainsi que des mouvements anormaux involontaires (dyskinésies) (137). C'est à ce stade qu'un traitement neurochirurgical alternatif est

proposé : la **SCP** du noyau sous-thalamique (138). Elle améliore la qualité de vie des patients parkinsoniens mais ne bloque pas complètement la progression de la pathologie (129) et induit des **effets secondaires** comme le développement d'un syndrome confusionnel, l'aggravation de troubles de l'élocution, de la dépression, de l'apathie, des crises maniaques et de l'impulsivité (129).

### II.2.1.2 Approches optogénétiques dans la maladie de Parkinson

Des études utilisent l'optogénétique sur des **rongeurs** afin d'identifier - le plus précisément possible - l'élément du circuit à l'origine de la pathologie dans un premier temps et d'analyser l'apport de l'optogénétique comme un potentiel traitement dans un second temps (Cf. tableau 9). Les chercheurs font exprimer des opsines - eNpHR ou ChR2 - soit par vecteurs viraux soit par transgénèse à l'aide d'un promoteur spécifique - CamKII ou Thy1 - d'un type cellulaire du NST et observent les symptômes parkinsoniens moteurs avant et après photo-stimulation.

Tableau 9 : Expériences optogénétique sur des modèles d'animaux parkinsoniens :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine</b> : eNpHR <b>Promoteur</b> : CaMKII* $\alpha$ spécifique des neurones glutamatergiques du NST. <b>Promoteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : rats hémiparkinsoniens	<b>Cellules excitatrices</b> du noyau sous-thalamique.	Pas de diminution significative des symptômes parkinsoniens moteurs	(139)
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : CaMKII* $\alpha$ spécifique des neurones glutamatergiques du NST. <b>Promoteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : rats hémiparkinsoniens	<b>Cellules excitatrices</b> du noyau sous-thalamique.	Pas de diminution significative des symptômes parkinsoniens moteurs	(139)
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : Thy1. <b>Promoteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : rats hémiparkinsoniens	<b>Axones afférents</b> du noyau sous-thalamique.	Diminution significative des symptômes parkinsoniens moteurs	(139)
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : Thy1. <b>Promoteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : rats hémiparkinsoniens	<b>Neurones de projection</b> du cortex moteur M1** et M2*** de lignée de rats hémiparkinsoniens	Diminution significative des symptômes parkinsoniens moteurs lors de stimulation de M1 et M2 (à des fréquences différentes).	(139)

\* protéine kinase dépendante du calcium/calmoduline  $\alpha$  II

\*\* Cortex moteur primaire ou aire motrice primaire

\*\*\*Cortex moteur secondaire ou aire motrice secondaire ou cortex pré-moteur

L'activation (par ChR2) ou l'inhibition (par NpHR) des cellules excitatrices du NST n'a aucun effet, tandis que l'activation des afférences vers le cortex moteur secondaire M2 induit une diminution significative des symptômes chez le rongeur. Bien que les électrodes de la **SCP soient placées sur**

**toute la zone du NST, on peut comprendre grâce à l'optogénétique que cette méthode est uniquement efficace au niveau des afférences vers le cortex moteur M1 et M2.**

Dans un futur proche, la stimulation optogénétique peut être envisagée dans le traitement de la maladie, en effet elle est **beaucoup moins invasive que la SCP** (131). De plus, elle reproduit les effets de la stimulation cérébrale profonde avec **plus de précision** en ciblant uniquement la composante motrice du faisceau cortico-sous-thalamique sans toucher les composantes associées (Limbiques et associatives) évitant ainsi les effets secondaires (131).

## II.2.2 Épilepsie et optogénétique

L'épilepsie est diagnostiquée chaque année chez environ 5 millions de personnes dans le monde (140). C'est l'une des affections neurologiques les plus fréquentes. Aujourd'hui, environ 50 millions de personnes sont atteintes par cette maladie dans le monde (140).

### II.2.2.1 Symptomatologie et physiopathologie de l'épilepsie

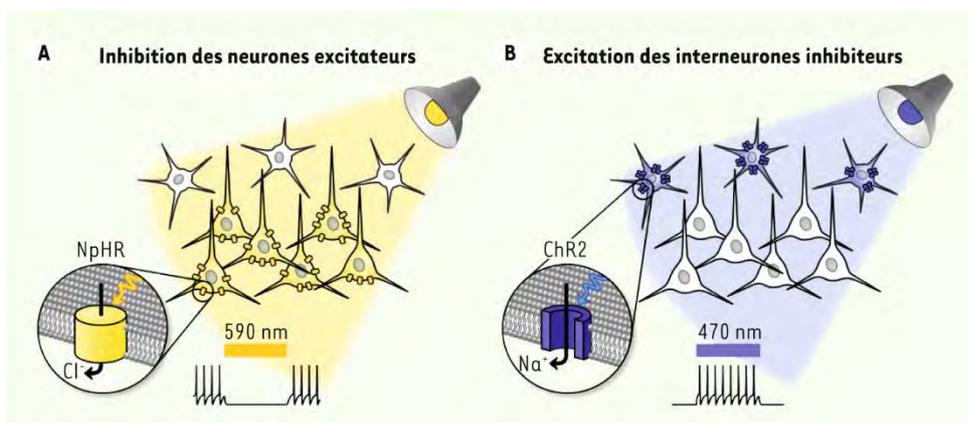
L'épilepsie est caractérisée par l'apparition intermittente de crises appelées **ictus épileptiques**. Le tissu nerveux a une activité anormalement intense et/ ou hyper synchrone. Le déséquilibre entre les neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs est incriminé dans la genèse des crises : Le taux de neurotransmetteur inhibiteur (GABA) est anormalement bas alors que le taux de neurotransmetteur excitateur (glutamate) est anormalement élevé (141).

Les traitements en première intention sont des **agents pharmacologiques** (antiépileptiques) qui visent à diminuer l'excitabilité des réseaux neuronaux. Si les traitements pharmacologiques ne fonctionnent pas, on parle de patients pharmaco-résistants, la **neurochirurgie résective** est proposée en seconde intention. Ces deux premiers traitements ont de nombreux effets secondaires. Les effets des antiépileptiques ne se limitent pas à la durée de l'ictus et peuvent affecter le fonctionnement normal du cerveau entre chaque crise, donnant lieu à des effets indésirables tels que les vertiges, le trouble de la vision, et la somnolence. Quant à la neurochirurgie résective, elle peut s'accompagner de plusieurs déficits post-opératoires. Plusieurs études chez l'homme ont fait l'objet de l'utilisation de **la stimulation cérébrale profonde (SCP)** pour le traitement de l'épilepsie pharmaco-résistante permettant de diminuer la sévérité et la fréquence des crises (142). La seule efficacité démontrée jusqu'à présent est la stimulation du noyau antérieur du thalamus (143).

### II.2.2.2 Approche optogénétique dans l'épilepsie

La neuromodulation optogénétique peut **corriger le déséquilibre de la balance excitation/inhibition**, par le **contrôle sélectif des neurones excitateurs ou inhibiteurs**.

Les outils optogénétiques sont intéressants pour corriger des crises épileptiques car ils sont soit hyperpolarisants soit dépolarisants. Il faut sélectionner le bon outil pour corriger la cause du déséquilibre. En effet, les opsines de la famille **NpHR**, vont entraîner une hyperpolarisation inhibant les neurones excitateurs. A l'inverse, l'utilisation de **ChR2**, pourra entraîner une dépolarisation permettant l'excitation des interneurons inhibiteurs locaux (Cf. figure 23).



Reproduit  
d'après (144)

Figure 23 - Stratégies optogénétiques pour le traitement de l'épilepsie (5, 144)

Des chercheurs font exprimer des opsines - NpHR ou ChR2 - et leurs variants, à l'aide de vecteurs viraux, dans des cellules de l'hippocampe *in vitro* ou *in vivo* et observent l'activité épileptiforme avant et après photostimulation (Cf. tableau 10).

Ces études permettent de conclure sur le type de cellules qu'il faut inhiber ou exciter pour supprimer une bouffée d'activité épileptique.

Tableau 10 : Expériences optogénétique sur des modèles *in vitro* ou *in vivo* dans l'épilepsie :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Principaux résultats	Références
<b>Opsine</b> : NpHR <b>Promoteur</b> : CaMKII <b>Vecteur</b> : lentivirus <b>Modèle animal</b> : souris épileptiforme.	<i>In vitro</i> : Cultures organotypiques d'hippocampe de souris.	Inhibition des bouffées d'activité épileptiforme électro induites jusqu'à suppression de l'activité épileptiforme.	(145)
<b>Opsine</b> : eNpHR3.0 <b>Promoteurs</b> : spécifiques <b>Vecteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : rat épileptiforme	<i>In vivo</i> : <b>Neurones hippocampiques glutamatergiques</b> (excitateurs).	Inhibition significative de l'étendue électro-graphique et comportementale de la crise.	(146)
<b>Opsine</b> : ChR2(H134R) <b>Promoteurs</b> : EF1a <b>Vecteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : souris épileptiforme.	<i>In vitro</i> : <b>interneurones GABAergiques Gad2*</b> et <b>PV*</b> .	L'activation de Gad2 supprime significativement l'activité épileptiforme.	(147)

\*Les interneurons Gad2 sont des interneurons qui expriment l'acide glutamique décarboxylase 2.

\* PV sont les interneurons qui expriment la parvalbumine.

Ainsi la neuromodulation optogénétique permet dans un premier temps de mieux comprendre le mécanisme physiopathologique de l'épilepsie en constatant les résultats en temps réel de l'activation ou l'inhibition précise **composant par composant** du circuit de l'épilepsie. Les résultats permettent de conclure que l'inhibition par photo-stimulation des neurones excitateurs de l'hippocampe et/ou l'activation des interneurons Gad2 inhibent l'activité épileptiforme jusqu'à la supprimer (145) (146) (147). Dans un second temps, la méthode optogénétique peut être envisagée dans un futur pour être utilisée comme solution thérapeutique comme la SCP, sans les effets secondaires et les limites physiques de l'implantation d'électrodes.

## II.2.3 Apport optogénétique pour la douleur chronique

### II.2.3.1 Symptomatologie et physiopathologie de la douleur chronique

La douleur chronique, une physiopathologie **complexe** et **multifactorielle**, implique tous les niveaux du système nerveux : central (SNC) et périphérique (SNP) (148). **Une approche multi-cible** est souvent requise afin de complètement soulager le patient. Ceci induit des risques d'apparition d'**effets secondaires cumulatifs** (148).

La douleur est à la fois une composante sensorielle et une composante émotionnelle. Les stimuli nocifs sont détectés par les nocicepteurs périphériques (SNP) puis transmis aux centres supérieurs (SNC), où ils sont perçus comme une sensation désagréable (148).

Les traitements actuels sont surtout des traitements pharmacologiques (les analgésiques non opioïdes et les opioïdes) et des médicaments d'autres classes comme les antidépresseurs et anticonvulsivants. Leur effet **analgésique est limité** en plus d'induire des **effets secondaires** indésirables (149). De plus, à cause de ces effets secondaires, les patients souffrants de douleurs chroniques finissent par **abandonner la pharmacothérapie** (150), sans oublier les risques de dépendances aux opioïdes (151).

La meilleure façon de traiter la douleur est d'inhiber spécifiquement les cibles moléculaires responsables de celle-ci. Pour cela, il faut connaître avec précision l'étiologie de la douleur chronique, aujourd'hui ce n'est pas toujours le cas. Sur ce point, l'optogénétique entre en jeu car il n'y a plus besoin de cibles moléculaires spécifiques pro-nociceptives et donc plus besoin de connaître l'étiologie précise, puisque la méthode peut permettre de **cibler la transmission de la douleur** et ainsi de moduler directement l'activité des neurones à la source du signal douloureux.

### II.2.3.2 Apport de l'optogénétique dans la douleur au niveau du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP)

Plusieurs expériences utilisent l'optogénétique pour **comprendre** ou **traiter** la douleur chronique en identifiant toutes les potentielles cibles (Cf. tableau 11, 12, 13 et 14). En effet, la plupart des techniques d'analyses classiques utilisées jusqu'à aujourd'hui imposent la dissection du cerveau et donc la mort du modèle animal alors qu'il est nécessaire de maintenir l'animal en vie pour observer ses réactions face à la douleur et conclure au seuil de sensibilité. L'optogénétique permet de dépasser cette limite et de réaliser des tests tels que le test plantaire (152) ou encore la plaque chaude/froide (153).

Plusieurs structures du système nerveux central sont impliquées dans la perception de la douleur et ont un impact sur notre seuil d'hypersensibilité.

En se basant sur les connaissances actuelles dans ce domaine, des chercheurs utilisent l'optogénétique sur des modèles murins. Ils ciblent des structures du SNC pour comprendre leurs rôles **précis** dans la perception de douleur. L'idée est de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour soulager lorsque la source ou l'origine de la douleur sont inconnues ou inaccessibles.

Des chercheurs vont faire exprimer des opsines - ChR2, NpHR ou Arch - dans ces diverses structures :

- les neurones et interneurones (qui régulent les microcircuits gabaergiques locaux) du **cortex cingulaire antérieur (CCA)** (154)(155).

- Les neurones excitateurs **du noyau central de l'amygdale (CeA)** pour évaluer la nociception vésicale (156) (157,158).
- Les neurones sérotoninergiques du **noyau raphé dorsal**
- Les interneurons du **cortex préfrontal (CPF)** (159) (160) (161,162) (163,164).

Tableau 11 : Expériences optogénétiques – In vivo – mettant en évidence le rôle de diverses structures du SNC dans la douleur :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Critère d'évaluation primaire après photostimulation	Principaux résultats	Références
<b>Opsine :</b> ChR2 ou eNpHR3.0 <b>Promoteur :</b> Thy1 <b>Modèle d'animaux :</b> Souris transgéniques <b>Modèle de douleur :</b> Douleur mécanique (inflammation chronique) ou induite par injection formol.	<b>ChR2</b> Neurones inhibiteurs de CCA sur une lignée de souris.	Enregistrements électrophysiologiques de l'activité CCA  Test comportemental réponse à la douleur sous forme de soulèvement ou léchage de patte injectée	Inhiber CCA a significativement <b>réduit la perception de la douleur</b> ou augmente le seuil d'hypersensibilité.	(165)
	<b>NpHR3.0</b> Neurones excitateurs pyramidaux de CCA.		Activer CCA a significativement <b>augmenté la perception de la douleur</b> ou baisse le seuil d'hypersensibilité.	
	<b>ChR2</b> Neurones excitateurs pyramidaux de CCA.		L'activation de <b>PV inhibe CCA et induit une augmentation du seuil d'hypersensibilité à la douleur.</b> L'activation de <b>SOM n'a aucun effet sur les seuils de la douleur.</b>	
<b>Opsine :</b> ChR2 <b>Promoteur :</b> CMV <b>Vecteur :</b> HSV <b>Modèle d'animaux :</b> souris	Neurones excitateurs (mGluR5 +) du CeA de souris vivantes.	Réponse comportementale à la distension de la vessie, quantifiée à l'aide du VMR**	La stimulation de CeA induit <b>une hypersensibilité durable à la distension de la vessie.</b>	(166)
<b>Opsine :</b> ChR2 <b>Promoteur :</b> Ubiquitaire <b>Vecteur :</b> AAV <b>Modèle animal :</b> Souris transgénique SERT-Cre <b>Modèle de sensibilisation :</b> stimulation plantaire	Neurones sérotoninergiques du raphé dorsal chez des souris vivantes.	Mesure de la réactivité mécanosensorielle des souris par le <b>test de Von Frey</b> (Cf. annexe)	La stimulation des neurones sérotoninergiques du raphé dorsal induit <b>une diminution rapide et réversible des réponses des animaux à la stimulation plantaire.</b> On conclue à une baisse du seuil de sensibilité.	(167)
<b>Opsine :</b> ChR2 et Arch3 <b>Promoteur :</b> <b>Vecteur :</b> <b>Modèle animal :</b> croisement souris knockin PV-Cre et souris ai32 et ai35D***	Interneurones à la parvalbumine (PVIN) chez des souris vivantes.	Le paradigme de préférence de lieu conditionnée (CPP) (Cf. annexe)	Les PVIN régulent les réponses émotionnelles à la douleur. Une activité réduite dans le PFC <b>baisse le seuil d'hypersensibilité à la douleur</b> (Arch3 est plus efficace que ChR2).	(168)

\* PV sont les interneurons qui expriment la parvalbumine et SOM sont les interneurons qui expriment la somatostatine.

\*\*VMR est un enregistrement des muscles abdominaux en réponse à la distension (169–171)

\*\*\*Les souris ai35 porte un gène floxé stop-Arch et les souris ai32 un gène floxé stop-ChR2

Ces expériences permettent de conclure sur les composants pronociceptifs et antinociceptifs du circuit de la douleur. D'après les résultats, il est intéressant d'inhiber l'activité du cortex cingulaire antérieur (CCA), l'activité du noyau central de l'amygdale (CeA) et celle du cortex préfrontal. Plusieurs moyens sont possibles : activer les interneurons liés à la région ou activer les neurones inhibiteurs GABAergiques.

Si l'on peut agir sur le SNC pour traiter la douleur, il existe également de nombreuses potentielles cibles au niveau du SNP. L'optogénétique a également permis de les déceler (Cf. tableau 15).

Pour cela, en se basant sur des données préétablies, des chercheurs font exprimer des opsines - ChR2, NpHR ou ArchT - soit par vecteur ou par transgénèse, au niveau des structures suivantes :

- **Les fibres VGlut3+**,
- Les **nocicepteurs primaires** (non myélinisés),
- Les **neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG)**,
- Les **cellules épidermales de Merkel (CCK)**

Tableau 15 : Expériences optogénétique mettant en évidence les potentielles cibles du SNP dans la douleur :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Type(s) de Test(s) ou Critère primaire significatif mesuré après photostimulation	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : ubiquitaire <b>Modèle animal</b> : Croisement souris VGlut3-Cre et des souris Ai32** <b>Type de douleur</b> : Inflammatoire et/ ou de constriction chronique (CCI)	Fibre VGlut3+.	Test de VonFrey (172) Test de chaleur plantaire Test plantaire froid (173) Test à l'acétone (174) Plaques froides dynamiques (175) (Cf. annexe)	Les fibres VGlut3+ contribuent de manière étiologique au développement de l'hypersensibilité mécano-froid.	(176)
<b>Opsine</b> : ChR2 et NpHR3.0 <b>Promoteur</b> : hSyn <b>Vecteur</b> : AAV6 <b>Modèle animal</b> : souris	Nocicepteurs primaires.	Test de VonFrey (172) (Cf. annexe)	L'activation des nocicepteurs primaires induit <b>une baisse du seuil d'hypersensibilité à la douleur</b> . L'inhibition (NpHR) induit une augmentation du seuil.	(177)
<b>Opsine</b> : ArchT <b>Promoteur</b> : CAG <b>Vecteur</b> : AAV5 <b>Modèle animal</b> : souris	Neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG).	Mesure de la latence de retrait de la patte de souris suite à l'application de source de chaleur	L'inhibition des neurones DGR <b>augmente le seuil de sensibilité</b> (augmentation de la latence de retrait).	(178)
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Promoteur</b> : ubiquitaire <b>Modèle animal</b> : croisement souris aux cellules Merkel-Cre (Cck-Cre) avec des souris Ai27D**	Cellules épidermales de Merkel (CCK).	Mesure de potentiel d'action dans des fibres responsables du toucher à la suite de l'activation des cellules de Merkel via ChR2	Les cellules de Merkel communiquent avec les afférences primaires jouant un rôle dans la <b>transduction sensorielle</b> .	(179)

\*Les souris Ai35 portent le gène floxé stop-Arch-EGFP dans un locus spécifique pour générer la lignée de souris Nav1,8-Arch+ après croisement (180)

\*\* les souris Ai32 portent le gène floxé stop-ChR2 dans un locus spécifique pour générer la lignée de souris VGlut-ChR2+ après croisement.

\*\*\*Les souris Ai27D portent le gène floxé ChR2-tfTomato au locus spécifique pour générer la lignée de souris Merkel-ChR2+ après croisement (179).

Ces résultats permettent de conclure que les fibres VGlut3+, les nocicepteurs primaires, les neurones DRG et les cellules CCK sont pronociceptifs. Il est donc envisageable de les inhiber afin de soulager la sensation de douleur sans forcément connaître l'étiologie de celle-ci.

J'ai fait le choix de vous présenter ces quelques expériences optogénétiques « majeures » dans le domaine de la douleur. D'autres études optogénétiques mettent en avant ces caractères pro ou antinociceptif. Par exemple, le ciblage optogénétique via ChR2 transduit à l'aide d'un vecteur viral au niveau de neurones du locus coeruleus (LC) (noyau sous cortical de l'encéphale, situé dans le tronc cérébral) de rats, démontre que les neurones de la partie dorsale du LC sont pronociceptifs alors que ceux de la région ventrale sont antinociceptifs (181).

L'optogénétique permet ainsi d'identifier des potentielles cibles thérapeutiques ainsi et leur fonction dans l'idée de les activer si elles sont antinociceptives ou les inhiber si elles sont pronociceptives.

### II.3 Apport de l'optogénétique dans les troubles psychiatriques

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit la santé mentale comme un « *état de bien-être qui permet à chacun de réaliser son potentiel, de faire face aux difficultés normales de la vie, de travailler avec succès et de manière productive et d'être en mesure d'apporter une contribution à la communauté* ». Dans plusieurs pays occidentaux, les troubles mentaux sont la principale cause d'invalidité, responsable de 30 à 40% des congés de maladies chroniques (182).

Pour améliorer la compréhension des troubles psychiatriques, il est important d'identifier les circuits neuronaux sous-jacents, afin de moduler les dysfonctionnements de ces mécanismes. La complexité des circuits neuronaux rend difficile cette compréhension par des méthodes utilisées jusqu'à lors.

Dans ce type de trouble, l'approche optogénétique permettra de modifier la manière dont les **tests comportementaux traditionnels** sont utilisés. Elle permet de condenser des tests de plusieurs jours en une seule session grâce à sa réversibilité immédiate, à contrario des techniques pharmacologiques. Par exemple le test « Le Labyrinthe », qui permet la comparaison intra-sujet des conditions, peut-être réaliser en une seule session comportementale (lumière allumée versus lumière éteinte) (183). Le test de « la préférence de lieu conditionnée (CPP) » (35), qui traditionnellement dure trois jours (une journée d'accoutumance, une journée de conditionnement et une journée de test), peut-être réalisé en un seul jour grâce à l'agilité temporelle des techniques optogénétiques.

### II.3.1 Dysfonctionnement social et optogénétique

Dans les troubles psychiatriques tels que la schizophrénie et l'autisme, de nombreux facteurs génétiques associés à des phénotypes comportementaux complexes sont observés (184–187). Les processus neurophysiologiques restent mal compris. L'hypothèse émergente concernant la cause de ces deux pathologies est le déséquilibre excitation / inhibition (E/I) en faveur de l'excitation, dans le néocortical (188–191).

#### La schizophrénie :

Les symptômes de la schizophrénie comprennent un discours et un comportement désorganisés, des hallucinations, des idées délirantes et des symptômes négatifs dont une fonction sociale altérée (192,193)(194).

#### L'autisme :

Les maladies du spectre autistique se caractérisent par une altération du comportement social et de la communication ainsi que par des mouvements stéréotypés et répétitifs (195,196). L'autisme est co-morbide avec des troubles neurologiques tels que l'épilepsie (145,197), l'anxiété et les troubles de l'humeur (198,199). La complexité et la variabilité des symptômes de l'autisme rendent son étude particulièrement difficile, mais la théorie précédemment évoquée (le déséquilibre excitation-inhibition cellulaire) peut en être la cause (188,189,191).

L'une des anomalies micro-anatomiques fiables dans ces pathologies est le nombre et la réduction des **neurones parvalbumine du cortex préfrontal** (200,201) évaluable par l'activité rythmique dans la bande gamma (202,203). Ceci pourrait aider à poser les bases d'une compréhension plus approfondie des déficits de traitement de l'information dans la schizophrénie ou l'autisme. L'approche optogénétique permet de tester cette idée en induisant ce déséquilibre excitation-inhibition. Pour cela, des chercheurs utilisent des opsines - C1V1 ou SFO - dans les neurones du cortex préfrontal de souris et évaluent – soit par des tests comportementaux ou par la mesure de la bande gamma – le dysfonctionnement social chez le modèle murin en mouvement (Cf. tableau 16) (72) (204).

Tableau 16 : Expériences optogénétiques mettant en évidence le déséquilibre cellulaire du mPFC dans le dysfonctionnement social :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Critère primaire significatif mesuré après photostimulation	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine :</b> C1V1 <b>Promoteur :</b> CaMKII $\alpha$ <b>Vecteur :</b> AAV5 <b>Modèle animal :</b> souris	Cellules du cortex préfrontal médian (CPFm) de souris	Tests comportement social (202,205)	Le déséquilibre d'excitation et inhibition des neurones du cortex préfrontal médian <b>impacte la fonction sociale et l'apprentissage.</b>	(72)
<b>Opsine :</b> SFO <b>Promoteur :</b> CaMKII $\alpha$ <b>Vecteur :</b> AAV <b>Modèle animal :</b> souris	Les neurones corticaux préfrontaux glutaminergiques	Augmentation de l'activité rythmique dans la bande gamma (un trait lié à l'autisme) (206) Abolition du comportement social inconditionné (206)		(204)

Les résultats de ces études convergent vers la même conclusion, un déséquilibre excitation / inhibition des cellules du CPFm impacte la fonction sociale et une augmentation de la bande gamma est en faveur d'un trait autistique.

### II.3.2 Trouble de l'éveil et optogénétique

Dans la dernière et 5<sup>ème</sup> édition du « *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux* » (DSM-5) publié par l'American Psychiatric Association, 10 catégories de troubles de l'éveil et du sommeil sont citées et décrites. Par exemple, l'**insomnie** (insatisfaction par rapport à la qualité ou la quantité de sommeil), le **trouble d'hypersomnolence** (quantité excessive de sommeil, quantité détériorée de l'éveil et inertie du sommeil) ou encore la **narcolepsie** (périodes récurrentes d'un besoin incontrôlable de sommeil en pleine journée) (207).

D'après les données scientifiques actuelles, l'activité neuronale dans le **locus coeruleus** (noyau sous cortical de l'encéphale, situé dans le tronc cérébral) **est en corrélation avec les périodes d'éveil**. Les neurones du locus coeruleus se déclenchent fortement pendant les états d'éveil, peu pendant le sommeil à mouvements oculaires non rapides et sont presque silencieux pendant le sommeil paradoxal (208–210). Le locus coeruleus est une structure noradrénergique du tronc cérébral considérée comme importante pour favoriser l'excitation (211–215). Il n'est cependant pas clair si l'activité du locus coeruleus est **causale ou soumise** dans la promotion et le maintien de l'excitation (et donc de l'éveil).

L'utilisation des techniques pharmacologiques et électriques traditionnelles sont difficiles sur le Locus coeruleus à cause de sa petite taille, sa morphologie et la proximité des structures cérébrales voisines (211,212). L'utilisation d'outils optogénétique sur la souris en mouvement, de façon à manipuler sélectivement l'activité de décharge du locus coeruleus, permet de démontrer la relation causale entre le déclenchement du locus coeruleus, l'activité corticale, les transitions veille-sommeil et l'excitation locomotrice générale.

Une étude utilise des opsines - eNpHR et ChR2 - dans les neurones du LC de souris vivantes pour identifier son rôle causal dans la promotion et le maintien de l'éveil (Cf. tableau 17) (216).

Tableau 17 : Expérience optogénétique mettant en évidence le rôle du locus coeruleus dans l'éveil :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Critère primaire significatif mesuré après photostimulation	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine</b> : eNpHR et ChR2 <b>Promoteur</b> : ubiquitaire <b>Vecteur</b> : rAAV* <b>Modèle animal</b> : souris Cre+ dans les neurones du LC.	Les <b>neurones du locus coeruleus (LC)</b>	La durée d'éveil à la suite de l'illumination des neurones du LC exprimant NpHR ou ChR2.  La transition sommeil-éveil à la suite de l'illumination des neurones LC exprimant ChR2.	L'inhibition par eNpHR induit une réduction de la durée d'éveil et l'activation par ChR2 induit des transitions immédiates du sommeil à l'éveil, prolongeant la durée de l'éveil d'une manière compatible avec la privation de sommeil.	(216)

\*rAAV est un virus adéno-associé dépendant de la Cre-recombinase (217,218)

Grâce à l'optogénétique cette étude confirme bien que le locus coeruleus est nécessaire pour maintenir les épisodes d'éveil et démontre surtout que **son activité est causale** - et non soumise - puisque son activation induit une transition immédiate du sommeil à l'éveil.

### II.3.3 Les troubles anxieux et Optogénétique

Les troubles anxieux comprennent plusieurs sous-classes : **le trouble anxieux généralisé, le trouble panique, le trouble de stress post-traumatique (SSPT)** et les **phobies**.

#### **Le trouble anxieux généralisé :**

C'est la pathologie la plus courante des maladies psychiatriques, avec une prévalence à vie d'environ 21 % (219,220) et une prévalence de 15% sur une année selon la Haute Autorité de Santé (221). En raison de la pandémie COVID-19, les cas d'anxiété et de dépression sont en hausse de 25% dans le monde d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

L'anxiété se caractérise par un état d'appréhension soutenu en l'absence de menace immédiate (222).

C'est une population spécifique de synapses de l'amygdale qui module les niveaux d'anxiété de base (183). L'amygdale est composée de sous-noyaux fonctionnellement et morphologiquement hétérogènes :

- Les **terminaisons basolatérales de l'amygdale (BLA)** principalement glutamatergique (223,224)
- Le **noyau central de l'amygdale (CeA)** principalement GABAergiques (225) composé du **noyau central médian (CeM)** (226,227), médiant les réponses autonomes et comportementales associées à l'anxiété (et la peur) via des projections vers le tronc cérébral. Ainsi que du **noyau central latéral (CeL)**.

Les patients souffrants de trouble d'anxiété généralisée ont une **activité anormale provenant du circuit BLA-CeM-CeL** (228) (229,230), il est intéressant de considérer que ce circuit peut-être causalement impliqué dans l'anxiété mais on ne sait pas quelles sont les populations exactes et spécifiques des **synapses** impliquées.

#### **Le syndrome de stress post-traumatique (SSPT) :**

La réaction de peur à des stimuli ou des contextes spécifiques peuvent inclure des phobies. Cela représente la **plus grande sous-classe de troubles anxieux**, affectant 12% de la population (231).

Le SSPT peut survenir à la suite d'une expérience traumatisante. Ce syndrome est débilitant à cause de son influence chronique sur plusieurs aspects du fonctionnement social et professionnel (212,222,232). Les associations de peur dans le SSPT sont omniprésentes et sont stockées dans plusieurs endroits et circuits à travers le cerveau (222,232,233). **L'hippocampe** est impliqué dans l'encodage de la peur contextuelle (234,234–236), puis plusieurs semaines, mois ou années après l'épisode traumatisant est stocké dans **un réseau néocortical distribué** (237–240). Il faut donc comprendre où les souvenirs de peur à long terme sont stockés et comment ils peuvent être reconfigurés de manière à « guérir » du SSPT.

Tout comme les troubles anxieux généraux, **l'amygdale est impliquée dans l'acquisition et l'expression de la peur conditionnée** (229,241–248) et plus précisément **le CeA** (composé des 3 sous-noyaux, CeM, CeL et l'amygdale centrale capsulaire (229,249) )

Des chercheurs utilisent les opsines ChR2 et NpHR3 sur des modèles d'anxiété de rongeurs pour identifier les populations spécifiques de synapses de l'amygdale concernées (Cf. tableau 18) :

Tableau 18 : Expériences optogénétiques des troubles anxieux chez l'animal :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Test et/ou Critère primaire significatif mesuré après photostimulation	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine :</b> ChR2 et NpHR3 <b>Promoteur :</b> CaMKII $\alpha$ <b>Vecteur :</b> AAV <b>Modèle animal :</b> souris anxieuse.	<b>Terminaisons basolatérales de l'amygdale (BLA) dans le noyau central de l'amygdale (CeA)</b>	Mesure du temps passé dans les bras ouverts du test labyrinthe surélevé (EPM) (Cf. Annexe) Mesure du temps passé au centre du test de champ ouvert (OFT) (Cf. Annexe)	L'activation (ChR2) de BLA dans le CeA baisse les comportements liés à l'anxiété. L'inhibition (NpHR3.0) de BLA dans le CeA augmente les comportements liés à l'anxiété.	(183)
<b>Opsine :</b> ChR2 <b>Promoteur :</b> ubiquitaire <b>Vecteur :</b> AAV <b>Modèle d'animal :</b> Souris Cre+ au niveau des cellules PK $\delta$ dans CeA.	<b>Neurones exprimant protéine kinase C<math>\delta</math> (PKC <math>\delta</math>) dans un sous noyau de CeA</b>	Effet comportemental « freezing » (souris figée)	Définit un microcircuit inhibiteur qui bloque l'expression de la peur	(250)
<b>Opsine :</b> ChR2 <b>Vecteur :</b> AAV <b>Modèle animal :</b> Souris	Neurones de <b>CEI</b> et <b>CeM</b>	Effet comportemental « freezing » (souris figée)	Définit la sous-population de neurones dans le CeA impliqués dans l'expression et la généralisation de la peur conditionnée  Différencier les rôles de CEI et CEm dans l'acquisition de la peur (251)	(230)

Ainsi, pour les deux troubles, l'optogénétique a permis d'identifier les circuits et les neurones impliqués :

- Pour le trouble anxieux général, les résultats suggèrent que les synapses entre les neurones BLA et CeA (soit l'activation des neurones CeA par BLA) sont anxiolytiques.
- Pour la génération de la peur et du SSPT, l'optogénétique a permis de comprendre que la ce trouble est piloté par les neurones de sortie CEm qui sont eux même sous le contrôle inhibiteur des neurones CEI (les CEIoff). Lors de l'acquisition du conditionnement de la peur, CEI est donc inactivé, ce qui desinibe les neurones de sortie CEm.

#### II.3.4 La dépression et optogénétique

13% de la population connaît une dépression majeure à un moment au cours de sa vie (219,252). Selon L'OMS, 3,8 % de la population mondiale est touchée, soit environ 280 millions de personnes (253).

Les mécanismes physiopathologiques de la dépression sont mal compris. Les antidépresseurs pharmacologiques ne sont pas toujours efficaces et lorsqu'ils le sont, ils doivent être utilisés au moins 4 à 6 semaines pour montrer une efficacité et des améliorations symptomatiques (254–257). **Le gyrus cingulaire**, un gyrus du lobe limbique du cortex cérébral, fait exprimer l'état émotionnel par les gestes et la posture. Sa **stimulation cérébrale profonde (SCP)** permet d'améliorer les symptômes dépressifs et ainsi peut-être une alternative aux médicaments oraux (142,258). Bien que cette découverte suscite l'espoir d'une meilleure compréhension des mécanismes de la dépression et d'une meilleure prise en charge pour certains patients, la physiopathologie reste mal comprise et la SCP pourrait impliquer des séquelles post-opératoires et des effets secondaires dû à son imprécision.

Le **cortex préfrontal médian (CPFm) a un rôle clé dans la dépression clinique** (259). Un des indicateurs clés de la dépression est la réduction de l'expression d'IEG dans le tissu cortical préfrontal. Les IEG sont des gènes activés transitoirement en réponse à des stimulations cellulaires. Leur diminution correspond à un déficit de l'activité neuronale dans cette région du cerveau (259). D'un point de vue thérapeutique, il serait donc intéressant de cibler uniquement les neurones mPFC pour les activer et évaluer l'effet antidépresseur. C'est ce qu'ont fait des chercheurs en utilisant l'opsine ChR2 et le vecteur HSV dans des souris à phénotype dépressif (260).

Tableau 20 : Expériences optogénétiques pour mieux comprendre le circuit de la dépression :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Critère primaire significatif mesuré après photostimulation	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine :</b> ChR2 <b>Promoteur :</b> CamKII <b>Vecteur :</b> HSV <b>Modèle d'animal :</b> Souris	<b>Neurones CPFm</b> de souris à phénotype dépressif	Taux d'expression d'IEG. Taux d'interaction sociale Taux de préférence pour le saccharose*	La photostimulation de neurones corticaux préfrontaux médians induit une augmentation du taux d'expression d'IEG, du taux d'interaction sociale et de préférence pour le saccharose.	(260)

\*Le taux de préférence pour le saccharose permet d'évaluer l'état dépressif d'une souris ; on suppose que cette préférence est proportionnelle au plaisir que l'animal éprouve lorsqu'il la consomme (261)

Ainsi, l'activation du CPFm par optogénétique induit **un puissant effet antidépresseur sans affecter les autres activités cérébrales** comme la locomotion générale, la mémoire sociale ou encore les comportements anxieux (260).

### II.3.5 Addiction et optogénétique

L'OMS définit l'**addiction** comme un « *usage répété d'une ou plusieurs substances psychoactives, dans la mesure où l'usager est périodiquement ou chroniquement intoxiqué, montre une compulsion à prendre la ou les substances préférées, éprouve de grandes difficultés en cessant volontairement ou en modifiant sa consommation de substance et fait preuve de détermination à se procurer des substances psychoactives par presque tous les moyens* ».

Le **trouble addictif** est une pathologie multifactorielle. Une personne est plus ou moins vulnérable en fonction des facteurs de risque d'installation d'une conduite active (facteurs

génétiques, neurobiologiques, de personnalité/ tempérament, environnementaux etc..). La prise en charge de l'addiction est multidisciplinaire, il existe plusieurs stratégies thérapeutiques :

- La prise en charge psychologique avec les entretiens individuels, le soutien psychosocial et la psychothérapie (262),
- La prise en charge pharmacologique pour les substances qui le permettent tel que le tabac, l'alcool et les opiacés (traitement de substitution et sevrage) (262).

C'est le **système dopaminergique mésolimbique** - appelé **système de récompense** - qui est impliqué dans le mécanisme d'addiction (263–266). C'est un circuit du cerveau responsable des sensations de plaisir ressenties après certaines actions et/ou consommations.

Il est composé de :

- **L'aire tegmentale ventrale (ATV)** – Cf. 1 de la figure 24) reçoit l'information de sensation de plaisir et du niveau de satisfaction. C'est aussi le lieu où est sécrétée la dopamine (267,268).
- Le **noyau accumbens (NA)** – Cf. 2 figure 24) a le rôle d'informer l'amygdale pour évaluer la valeur émotionnelle d'un événement, l'hippocampe pour mémoriser l'évènement et l'insula pour rechercher le plaisir (267,268).
- Le **cortex préfrontal (CP)** – 3 Cf. figure 24) est impliqué dans la prise de décision, la planification et l'adaptation des comportements à chaque situation (268).

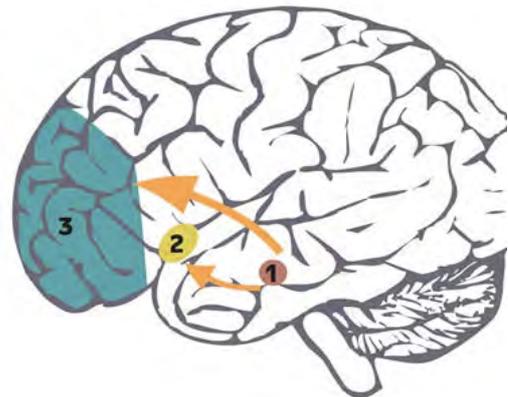


Figure 24 - Schéma anatomique du système de récompense (268).

Le neurotransmetteur impliqué dans le mécanisme de l'addiction est en majorité **la dopamine (DA)** apportant la sensation de plaisir (269).

Dans les troubles addictifs ce mécanisme est perturbé par la prise d'une substance qui accentue la sensation de plaisir et/ou par la dysrégulation du système lui-même :

- En situation physiologique la libération de DA dure seulement quelques instants.
- En situation pathologique, le système de récompense naturel du cerveau est « détourné » (270–273) par une « modulation » des synapses où la DA agit. Le signal neuronal à la suite de la libération de la DA se renforce traduisant une augmentation de la durée du plaisir et une intensification de la sensation (268). Les neurones du système gardent en mémoire ce type de stimulation et développent une tolérance. Il faudra alors augmenter les quantités de substance à chaque fois pour garder le même degré de plaisir (268).

Les processus mécanistiques de ces comportements n'ont pas été complètement compris. En effet, jusqu'à présent, on ne sait pas si l'activation des neurones dopaminergiques est suffisante pour provoquer un comportement lié à la récompense et quel type de modèle d'activité neuronale sert à cette fin.

Le rôle du noyau d'accubens (NAc) dans l'addiction (265,271,273–276) est vérifié dans une étude à l'aide d'outils optogénétiques. Pour cela, des chercheurs font exprimer OptoXR dans les neurones du noyau d'accubens de souris vivantes en mouvement. Leur comportement addictif a été ensuite évalué à l'aide d'un test de préférence de lieu (Cf. tableau 21).

Tableau 21 : Expérience optogénétique mettant en évidence le rôle du noyau d'accubens dans le circuit de la dépendance :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Critère primaire significatif mesuré après photostimulation	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine :</b> OptoXR (opto- $\alpha_1$ AR et opto- $\beta_2$ AR). <b>Modèle animal :</b> Souris	<b>Neurones du noyau d'accubens (NAc).</b>	Test de préférence de lieu (Cf. Annexe)	L'activation du NAc induit un comportement addictif des souris.	(272)

Ces résultats montrent que le NAc est bien impliqué de manière critique à la fois dans le traitement des récompenses et dans d'autres comportements liés à la dépendance. Cette expérience prouve que l'activation des neurones dopaminergiques est suffisante pour provoquer un comportement lié à la récompense.

Par ses caractéristiques innovantes, l'optogénétique complète ainsi le savoir physiopathologie en médecine. Nous allons à présent aborder son potentiel à se développer en stratégie thérapeutique dans une dernière partie qui traite d'un essai clinique.

### III PREMIER ESSAI CLINIQUE UTILISANT L'OPTOGENETIQUE

En plus de son rôle d'étude des dérèglements des circuits biologiques, l'opogénétique a confirmé son potentiel thérapeutique en 2021 dans un essai clinique où un homme atteint d'une maladie neurodégénérative de l'œil (rétinopathie pigmentaire) a retrouvé la vue grâce à la méthode.

La rétinopathie pigmentaire est la dystrophie rétinienne (héréditaire) la plus courante (277), elle touche environ une personne sur 4000 dans le monde (278). Elle fait partie d'un groupe de maladies cliniquement et génétiquement hétérogènes, caractérisées par la dégénérescence progressive des cellules photoréceptrices, d'abord les bâtonnets puis les cônes situées au contact de l'épithélium (279,280). Cette dégénérescence entraîne des troubles de la vision avec une sensibilité à la lumière, une grande difficulté de vision dans la pénombre et une restriction du champ visuel (vision en tunnel) aboutissant à une cécité (281).

Avant de décrire l'essai, nous reviendrons sur le mécanisme de la vision pour comprendre la physiopathologie et les traitements actuels, pour finir sur les études chez l'animal qui ont permis d'aboutir à l'essai clinique utilisant l'optogénétique.

#### III.1 Mécanisme de la vision

Le traitement de l'image par le système nerveux commence immédiatement dans la rétine pour ensuite être acheminé jusqu'aux cortex visuels primaire et secondaire (282) (283).

Les Rétinopathies Pigmentaires sont dues à un dysfonctionnement des photorécepteurs de la rétine, nous allons donc nous focaliser sur **le circuit rétinien**.

La rétine est une fine pellicule de tissu nerveux située au fond de l'œil, endroit où se forment les images. Les neurones de la rétine sont organisés en 3 couches principales : La première couche qui reçoit la lumière est située en profondeur, elle contient les photorécepteurs, les seules cellules

capables de convertir la lumière en influx nerveux. Cet influx est transmis aux neurones bipolaires situés dans la deuxième couche et enfin aux neurones ganglionnaires situés dans la troisième couche. Les axones des neurones ganglionnaires vont sortir de l'œil rejoindre le premier relais visuel dans le cerveau (Cf. Figure 25) (283) (284).

Le neurotransmetteur, dans les 3 couches de la rétine, responsable du traitement et de l'influx du message visuel au cerveau est le **glutamate**. Sa sécrétion est en continue dans l'obscurité mais baisse significativement à la lumière (284). Il existe des récepteurs au glutamate dans les cellules bipolaires et ganglionnaires qui sont soit « inhibiteurs », les cellules sont appelées ON (la libération du glutamate entraîne une hyperpolarisation de leur membrane) soit « excitateurs », les cellules sont appelées OFF (la libération du glutamate entraîne une dépolarisation de leur membrane) (Cf. figure 25) (284).

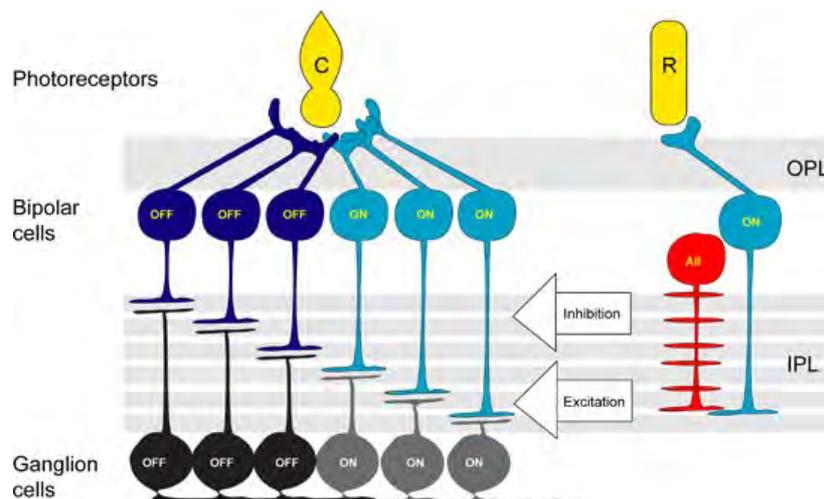


Figure 25- Schéma simplifié du circuit rétinien. Seules les voies excitatrices sont présentées (284).

**C**= Cône ; **R**= Batonnet ; **AII** = cellules Amacrine ; **OPL** = couche externe plexiforme ; **IPL** = couche interne plexiforme

Ainsi, à la **lumière** les photorécepteurs sécrètent moins de glutamate, ce qui dépolarise (ou active) les cellules bipolaires ON et hyperpolarise (ou désactive) les cellules bipolaires OFF. Les cellules ganglionnaires ON sont donc activées induisant un potentiel d'action au cerveau et les OFF désactivées. À l'**obscurité** le mécanisme est inversé : les cellules ganglionnaires OFF sont activées par la sécrétion de glutamate tandis que les cellules ganglionnaires ON sont désactivées (284).

Dans la rétine le traitement des données visuelles se fait par différentes cellules, dans l'ordre suivant (10,283) :

Trajet de la lumière dans la rétine

Direction du traitement des données visuelles

Les couches de la rétine	Fonctions générales et sous catégories cellulaires		A la lumière
<b>Photorécepteurs</b>	Sécrétion de glutamate	<b>Cônes</b> : fonctionnent à la lumière pour nous permettre de distinguer les couleurs et les détails. On les retrouve surtout dans la fovéa	Baisse sécrétion glutamate
		<b>Bâtonnets</b> : fonctionnent dans un environnement peu illuminé. On les retrouve dans le reste de la rétine, dont la macula	Baisse sécrétion glutamate
<b>Cellules bipolaires</b>	Reçoivent l'information des photorécepteurs et expriment des récepteurs au Glu excitateurs ou inhibiteurs	<b>Cellules bipolaires ON</b> : le récepteur au Glu <u>est inhibiteur</u>	Activées → envoi information électrique activatrice aux cellules ganglionnaires ON
		<b>Cellules bipolaires OFF</b> : le récepteur au Glu <u>est excitateur</u>	Inhibées → envoi information électrique inhibitrice aux cellules ganglionnaires OFF
<b>Cellules ganglionnaires</b>	Reçoivent l'information électrique des cellules bipolaires et expriment également des récepteurs au Glu. La cellule ganglionnaire est dépolarisée lorsque la cellule bipolaire qui la contacte l'est.	<b>Cellules ganglionnaires ON</b> : sont connectées aux cellules bipolaires ON	Activées → génère potentiel d'action au cerveau.
		<b>Cellules ganglionnaires OFF</b> : sont connectées aux cellules bipolaires OFF	Inhibées

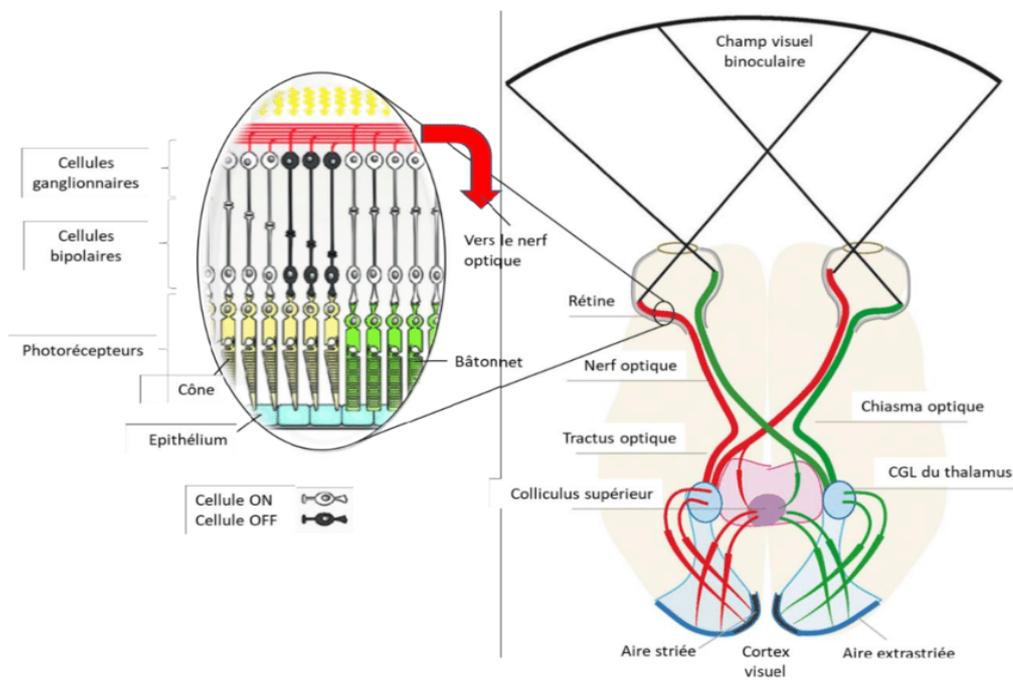


Figure 26 - Schéma simplifié du parcours des informations visuelles, de la rétine (2 principaux types de circuits : ON et OFF) aux cortex visuels (10,283).

On peut voir sur le schéma à gauche de la figure 26, les 2 principaux types de circuits (ON et OFF) en aval des photorécepteurs à cônes et à droite l'acheminement de l'information visuelle à travers

les différents relais (Chiasma optique, tractus optique, corps géniculé latéral CGL et colliculus supérieur) jusqu'aux aires visuelles.

### III.2 Physiopathologie et symptomatologie des Rétinopathies Pigmentaires (RPs)

Les rétinopathies pigmentaires sont des maladies génétiques dues à des mutations présentes dans les photorécepteurs, cellules impliquées dans le fonctionnement de la rétine (285). Ces maladies sont causées par des mutations dans plus de 71 gènes différents (286). Parmi elles, certaines sont plus fréquentes, comme celle de la rhodopsine (mutation RHO) représentant un quart des cas ou encore la mutation de la Retinitis Pigmentosa 1 (RP1) représentant 6 à 8% des cas.

Dans les RPs, la **destruction progressive des bâtonnets puis des cônes** a pour conséquence l'apparition de dépôts pigmentés dans la rétine et de zones non vues dans le champ visuel appelées scotomes. Le premier symptôme est une baisse de la luminance de la vision due à une perte des bâtonnets, cette vision correspond à la vision de nuit (**vision scotopique**). Les symptômes s'aggravent progressivement avec la dégénérescence des cônes conduisant à une modification de la **vision photopique** qui correspond à la perception des détails et des couleurs (287) puis à une **vision tubulaire** (Cf. figure 27) (288) avec une perte complète du champ visuel périphérique à des stades plus tardifs, jusqu'à aboutir à une cécité bilatérale complète (289).

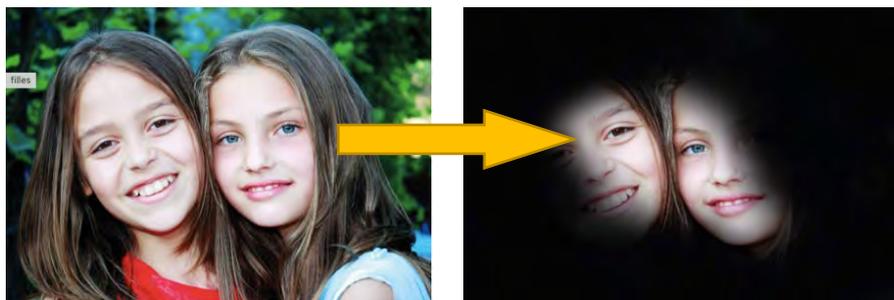


Figure 27- Exemple d'une vision tubulaire (288)

### III.3 Approches thérapeutiques dans les rétinopathies pigmentaires

#### III.3.1 Approches thérapeutiques classiques de la rétinopathie pigmentaire

La stratégie thérapeutique pour ce type de rétinopathie s'est orientée vers différentes possibilités :

- la stimulation électrique des cellules ganglionnaires à l'aide de prothèse rétinienne (290),
- l'utilisation de thérapie cellulaire consistant à transplanter des cellules pouvant se différencier en cellules photoréceptrices (291),
- la greffe sous-rétinienne de cellules libérant des facteurs de survie (292),
- et enfin, une stratégie de thérapie génique à caractère correctif (en insérant dans les cellules atteintes une version saine du ou des gènes défectueux) ou à visée symptomatique (neuroprotection par expression de facteurs améliorant la survie des photorécepteurs) (293–296).

Ces types de stratégies rencontrent plusieurs limites et n'obtiennent pas toujours de bons résultats. Par exemple, l'acuité visuelle, obtenue par prothèse rétinienne lors d'essais cliniques, est en deçà du seuil de cécité défini par l'OMS (290). De plus, les thérapies géniques se heurtent à la diversité des mutations.

Le seul traitement actuel qui a réellement prouvé son efficacité est la **thérapie génique Luxturna® (VORETIGÈNE NÉPARVOVEC)**, approuvée par l'EMA (European Medecins Agency) en 2018 mais celui-ci est **uniquement indiqué pour 1 seul type et 1 seul stade de RP**, celle liée à la mutation du gène RPE65, au stade précoce de la maladie(297) (298) (299).

L'optogénétique a une place **prometteuse dans le traitement des rétinopathies pigmentaires**, en effet elle peut remédier aux différentes limites des stratégies présentées plus haut, de plus, nous verrons que la technique ne s'apparente pas à un seul type ou stade de RP comme le traitement Luxturna®.

### III.3.2 Approche par optogénétique des rétinopathies pigmentaires chez l'animal

Le principe général d'utilisation de l'optogénétique pour le traitement des rétinopathies pigmentaire est de faire exprimer un outil excitateur (ChR2) dans les cellules ON (ganglionnaires ou bipolaires) (300) ou d'utiliser un outil inhibiteur (NpHR) dans les cônes défectueux. L'illumination des cônes NpHR+ implique leur inhibition et donc une baisse de la sécrétion de glutamate ce qui correspond à une activation des cellules ON. Dans les deux cas, la photostimulation, permettra de générer un potentiel d'action qui sera acheminé jusqu'au cortex visuel (Cf. figure 28).

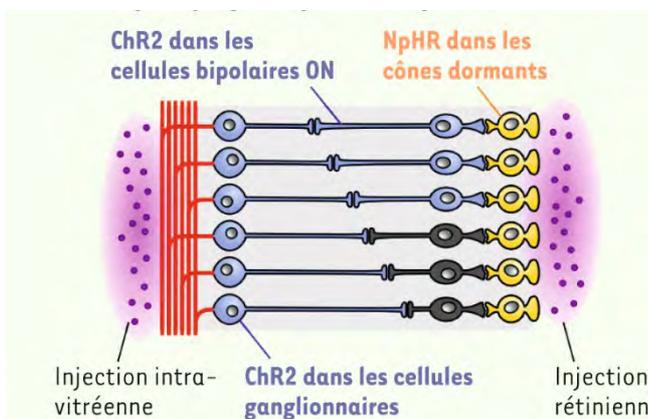


Figure 28 - Stratégies optogénétiques de (re)photosensibilisation (5).

Ce schéma représente un stade avancé de dégénérescence rétinienne dans lequel seuls quelques photorécepteurs à cônes subsistent sous la forme de cellules atrophiées. Il illustre l'utilisation de ChR2 ou NpHR :

- ChR2 exprimé dans les cellules bipolaires ON
- ChR2 dans les cellules ganglionnaires ON
- Ou NpHR dans les cônes dormants

Des chercheurs font exprimer ChR2 et l'Opsn4 dans des cellules bipolaires ON, notamment des cellules ganglionnaires, de souris ou de rat avec une dégénérescence rétinienne (rd1) et observent la restauration de la vision en comparant les souris rd1 / opsine+ avant et après la photostimulation avec des souris saines (Cf. tableau 22).

Tableau 22 : Expériences optogénétiques dans les rétinopathies pigmentaires :

Méthode Optogénétique	Modèle/cellules ciblées	Critère/facteur primaire significatif de mesure après photostimulation	Principaux résultats	Référence
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Modèle animal</b> : Souris ou rat avec une dégénérescence rétinienne (rd1)	<b>Les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC)*</b>	Activité du cortex visuel (ECG).	Restauration des réponses électrophysiologiques jusqu'à dans le cortex visuel	(300,301)  (301,302)
<b>Opsine</b> : Mélanopsine ectopique (Opsn4) ** <b>Vecteur</b> : AAV <b>Modèle animal</b> : souris à dégénérescence rétinienne (rd1)	<b>Les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC)*</b>	Pupillary light reflexes (PLR)***  Capacité de voir dans la boîte d'essai en plein champ (temps passé dans la partie sombre de la boîte) (Cf. Annexe1)  Test de discrimination visuelle à 2 choix (Cf. Annexe1)	Augmentation de la sensibilité comportementale à la lumière.  Amélioration des prises de décision dépendantes de la vision.  Augmentation de la capacité d'apprentissage visuel.	(303)
<b>Opsine</b> : ChR2 <b>Modèle animal</b> : souris à dégénérescence rétinienne (rd1)	<b>Les neurones bipolaires ON.</b>	Réponses optomotrices par le test de la boîte claire/sombre (Cf. Annexe1) avec évaluation du suivi visuel	Amélioration des performances dans les tâches comportementales visuelles	(31)

\*Le RGC envoie les informations visuelles au cerveau et peut donc être utilisé pour agir comme photorécepteur.

\*\*La mélanopsine fait partie de la famille des opsines naturelles. Elle est retrouvée dans les cellules ganglionnaires et a pour rôle de rendre les cellules sensibles à la lumière (304)

\*\*\*Le PLR pour « Pupillary light reflexes », le réflexe de la pupille lorsqu'elle est éclairée.

Chez l'animal, l'expression d'une opsine activatrice (ChR2, Opsn4) dans des cellules bipolaires ON permet donc de restaurer la sensibilité à la lumière, de guider des comportements plus complexes comme la prise de décision en fonction de la vision et de restaurer les composantes cognitives comme l'apprentissage visuel. Ces résultats sont très prometteurs car ils démontrent que l'optogénétique peut restaurer la vision dans un modèle de RP quel que soit le type de gène muté.

### III.3.3 Approche thérapeutique de l'optogénétique sur un homme

Le premier essai clinique optogénétique mené sur l'Homme se nomme PIONEER. Il teste la tolérance et l'efficacité du traitement expérimental « **GS030** » pour la rétinopathie pigmentaire. GS030 combine l'injection d'un vecteur optogénétique (GS030 – DP pour Drug Product) avec le port d'un dispositif médical, à savoir des lunettes de stimulation lumineuse (GS030 – MD pour medical device). GS030 octroie, par la FDA (Food and Drug Administration), en octobre 2021, la désignation de Fast Track – *circuit court permettant de réduire l'autorisation et la mise en place d'essai clinique*

- comme traitement optogénétique de la rétinopathie pigmentaire. Aujourd'hui GS030 a reçu la désignation de médicament orphelin aux États-Unis et en Europe (305).

PIONEER est une phase I/IIa en ouvert, multicentrique et non randomisée. Les 3 sites d'étude sont Moorfields Eye Hospital (Londres), Hopital des XV-XX (Paris) et University of Pittsburgh medical Center (8) (280) (306). L'étude est conçue pour évaluer la **sécurité** (objectif principal) et l'**efficacité** (objectif secondaire) de GS030 chez 18 patients atteints de rétinopathie pigmentaire, 1 an après l'injection. Les patients éligibles dans les premières cohortes sont ceux atteints de rétinopathie pigmentaire non syndromique avancée, présentant une acuité visuelle très basse à « no light perception » (NLP) ou « light perception » (LP). La cohorte d'extension inclura des patients présentant un niveau d'acuité visuelle « hand motion » (HM) et « counting fingers » (CF).

La preuve de concept pour GS030 – DP et la dose de GS030 – DP utilisée dans l'essai clinique PIONEER sont préétablies dans des études sur des primates non humains (307,308).

**Le GS030 – DP** est à un virus AAV codant pour l'opsine chrimsonR (108) administré par une seule injection intra vitréenne dans le l'œil le moins voyant pour **cibler les cellules ganglionnaires rétiniennes fovéales** (307). ChrimsonR est fusionnée à une protéine fluorescente rouge tdTomato (ChrimsonR-tdT) pour augmenter son expression dans la membrane cellulaire (307). ChrimsonR est une channelrhodopsine qui possède l'un des spectres d'action le plus décalé vers le rouge (le pic de sensibilité est à 590 nm) parmi les capteurs optogénétiques disponibles. Elle a été choisie car ce type de lumière est la plus sûre et provoque moins de constriction de la pupille (307) en comparaison avec la lumière bleue.

**Le GS030 – MD** sont des lunettes techniques qui détectent les changements locaux d'intensité lumineuse et projettent les impulsions lumineuses correspondantes sur la rétine en temps réel pour activer les cellules ganglionnaires rétiniennes transduites par optogénétique. Ces lunettes capturent des images du monde visuel à l'aide d'une caméra neuromorphine qui détecte les changements d'intensité, pixel par pixel, comme des événements distincts (309). Elle transforme ensuite les événements en images monochromatiques et les projettent en temps réel sous forme d'impulsions lumineuses locales de 595 nm sur la rétine.

Ainsi, ChrimsonR va conférer une fonction photosensible aux cellules ganglionnaires pour agir et « remplacer » les photorécepteurs qui ont dégénérés. ChrimsonR n'est pas ou peu activé par la lumière ambiante naturelle, le port des lunettes permet la photostimulation à la bonne longueur d'onde pour activer ChrimsonR et donc rendre les cellules ganglionnaires photosensibles (Cf. figure 29) (310).

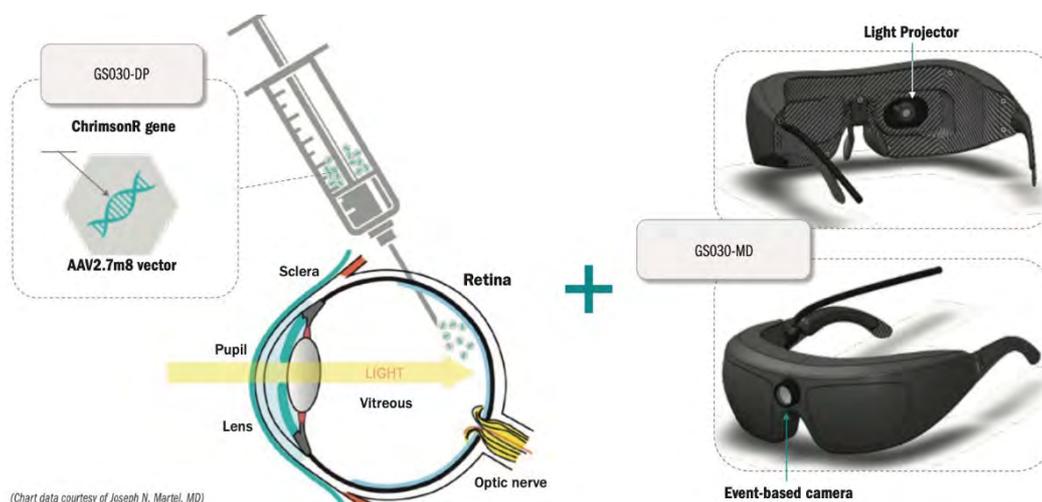


Figure 29 - Le traitement expérimental GS030 (310)

Trois tests ont été réalisés pour évaluer la récupération de la fonction visuelle dans cet essai, et l'analyse a été réalisée sous trois conditions :

- (1) les deux yeux ouverts sans les lunettes de stimulation lumineuse (Binoculaires naturelles)
- (2) Œil non traité couvert et œil traité ouvert sans lunette (monoculaires naturelles)
- (3) Œil non traité couvert et œil traité ouvert et stimulé avec les lunettes (monoculaire stimulé)

Les 2 premiers tests consistent à **percevoir, localiser, toucher ou compter 1 ou plusieurs objets**.

L'expérience implique deux sessions, avec un total de 180 essais randomisés objet/sans objet.

Chaque session d'enregistrement comprend les 3 conditions évoquées plus haut. Chaque condition a été divisée en trois blocs composés de dix essais chacun (cinq essais avec objet et cinq essais sans objet). Le patient a été invité à fermer les yeux pendant les 5 premières secondes (pendant que l'expérimentateur plaçait/enlevait l'objet sur/de la table). On a ensuite demandé au patient d'ouvrir les yeux et on lui a donné 15 s pour déterminer visuellement si le gobelet était présent sur la table (Cf. tableau 23).

Tableau 23 : Schématisation sous forme de tableau des 180 essais dans les 3 conditions :

Conditions	Session 1			Session 2		
<b>Binoculaires naturelles</b>	10 essais : 5 avec / 5 sans	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem
<b>Monoculaires naturelles</b>	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem
<b>Monoculaires stimulées (Intervention optogénétique)</b>	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem
<b>TOTAUX</b>	180 essais					

Le premier test consiste à **percevoir, localiser et toucher un seul objet** placé sur une table blanche le long d'une ligne imaginaire à 40 cm devant le patient. L'objet est soit grand (un cahier) soit petit (une boîte d'agrafes).

Tableau 24 : Résultats du test 1 dans les 3 conditions :

Binoculaire naturelle	Monoculaire naturelle	Monoculaire stimulée
Ne perçoit aucun objet	Ne perçoit aucun objet	Le patient perçoit, localise et touche l'objet le plus grand dans <b>92 %</b> des essais.

*(P < 0,001, test du rapport de vraisemblance pour l'effet de la condition)*

Le second test consiste à **percevoir, compter et localiser plus d'un objet** : 2 ou 3 gobelets.

Le patient doit déterminer combien d'objets sont placés sur la table blanche et de les pointer sans les toucher.

Tableau 25 : Résultats du test 2 dans les 3 conditions :

Binoculaire naturelle	Monoculaire naturelle	Monoculaire stimulée
Ne perçoit aucun objet, n'a pas tenté de compter ou de localiser	Ne perçoit aucun objet, n'a pas tenté de compter ou de localiser	Le patient perçoit les objets dans <b>63%</b> des essais. Il a en plus correctement compté et localisé dans la plus-part des essais (311).

*(P < 0,001, test du rapport de vraisemblance pour l'effet de la condition)*

Le troisième et dernier test est « **la tâche de détection visuelle couplée aux enregistrements à l'électroencéphalographie multicanale extra-crânienne ou EEG** ». Le but de ce test est d'étudier le lien entre la récupération partielle de la vision et l'activité neuronale. L'EEG fournit une lecture de l'activité neuronale à travers le cortex (Cf. figure 30). Les cliniciens analysent les traces EEG dans les états yeux ouverts et yeux fermés séparément pour chacune des 3 conditions. Un gobelet est posé ou non sur la table devant le patient et ce dernier doit évaluer sa présence ou son absence. Une analyse de régression logistique multi variable permet de faire des évaluations correctes avec la condition (stimulée versus naturelle) et la présence d'objet (oui ou non) comme variables explicatives. **Le taux d'évaluations correctes est significativement plus élevé dans les conditions monoculaires stimulées (41%) que dans les conditions binoculaire ou monoculaires naturelles (5,8%)** (Cf. figure 30).

*(P < 0,001, test du rapport de vraisemblance pour l'effet de la condition) (312)*



Figure 30 - Montage de l'expérience 3 (307)

Les résultats de ces trois tests montrent la bonne tolérance et l'efficacité de GS030 pour le traitement de rétinopathie pigmentaire non syndromique. Cette étude montre pour la première fois, que l'injection intravitéenne d'un AAV codant pour une protéine photosensible combinée avec l'utilisation d'un système de lunettes convertissant les intensités lumineuses en signal activateur, permet de restaurer la vision d'un patient.

Il est important de noter que la restauration optogénétique de la vision est dans ce cas, **une approche indépendante des mutations** pour restaurer la fonction visuelle aux stades précoces de la maladie tout comme aux derniers stades (293,313–315) ce qui est une réelle avancée. Cette technologie ouvre donc la voie à d'autres applications dans des maladies de la rétine impliquant la dégénérescence de photorécepteurs telle que la forme sèche de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

## IV CONCLUSION

Au cours des 17 dernières années, les études menées sur les opsines microbiennes, leur spécificité et la convergence de l'ingénierie génétique avec l'ingénierie optique ont permis de développer des systèmes de contrôle spatio-temporel précis de différents types de cellules et par conséquent de nombreux systèmes biologiques vivants. Pendant le tiers de cette période (de 2005 à 2009), alors que les bases de l'optogénétique sont en cours de développement, la technique a connu des difficultés de mise en œuvre avec peu de publications et des découvertes biologiques limitées. Durant les années qui ont suivies (de 2009 à aujourd'hui), la technique commence à être de plus en plus appliquée avec la publication de nombreuses découvertes et d'informations sur le fonctionnement de systèmes vivants, notamment le système nerveux. Les scientifiques ont rapidement perçu le potentiel de la méthode optogénétique. D'abord utilisée chez les invertébrés (nématodes) (316), elle a connu une réelle et rapide progression puisqu'elle est par la suite appliquée chez l'oiseau chanteur (317), puis le poisson zèbre (318), les rongeurs, le primate non humain (319) et depuis en 2021 le primate humain.

Aujourd'hui la recherche avance encore plus vite, entre 2010 et 2020, le nombre de publications sur la technique est passé de moins de 100 à plus de 1300 par an. Il reste cependant des limites à surpasser, comme l'innocuité de la protéine non humaine – la rhodopsine – et de la longueur d'onde de la lumière qui l'active.

### **Des apports scientifiques et un potentiel thérapeutique :**

L'optogénétique a permis d'acquérir des connaissances sur le comportement, la physiologie et la physiopathologie dans le domaine de la cognition, la sensation, des maladies neurologiques ou neuropsychiatriques. De manière générale, cette méthode a permis de mettre en lumière le rôle causal de cellules définies dans un mécanisme physiopathologique. La méthode vient compléter notre savoir sur des mécanismes physiopathologique en permettant de répondre à des questions auxquelles les techniques connues jusqu'à présents. C'est devenu aujourd'hui une ressource standard dans la communauté scientifique qui étudie les circuits neuronaux chez les animaux. Ainsi, la technique met aujourd'hui en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et a elle-même été utilisée sur l'homme pour traiter (partiellement) une cécité due à une rétinopathie pigmentaire.

### **Avantages par rapports aux méthodes expérimentales connues jusqu'à présent :**

Plusieurs aspects de l'optogénétique rendent cette technique performante et avantageuse. Le premier aspect majeur est l'utilisation d'une stratégie « **temps réel** » et **réversible** : la technique permet d'étudier et manipuler la fonctionnalité de réseaux cellulaires d'un animal vivant se comportant librement. Ce type de manipulation permet de faire le lien entre un comportement pathologique et les processus cellulaires. Pour la plupart des techniques, une dissection est parfois obligatoire pour observer et comprendre un mécanisme pathologique. Lorsque la mort du sujet impact le mécanisme pathologique, les techniques concernées ne permettent pas de comprendre la physiopathologie et ainsi de mettre en évidence de potentielles cibles thérapeutiques. Le second est la **précision** de l'approche. Les uniques cellules impactées par la technique sont celles ciblées, car ce sont les seules à exprimer l'opsine. Ainsi, l'optogénétique permet un **contrôle spatio-temporel précis, réversible et à distance** sur un même groupe de souris qui peuvent être à la fois contrôle et témoin – permettant alors d'éviter les variabilité interindividuelles -.

### **Perspectives : l'optogénétique un nouveau volet de la thérapie génique**

En moins de 20 ans, nous sommes passés d'une technique d'observation à une technique thérapeutique avec des premières applications **en ophtalmologie** chez les personnes aveugles atteintes de rétinopathies dégénératives. Plusieurs entreprises comme Gensight Biologics (320),

allergan (321) ou encore Bionic Sight (322), se sont positionnées sur son application dans la rétinite pigmentaire mais également dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (323) (324) ou encore la neuropathie optique de leber – étude en phase III - (325)(326) et la dystrophie maculaire de Stargardt (327)(328).

**En neurologie**, l'entreprise Circuit Therapeutics s'intéresse aux opsines pour traiter la douleur chronique périphérique et pour mettre en place une sorte de stimulation cérébrale profonde (SCP) *in situ*.

L'optogénétique s'intéresse à la neurophysiologie, aux maladies neurodégénératives, ophtalmiques mais pas seulement. Dans le domaine de la santé, l'exploration par l'optogénétique est en plein essor : l'une des applications les plus importantes est **le criblage de molécules**, des futurs candidats à haute vitesse et à faible coût. Par exemple l'entreprise Q-State Biosciences a identifié de potentiels cibles thérapeutiques dans la paraplégie grâce à l'optogénétique (329). Des études explorent la modification de la **soif** et du **goût** ainsi que la création ou réactivation de **souvenirs** (330). Dans le domaine de l'**immunothérapie** et la **cancérologie**, l'optogénétique trouve sa place (331,332). Des chercheurs de l'université de Rochester soulignent les réelles perspectives de traiter des cancers hématologiques par optogénétique. L'idée est d'activer des cellules immunitaires très performantes pour tuer les cellules cancéreuses puis les désactiver – afin d'éviter des réponses auto-immunes trop importantes – par la méthode « gène suicide ».

Il paraît évident que l'optogénétique est vouée à continuer à se développer afin d'arriver un jour à une technique totalement aboutie – en termes d'efficacité et de sécurité - pour une utilisation tant dans le domaine fondamental que dans le domaine thérapeutique.

## V ANNEXE

### Test à l'acétone (174) :

Le test permet d'évaluer la sensibilité thermique froide chez l'animal (Flatters and Bennett, 2004). D'abord, quelques microlitres d'acétone sont appliqués sur la face postérieure de l'animal, ensuite l'expérimentateur observe la réponse comportementale qui s'en suit.

L'acétone, à son évaporation, provoque une stimulation thermique froide non nociceptive. Ainsi, ce test permet de mesurer l'allodynie au froid.

### Allée de discrimination visuelle (333) :

Le test évalue la prise de décision basée sur des informations visuelles.

Les souris ont appris qu'une cible brillante représente la sécurité sous la forme d'une plate-forme immergée.

Les souris nagent dans une allée et doivent choisir entre la cible lumineuse (plate-forme sûre) ou une cible sombre (pas de plate-forme) (Cf. figure 25).

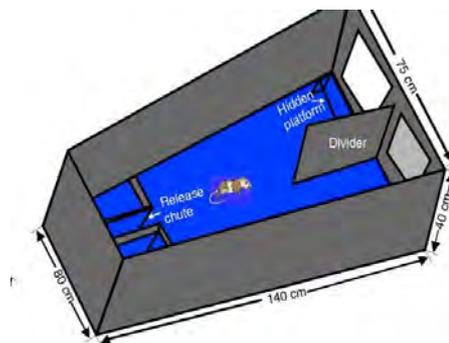


Figure 31 - Schéma de l'allée de discrimination visuelle (341).

### Boîte d'essai en plein champs (333) :

Il faut savoir que les souris saines évitent les espaces ouverts et très éclairés et cette tendance permet de mettre en place ce test pour mesurer leur capacité à voir.

Le test consiste à placer les souris dans un champs ouvert éclairé qui contient également un refuge sombre. La fraction de temps passée par les souris dans l'espace ouvert est mesurée

La boîte d'essai en plein champs se compose d'un compartiment sombre et d'un compartiment éclairé plus grand. Une petite ouverture située au niveau du sol au centre du mur de séparation permet aux souris de se déplacer librement entre les 2 chambres.

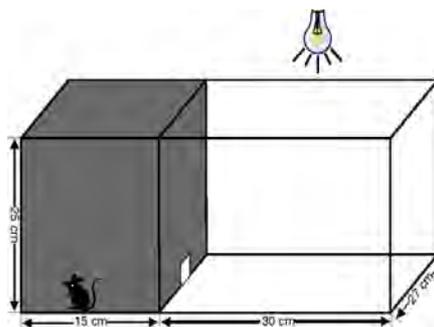


Figure 32 - la boîte d'essai en plein champs (341)

### Boîte claire/ sombre (334) :

Les souris sont laissées au repos dans une pièce sombre pendant 30 min puis sont exposées à une lumière en rotation dans un tambour rayé. L'emplacement des animaux est suivi avant et pendant l'exposition de la lumière afin d'évaluer le suivi visuel de celui-ci et donc de la sensibilité visuelle à la lumière.

CPP (335–337) est un test comportemental établi pour évaluer comment les neurones du circuit local modulent le comportement de la douleur chez les animaux en mouvement libre.

**Elevated plus maze (EPM) ou labyrinthe surélevé (183) (338)(339) :**

C'est un test d'anxiété utilisé chez les rongeurs. On sait que les souris affichent un comportement anxieux dans les espaces ouverts ; donc une augmentation du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM est interprétée comme une diminution de l'anxiété



Figure 33 - Modélisation d'un EMP

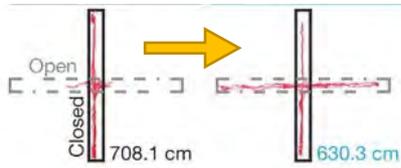


Figure 34 - Exemple d'une diminution d'un comportement anxieux (185)

**Test de Von Frey (172) (340)(341) :**

Le test consiste à appliquer une série de filaments de Nylon calibrés (poils de Von Frey) de raideur ascendante sur une surface épidermale (exemple la surface plantaire des pattes de souris) tout en surveillant la réponse de retrait du sujet. L'objectif est d'étudier l'intégrité des fibres afférentes primaire A delta et C.

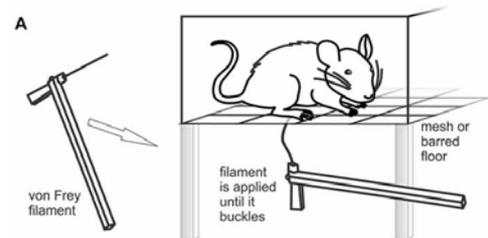


Figure 35 - Schéma du test de Von Frey (336)

**Test Open-field (OFT) ou champs ouvert (183) (338) :**

C'est un test d'anxiété utilisé chez les rongeurs. On sait que les souris affichent un comportement anxieux dans les espaces ouverts ; donc une augmentation du temps passé au centre de l'OFT est interprétée comme une diminution de l'anxiété.

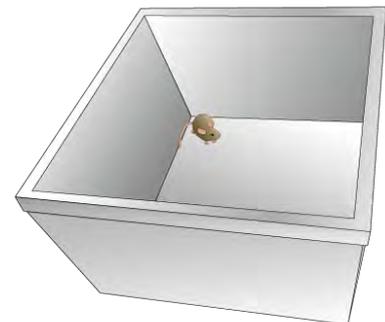


Figure 36 - Modélisation d'un Open-field (From dataBase Center for Life Science DBCLS)

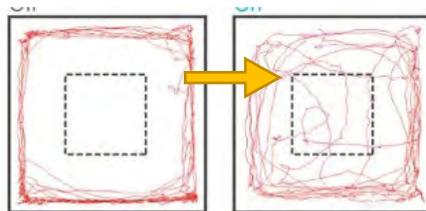


Figure 37 - Exemple d'une diminution du comportement anxieux

### Test plantaire froid (173) :

Le test permet de mesurer le seuil d'hypersensibilité au froid d'un rongeur (souris ou rat).

L'animal est positionné sur une plaque de verre et à l'aide d'une pastille de neige carbonique comprimée, un stimulus froid est progressivement appliqué à la patte arrière à travers le verre. La latence au retrait du verre refroidi est utilisée comme mesure du seuil de réponse au froid du rongeur.

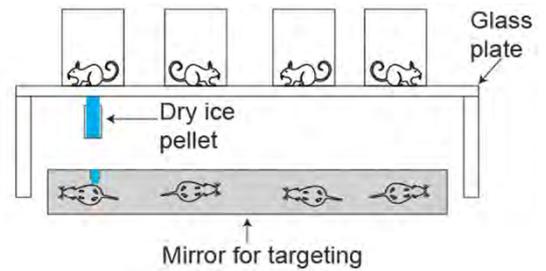


Figure 38 - Schéma du test plantaire froid (176)

### Test de la plaque froide et chaude dynamique (de Biosed) (175) :

Ce test permet d'évaluer la sensibilité d'un rongeur (souris ou rat) à la douleur résultante de l'exposition à la chaleur ou au froid.

L'animal est placé sur une plaque métallique qui peut être chauffée à 55°C ou refroidie à -2°C (pour une température ambiante de 20 à 25 °C) et un chronomètre est démarré.

Le chronomètre est arrêté au moment où le rongeur réagit à l'inconfort provoqué par les températures définies par un soulèvement de pattes : c'est le temps de réaction.

Ce temps de réaction est une indication de la résistance de l'animal à la douleur.

## VI BIBLIOGRAPHIE

1. Rein ML, Deussing JM. The optogenetic (r)evolution. *Mol Genet Genomics*. févr 2012;287(2):95-109.
2. Crick FHC. Thinking about the Brain. *Scientific American*. 1979;241(3):219-33.
3. Éclairez-moi : c'est quoi l'optogénétique ?  · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 14 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/c-est-quoi/eclairez-moi-c-est-quoi-optogenetique->
4. Method of the Year 2010. *Nat Methods*. janv 2011;8(1):1-1.
5. Dugué GP, Tricoire L. Principes et applications de l'optogénétique en neuroscience. *Med Sci (Paris)*. 1 mars 2015;31(3):291-303.
6. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. sept 2005;8(9):1263-8.
7. L'optogénétique, quand la lumière prend les commandes du cerveau [Internet]. CNRS Le journal. [cité 27 nov 2021]. Disponible sur: <https://lejournal.cnrs.fr/nos-blogs/aux-frontieres-du-cerveau/loptogenetique-quand-la-lumiere-prend-les-commandes-du-cerveau>
8. GenSight Biologics. A Phase 1/2a, Open-Label, Non-Randomized, Dose-Escalation Study to Evaluate the Safety and Tolerability of GS030 in Subjects With Retinitis Pigmentosa [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2021 févr [cité 15 mars 2022]. Report No.: NCT03326336. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03326336>
9. Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The Development and Application of Optogenetics. *Annu Rev Neurosci*. 21 juill 2011;34(1):389-412.
10. Vandecasteele M, Senova YS, Palfi S, Dugué GP. Potentiel thérapeutique de la neuromodulation optogénétique. *Med Sci (Paris)*. 1 avr 2015;31(4):404-16.
11. Oesterhelt D, Stoeckenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. oct 1973;70(10):2853-7.
12. Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 sept 1977;78(1):237-43.
13. Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 25 nov 2003;100(24):13940-5.
14. Spudich JL, Yang CS, Jung KH, Spudich EN. Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2000;16(1):365-92.
15. Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno LE, Tsunoda S, Kianianmomeni A, et al. The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell*. 23 déc 2011;147(7):1446-57.
16. Sakmar TP. Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. *Current Opinion in Cell Biology*. 1 avr 2002;14(2):189-95.
17. Findlay JBC, Pappin DJC. The opsin family of proteins. *Biochemical Journal*. 15 sept 1986;238(3):625-42.
18. Choe HW, Park JH, Kim YJ, Ernst OP. Transmembrane signaling by GPCRs: Insight from rhodopsin and opsin structures. *Neuropharmacology*. 1 janv 2011;60(1):52-7.
19. Okada T, Le Trong I, Fox BA, Behnke CA, Stenkamp RE, Palczewski K. X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J Struct Biol*. mai 2000;130(1):73-80.
20. Enami N, Yoshimura K, Murakami M, Okumura H, Ihara K, Kouyama T. Crystal Structures of Archaeorhodopsin-1 and -2: Common Structural Motif in Archaeal Light-driven Proton Pumps. *Journal of Molecular Biology*. 5 mai 2006;358(3):675-85.
21. Bourne HR, Meng EC. Rhodopsin Sees the Light. *Science* [Internet]. 4 août 2000 [cité 9 févr 2022]; Disponible sur: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.289.5480.733>
22. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal Structure

- of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*. 4 août 2000;289(5480):739-45.
23. rétinale - Définitions, synonymes, conjugaison, exemples | Dico en ligne Le Robert [Internet]. [cité 14 déc 2021]. Disponible sur: <https://dictionnaire.lerobert.com/definition/retilal>
  24. PubChem. Retinal [Internet]. [cité 25 avr 2022]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638015>
  25. PubChem. 11-cis-Retinal [Internet]. [cité 25 avr 2022]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280490>
  26. Deupi X, Standfuss J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Current Opinion in Structural Biology*. 1 août 2011;21(4):541-51.
  27. L'optogénétique, quand la lumière prend les commandes du cerveau [Internet]. CNRS Le journal. [cité 24 nov 2021]. Disponible sur: <https://lejournal.cnrs.fr/nos-blogs/aux-frontieres-du-cerveau/optogenetique-quand-la-lumiere-prend-les-commandes-du-cerveau>
  28. Lebon G, Tate CG. Les récepteurs couplés aux protéines G dans la lumière. *Med Sci (Paris)*. 1 oct 2012;28(10):876-82.
  29. Magleby KL. Ion-channel mechanisms revealed. *Nature*. janv 2017;541(7635):33-4.
  30. Harz H, Hegemann P. Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*. *Nature*. juin 1991;351(6326):489-91.
  31. Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, Münch TA, Kim DS, Busskamp V, et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*. juin 2008;11(6):667-75.
  32. Kolbe M, Besir H, Essen LO, Oesterhelt D. Structure of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin at 1.8 Å Resolution. *Science* [Internet]. 26 mai 2000 [cité 26 janv 2022]; Disponible sur: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.288.5470.1390>
  33. Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*. janv 2010;463(7277):98-102.
  34. Skulachev VP. Conversion of light energy into electric energy by bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*. 1 avr 1976;64(1):23-5.
  35. Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*. avr 2009;458(7241):1025-9.
  36. Oesterhelt D, Stoekenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol*. 29 sept 1971;233(39):149-52.
  37. Khorana HG, Gerber GE, Herlihy WC, Gray CP, Anderegg RJ, Nihei K, et al. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 oct 1979;76(10):5046-50.
  38. Edman K, Nollert P, Royant A, Belrhali H, Pebay-Peyroula E, Hajdu J, et al. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle. *Nature*. oct 1999;401(6755):822-6.
  39. Drachev LA, Kaulen AD, Skulachev VP. Correlation of photochemical cycle, H<sup>+</sup> release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*. 10 déc 1984;178(2):331-5.
  40. Stoekenius W, Bogomolni RA. Bacteriorhodopsin and Related Pigments of Halobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 1982;51(1):587-616.
  41. Baribeau J. Les interactions lipides-protéines dans la membrane pourpre: une approche analytique [Internet] [phd]. [Trois-Rivières]: Université du Québec à Trois-Rivières; 1987 [cité 26 janv 2022]. Disponible sur: <https://depot-e.uqtr.ca/id/eprint/6831/>
  42. Hofrichter J, Henry ER, Lozier RH. Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane studied by time-resolved absorption spectroscopy. *Biophys J*. oct 1989;56(4):693-706.
  43. Holland EM, Braun FJ, Nonnengässer C, Harz H, Hegemann P. The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent ions. *Biophysical Journal*. 1 févr 1996;70(2):924-31.
  44. Résumé de la structure de l'APB 3ug9 < Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI

- [Internet]. [cité 31 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3ug9>
45. Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, et al. Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science* [Internet]. 28 juin 2002 [cité 26 janv 2022]; Disponible sur: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1072068>
  46. Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A. Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses. *Current Biology*. déc 2005;15(24):2279-84.
  47. Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, Tsien RY. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J*. 4 mars 2009;96(5):1803-14.
  48. Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, et al. High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *PNAS*. 8 mai 2007;104(19):8143-8.
  49. Zhang F, Prigge M, Beyrière F, Tsunoda SP, Mattis J, Yizhar O, et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat Neurosci*. juin 2008;11(6):631-3.
  50. Stierl M, Stumpf P, Udvari D, Gueta R, Hagedorn R, Losi A, et al. Light Modulation of Cellular cAMP by a Small Bacterial Photoactivated Adenylyl Cyclase, bPAC, of the Soil Bacterium *Beggiatoa*\*♦. *Journal of Biological Chemistry*. 14 janv 2011;286(2):1181-8.
  51. Nouvelle channelrhodopsine avec un spectre décalé vers le rouge et une cinétique rapide de *Mesostigma viride* [Internet]. [cité 7 janv 2022]. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/mBio.00115-11>
  52. Govorunova EG, Spudich EN, Lane CE, Sineshchekov OA, Spudich JL. New Channelrhodopsin with a Red-Shifted Spectrum and Rapid Kinetics from *Mesostigma viride*. Shuman HA, éditeur. *mBio* [Internet]. juill 2011 [cité 7 janv 2022];2(3). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00115-11>
  53. Hinck S, Neu TR, Lavik G, Mussmann M, Beer D de, Jonkers HM. Physiological Adaptation of a Nitrate-Storing *Beggiatoa* sp. to Diel Cycling in a Phototrophic Hypersaline Mat. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. nov 2007 [cité 23 janv 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.00548-07>
  54. Mills HJ, Martinez RJ, Story S, Sobecky PA. Identification of Members of the Metabolically Active Microbial Populations Associated with *Beggiatoa* Species Mat Communities from Gulf of Mexico Cold-Seep Sediments. *Appl Environ Microbiol*. sept 2004;70(9):5447-58.
  55. M♦ller MM, Nielsen LP, J♦rgensen BB. Oxygen Responses and Mat Formation by *Beggiatoa* spp. *Appl Environ Microbiol*. août 1985;50(2):373-82.
  56. Ihara K, Umemura T, Katagiri I, Kitajima-Ihara T, Sugiyama Y, Kimura Y, et al. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J Mol Biol*. 8 janv 1999;285(1):163-74.
  57. Han X, Chow B, Zhou H, Klapoetke N, Chuong A, Rajimehr R, et al. A High-Light Sensitivity Optical Neural Silencer: Development and Application to Optogenetic Control of Non-Human Primate Cortex. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2011;5:18.
  58. taupo. La technique Strange and Funky de 2010 - Strange Stuff And Funky Things [Internet]. [cité 29 mai 2022]. Disponible sur: <http://ssaft.com/Blog/dotclear/?post/2011/01/10/La-technique-Strange-and-Funky-de-2010>
  59. Braslavsky SE. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*. 1 janv 2007;79(3):293-465.
  60. Chemistry (IUPAC) TIU of P and A. IUPAC - Schiff bases (S05498) [Internet]. [cité 26 avr 2022]. Disponible sur: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/S05498>
  61. Haupts U, Tittor J, Bamberg E, Oesterhelt D. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model. *Biochemistry*. 1 janv 1997;36(1):2-7.
  62. Kühlbrandt W. Bacteriorhodopsin — the movie. *Nature*. août 2000;406(6796):569-70.
  63. Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A. Light Activation of

- Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses. *Current Biology*. 24 déc 2005;15(24):2279-84.
64. Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods*. mars 2014;11(3):338-46.
65. Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A, Sohal VS, Deisseroth K, Hegemann P. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci*. mars 2010;13(3):387-92.
66. Figure 2: Photocurrent properties of E123T in oocytes and cultured neurons. | *Nature Neuroscience*. [cité 16 janv 2022]; Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nn.2495/figures/2>
67. Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E. Structural Guidance of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 by an Interhelical Hydrogen Bond. *Biochemistry*. 19 janv 2010;49(2):267-78.
68. Figure 4 : Photostimulation neurale rapide et à haute sensibilité. | *Neurosciences naturelles*. [cité 16 janv 2022]; Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nn.2776/figures/4>
69. Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Hegemann P, Deisseroth K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci*. févr 2009;12(2):229-34.
70. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. févr 1996;14(1):33-8.
71. Tsukamoto H, Terakita A. Diversity and Functional Properties of Bistable Photopigments. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 1 nov 2010;9:1435-43.
72. Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*. sept 2011;477(7363):171-8.
73. Schultheis C, Liewald JF, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A. Optogenetic Long-Term Manipulation of Behavior and Animal Development. *PLOS ONE*. 20 avr 2011;6(4):e18766.
74. Lin JY. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental Physiology*. 2011;96(1):19-25.
75. Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, Sugano E, Tomita H, Takahashi T, et al. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *J Biol Chem*. 27 févr 2009;284(9):5685-96.
76. Gradinaru V, Thompson KR, Deisseroth K. eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Bio*. 1 août 2008;36(1):129-39.
77. Zhao S, Cunha C, Zhang F, Liu Q, Gloss B, Deisseroth K, et al. Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. *Brain Cell Bio*. 1 août 2008;36(1):141-54.
78. Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, et al. Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics. *Cell*. 2 avr 2010;141(1):154-65.
79. Gradinaru V, Thompson KR, Deisseroth K. eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol*. août 2008;36(1-4):129-39.
80. taupo. La technique Strange and Funky de 2010 - Strange Stuff And Funky Things [Internet]. [cité 29 mai 2022]. Disponible sur: <http://ssaft.com/Blog/dotclear/?post/2011/01/10/La-technique-Strange-and-Funky-de-2010>
81. Rost BR, Schneider-Warme F, Schmitz D, Hegemann P. Optogenetic Tools for Subcellular Applications in Neuroscience. *Neuron*. 1 nov 2017;96(3):572-603.
82. Karnik SS, Gogonea C, Patil S, Saad Y, Takezako T. Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1 nov 2003;14(9):431-7.
83. Oh E, Maejima T, Liu C, Deneris E, Herlitze S. Substitution of 5-HT1A Receptor Signaling by a Light-activated G Protein-coupled Receptor \*. *Journal of Biological Chemistry*. 1 oct 2010;285(40):30825-36.
84. Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. Optogenetics in Neural Systems. *Neuron*. 14 juill 2011;71(1):9-34.
85. Guo ZS, Li Q, Bartlett DL, Yang JY, Fang B. Gene transfer: the challenge of regulated gene

- expression. *Trends in Molecular Medicine*. 1 sept 2008;14(9):410-8.
86. Thérapie génique [Internet]. [cité 17 mai 2022]. Disponible sur: <https://sciencesnaturelles.ch/id/iZKib>
87. Les virus [Internet]. [cité 11 avr 2022]. Disponible sur: <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/outilsbm/html/virus.htm>
88. Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisse S, Buttery PC, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*. 29 mars 2014;383(9923):1138-46.
89. La thérapie génique [Internet]. [cité 12 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.leem.org/la-therapie-genique>
90. Thérapie génique · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 11 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/therapie-genique/>
91. Ahi YS, Bangari DS, Mittal SK. Adenoviral Vector Immunity: Its Implications and circumvention strategies. *Curr Gene Ther*. août 2011;11(4):307-20.
92. LeWitt PA, Rezaei AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *The Lancet Neurology*. avr 2011;10(4):309-19.
93. Marks WJ, Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *The Lancet Neurology*. déc 2010;9(12):1164-72.
94. Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, et al. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*. 27 oct 2000;290(5492):767-73.
95. Vabret A, Mischczak F. Changement de tropisme des coronavirus. *Rev Francoph Lab*. juin 2010;2010(423):63-8.
96. Nathanson J, Jappelli R, Scheeff E, Manning G, Obata K, Brenner S, et al. Short promoters in viral vectors drive selective expression in mammalian inhibitory neurons, but do not restrict activity to specific inhibitory cell-types. *Frontiers in Neural Circuits*. 2009;3:19.
97. Christine CW, Starr PA, Larson PS, Eberling JL, Jagust WJ, Hawkins RA, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*. 17 nov 2009;73(20):1662-9.
98. LeWitt PA, Rezaei AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*. avr 2011;10(4):309-19.
99. A FLEX Switch Targets Channelrhodopsin-2 to Multiple Cell Types for Imaging and Long-Range Circuit Mapping | *Journal of Neuroscience* [Internet]. [cité 17 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.jneurosci.org/content/28/28/7025>
100. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. juin 2009;459(7247):698-702.
101. Geschwind D. GENSAT: a genomic resource for neuroscience research. *The Lancet Neurology*. 1 févr 2004;3(2):82.
102. Gong S, Doughty M, Harbaugh CR, Cummins A, Hatten ME, Heintz N, et al. Targeting Cre Recombinase to Specific Neuron Populations with Bacterial Artificial Chromosome Constructs. *J Neurosci*. 12 sept 2007;27(37):9817-23.
103. Babinet C. Transgenic mice: an irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology. *J Am Soc Nephrol*. nov 2000;11 Suppl 16:S88-94.
104. Saito T. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat Protoc*. août 2006;1(3):1552-8.
105. Allen BD, Singer AC, Boyden ES. Principles of designing interpretable optogenetic behavior experiments. *Learn Mem*. avr 2015;22(4):232-8.
106. Miyashita T, Shao Y, Chung J, Pourzia O, Feldman D. Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Frontiers in*

Neural Circuits. 2013;7:8.

107. Zhang F, Prigge M, Beyrière F, Tsunoda SP, Mattis J, Yizhar O, et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carterii*. *Nat Neurosci*. juin 2008;11(6):631-3.

108. Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods*. mars 2014;11(3):338-46.

109. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. sept 2005;8(9):1263-8.

110. UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans* | Nature Neuroscience [Internet]. [cité 21 févr 2022]. Disponible sur: [https://www.nature.com/articles/nn1199\\_959](https://www.nature.com/articles/nn1199_959)

111. Richmond JE, Jorgensen EM. One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci*. sept 1999;2(9):791-7.

112. Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenbock G, Ting A, Schnitzer MJ. Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits. *Journal of Neuroscience*. 11 oct 2006;26(41):10380-6.

113. Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 9 sept 1977;78(1):237-43.

114. Han X, Boyden ES. Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution. *PLOS ONE*. 21 mars 2007;2(3):e299.

115. Shemesh OA, Tanese D, Zampini V, Linghu C, Piatkevich K, Ronzitti E, et al. Temporally precise single-cell-resolution optogenetics. *Nat Neurosci*. déc 2017;20(12):1796-806.

116. Bargmann CI, Marder E. From the connectome to brain function. *Nat Methods*. juin 2013;10(6):483-90.

117. Sporns O. The human connectome: Origins and challenges. *NeuroImage*. 15 oct 2013;80:53-61.

118. Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci*. mai 2007;10(5):663-8.

119. Vishwanathan A, Daie K, Ramirez AD, Lichtman JW, Aksay ERF, Seung HS. Electron microscopic reconstruction of functionally identified cells in a neural integrator. *Curr Biol*. 24 juill 2017;27(14):2137-2147.e3.

120. Livet J. The brain in color: Transgenic «Brainbow» mice for visualizing neuronal circuits. *Médecine sciences : M/S*. 1 janv 2008;23:1173-6.

121. Thonnard M, Boly M, Bruno MA, Chatelle C, Gosseries O, Laureys S, et al. La neuro-imagerie : un outil diagnostique des états de conscience altérée - Imagerie et cognition (1). *Med Sci (Paris)*. 1 janv 2011;27(1):77-81.

122. Baumann PS, Hagmann P, Marquet P. Resumen. *L'information psychiatrique*. 2010;86(6):493-504.

123. Kissinger ST, Wu Q, Quinn CJ, Anderson AK, Pak A, Chubykin AA. Visual Experience-Dependent Oscillations and Underlying Circuit Connectivity Changes Are Impaired in *Fmr1* KO Mice. *Cell Reports*. 7 avr 2020;31(1):107486.

124. What is CRACM (Channelrhodopsin-2-Assisted Circuit Mapping)? | Mightex [Internet]. Mightex | Stimulation and Imaging for Life Science Research. 2021 [cité 19 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.mightexbio.com/what-is-cracm/>

125. András T, Veres JM, Rovira-Esteban L, Kozma R, Vikór A, Gregori E, et al. Differential excitatory control of 2 parallel basket cell networks in amygdala microcircuits. *PLOS Biology*. 24 mai 2017;15(5):e2001421.

126. Anastasiades PG, Collins DP, Carter AG. Mediodorsal and Ventromedial Thalamus Engage Distinct L1 Circuits in the Prefrontal Cortex. *Neuron*. 20 janv 2021;109(2):314-330.e4.

127. Feng G, Lu J, Gross J. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Med*. 2004;99:255-67.

128. Zhang YP, Oertner TG. Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel. *Nat Methods*. févr 2007;4(2):139-41.

129. La stimulation cérébrale profonde [Internet]. VIDAL. [cité 13 avr 2022]. Disponible sur:

<https://www.vidal.fr/maladies/systeme-nerveux/maladie-parkinson/stimulation-cerebrale-profonde.html>

130. Stimulation cérébrale profonde - Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse [Internet]. [cité 6 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.chu-toulouse.fr/-stimulation-cerebrale-profonde->

131. Mallet L, Schüpbach M, N'Diaye K, Remy P, Bardinet E, Czernecki V, et al. Stimulation of subterritories of the subthalamic nucleus reveals its role in the integration of the emotional and motor aspects of behavior. *PNAS*. 19 juin 2007;104(25):10661-6.

132. Maladie de Parkinson : 2 fois plus de cas en 25 ans [Internet]. [cité 19 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/liste-des-actualites/maladie-de-parkinson-2-fois-plus-de-cas-en-25-ans>

133. Maladie de Parkinson [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 19 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3058428/fr/maladie-de-parkinson](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3058428/fr/maladie-de-parkinson)

134. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 23 mars 2017;3(1):1-21.

135. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*. 8 oct 1998;339(15):1044-53.

136. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. 15 oct 1998;339(16):1130-43.

137. Prashanth LK, Fox S, Meissner WG. l-Dopa-induced dyskinesia-clinical presentation, genetics, and treatment. *Int Rev Neurobiol*. 2011;98:31-54.

138. Benabid AL, Pollak P, Gross C, Hoffmann D, Benazzouz A, Gao DM, et al. Acute and Long-Term Effects of Subthalamic Nucleus Stimulation in Parkinson's Disease. *SFN*. 1994;62(1-4):76-84.

139. Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science*. 17 avr 2009;324(5925):354-9.

140. Principaux repères sur l'épilepsie [Internet]. [cité 7 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

141. Épilepsie · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 13 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/epilepsie/>

142. Laxpati NG, Kasoff WS, Gross RE. Deep Brain Stimulation for the Treatment of Epilepsy: Circuits, Targets, and Trials. *Neurotherapeutics*. 1 juill 2014;11(3):508-26.

143. Fisher R, Salanova V, Witt T, Worth R, Henry T, Gross R, et al. Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia*. 2010;51(5):899-908.

144. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun*. 2013;4:1376.

145. Tønnesen J, Sørensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M. Optogenetic control of epileptiform activity. *PNAS*. 21 juill 2009;106(29):12162-7.

146. Sukhotinsky I, Chan AM, Ahmed OJ, Rao VR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, et al. Optogenetic Delay of Status Epilepticus Onset in an In Vivo Rodent Epilepsy Model. *PLOS ONE*. 24 avr 2013;8(4):e62013.

147. Ledri M, Madsen MG, Nikitidou L, Kirik D, Kokaia M. Global Optogenetic Activation of Inhibitory Interneurons during Epileptiform Activity. *J Neurosci*. 26 févr 2014;34(9):3364-77.

148. Bouhassira D, Calvino B. Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie. Arnette; 2009. 338 p.

149. Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. sept 2010;150(3):573-81.

150. Devulder J, Richarz U, Nataraja SH. Impact of long-term use of opioids on quality of life in patients with chronic, non-malignant pain. *Curr Med Res Opin*. oct 2005;21(10):1555-68.

151. Fischer B, Russell C, Murphy Y, Kurdyak P. Prescription opioids, abuse and public health in Canada: is fentanyl the new centre of the opioid crisis? *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. déc 2015;24(12):1334-6.

152. Test Plantaire (méthode selon Hargreaves et al.) [Internet]. [cité 21 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.ugobasile.com/fr/produits/catalogue/douleur-et-inflammation/test-plantaire-hargreaves>

153. Plaque Chaude/Froide NG pour rats et souris [Internet]. [cité 21 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.ugobasile.com/fr/produits/catalogue/douleur-et-inflammation/item/197-plaque-chaude-froide-ng-pour-rats-et-souris>
154. Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science*. 15 août 1997;277(5328):968-71.
155. COUX DD. le syndrome douloureux vésical [Internet]. CHU de Nantes. [cité 9 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.chu-nantes.fr/le-syndrome-douloureux-vesical>
156. Zeitler A. Traitement d'une douleur neuropathique par la modulation pharmacologique du complexe basolatéral de l'amygdale. :214.
157. Ji G, Neugebauer V. Reactive Oxygen Species Are Involved in Group I mGluR-Mediated Facilitation of Nociceptive Processing in Amygdala Neurons. *Journal of Neurophysiology*. juill 2010;104(1):218-29.
158. Kolber BJ, Montana MC, Carrasquillo Y, Xu J, Heinemann SF, Muglia LJ, et al. Activation of Metabotropic Glutamate Receptor 5 in the Amygdala Modulates Pain-Like Behavior. *J Neurosci*. 16 juin 2010;30(24):8203-13.
159. Devoizel L, Alvarezl P, Monconduilt L, Dallell R. Representation of dynamic mechanical allodynia in the ventral medial prefrontal cortex of trigeminal neuropathic rats. *European Journal of Pain*. 2011;15(7):676-82.
160. Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, et al. Chronic Back Pain Is Associated with Decreased Prefrontal and Thalamic Gray Matter Density. *J Neurosci*. 17 nov 2004;24(46):10410-5.
161. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain*. 1 août 2005;9(4):463-84.
162. Moisset X, Bouhassira D. Brain imaging of neuropathic pain. *NeuroImage*. 1 janv 2007;37:S80-8.
163. Ji G, Neugebauer V. Pain-related deactivation of medial prefrontal cortical neurons involves mGluR1 and GABAA receptors. *Journal of Neurophysiology*. nov 2011;106(5):2642-52.
164. Ji G, Sun H, Fu Y, Li Z, Pais-Vieira M, Galhardo V, et al. Cognitive Impairment in Pain through Amygdala-Driven Prefrontal Cortical Deactivation. *J Neurosci*. 14 avr 2010;30(15):5451-64.
165. Gu L, Uhelski ML, Anand S, Romero-Ortega M, Kim Y tae, Fuchs PN, et al. Pain Inhibition by Optogenetic Activation of Specific Anterior Cingulate Cortical Neurons. *PLOS ONE*. 25 févr 2015;10(2):e0117746.
166. Crock LW, Kolber BJ, Morgan CD, Sadler KE, Vogt SK, Bruchas MR, et al. Central Amygdala Metabotropic Glutamate Receptor 5 in the Modulation of Visceral Pain. *J Neurosci*. 10 oct 2012;32(41):14217-26.
167. Dugué GP, Lörincz ML, Lottem E, Audero E, Matias S, Correia PA, et al. Optogenetic Recruitment of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons Acutely Decreases Mechanosensory Responsivity in Behaving Mice. *PLOS ONE*. 22 août 2014;9(8):e105941.
168. Zhang Z, Gadotti VM, Chen L, Souza IA, Stemkowski PL, Zamponi GW. Role of Prelimbic GABAergic Circuits in Sensory and Emotional Aspects of Neuropathic Pain. *Cell Reports*. 4 août 2015;12(5):752-9.
169. Ness TJ, Gebhart GF. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoaffective reflexes in the rat. *Brain Research*. 31 mai 1988;450(1):153-69.
170. Ness TJ, Gebhart GF. Interactions between visceral and cutaneous nociception in the rat. I. Noxious cutaneous stimuli inhibit visceral nociceptive neurons and reflexes. *Journal of Neurophysiology*. juill 1991;66(1):20-8.
171. Ness TJ, Elhefni H. Reliable visceromotor responses are evoked by noxious bladder distention in mice. *Journal of Urology*. avr 2004;171(4):1704-8.
172. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. juill 1994;53(1):55-63.
173. Brenner DS, Golden JP, Gereau RW. A novel behavioral assay for measuring cold sensation in

- mice. *PLoS One*. 2012;7(6):e39765.
174. Caspani O, Zurborg S, Labuz D, Heppenstall PA. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One*. 8 oct 2009;4(10):e7383.
175. Yalcin I, Charlet A, Freund-Mercier MJ, Barrot M, Poisbeau P. Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain*. juill 2009;10(7):767-73.
176. Draxler P, Honsek SD, Forsthuber L, Hadschieff V, Sandkühler J. VGluT3+ Primary Afferents Play Distinct Roles in Mechanical and Cold Hypersensitivity Depending on Pain Etiology. *J Neurosci*. 3 sept 2014;34(36):12015-28.
177. Iyer SM, Montgomery KL, Towne C, Lee SY, Ramakrishnan C, Deisseroth K, et al. Virally mediated optogenetic excitation and inhibition of pain in freely moving nontransgenic mice. *Nat Biotechnol*. mars 2014;32(3):274-8.
178. Boada MD, Martin TJ, Peters CM, Hayashida K, Harris MH, Houle TT, et al. Fast-conducting mechanoreceptors contribute to withdrawal behavior in normal and nerve injured rats. *PAIN®*. 1 déc 2014;155(12):2646-55.
179. Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, et al. Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature*. mai 2014;509(7502):617-21.
180. Daou I, Beaudry H, Ase AR, Wieskopf JS, Ribeiro-da-Silva A, Mogil JS, et al. Optogenetic Silencing of Nav1.8-Positive Afferents Alleviates Inflammatory and Neuropathic Pain. *eNeuro* [Internet]. 1 janv 2016 [cité 10 mars 2022];3(1). Disponible sur: <https://www.eneuro.org/content/3/1/ENEURO.0140-15.2016>
181. Hickey L, Li Y, Fyson SJ, Watson TC, Perrins R, Hewinson J, et al. Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *J Neurosci*. 19 mars 2014;34(12):4148-60.
182. Mental health [Internet]. [cité 7 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/mental-health>
183. Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*. mars 2011;471(7338):358-62.
184. Pardo CA, Eberhart CG. The Neurobiology of Autism. *Brain Pathology*. 2007;17(4):434-47.
185. O'Donovan MC, Craddock NJ, Owen MJ. Genetics of psychosis; insights from views across the genome. *Hum Genet*. 1 juill 2009;126(1):3-12.
186. Südhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*. oct 2008;455(7215):903-11.
187. Patterson PH. Modeling Autistic Features in Animals. *Pediatr Res*. mai 2011;69(8):34-40.
188. Markram K, Markram H. The Intense World Theory – A Unifying Theory of the Neurobiology of Autism. *Frontiers in Human Neuroscience* [Internet]. 2010 [cité 11 mars 2022];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2010.00224>
189. Vattikuti S, Chow CC. A Computational Model for Cerebral Cortical Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*. 1 avr 2010;67(7):672-8.
190. Rubenstein JL. Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. *Current Opinion in Neurology*. avr 2010;23(2):118-23.
191. Rubenstein JLR, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*. 2003;2(5):255-67.
192. Endicott J, Spitzer RL. A Diagnostic Interview: The Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 1 juill 1978;35(7):837-44.
193. Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 1 janv 1987;13(2):261-76.
194. Kehrer C, Maziashvili N, Dugladze T, Gloveli T. Altered excitatory-inhibitory balance in the NMDA-hypofunction model of schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Internet]. 2008 [cité 11 mars 2022];1. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/neuro.02.006.2008>
195. Howlin P, Moore A. Diagnosis in Autism: A Survey of Over 1200 Patients in the UK. *Autism*.

1 nov 1997;1(2):135-62.

196. Defining Autism Spectrum Disorders - ProQuest [Internet]. [cité 11 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.proquest.com/openview/85671a7da93da21c411f0fffe10f8be0/1?pq-origsite=gscholar&cbl=25318>

197. Paz JT, Bryant AS, Peng K, Fenno L, Yizhar O, Frankel WN, et al. A new mode of corticothalamic transmission revealed in the Gria4<sup>-/-</sup> model of absence epilepsy. *Nat Neurosci.* sept 2011;14(9):1167-73.

198. Gillott A, Furniss F, Walter A. Anxiety in high-functioning children with autism. *Autism.* sept 2001;5(3):277-86.

199. Kim JA, Szatmari P, Bryson SE, Streiner DL, Wilson FJ. The Prevalence of Anxiety and Mood Problems among Children with Autism and Asperger Syndrome. *Autism.* 1 juin 2000;4(2):117-32.

200. Gonzalez-Burgos G, Hashimoto T, Lewis DA. Alterations of Cortical GABA Neurons and Network Oscillations in Schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* 1 août 2010;12(4):335-44.

201. Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat Med.* sept 2006;12(9):1016-22.

202. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature.* juin 2009;459(7247):698-702.

203. Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature.* juin 2009;459(7247):663-7.

204. Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature.* 27 juill 2011;477(7363):171-8.

205. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature.* nov 2007;450(7168):420-4.

206. Orekhova EV, Stroganova TA, Nygren G, Tsetlin MM, Posikera IN, Gillberg C, et al. Excess of High Frequency Electroencephalogram Oscillations in Boys with Autism. *Biological Psychiatry.* 1 nov 2007;62(9):1022-9.

207. Crocq et Guelfi - 2015 - DSM-5 manuel diagnostique et statistique des troubles.pdf [Internet]. [cité 28 mai 2022]. Disponible sur: <https://psyclinicfes.files.wordpress.com/2020/03/dsm-5-manuel-diagnostique-et-statistique-des-troubles-mentaux.pdf>

208. Aston-Jones G, Bloom FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci.* 1 août 1981;1(8):876-86.

209. Aston-Jones G, Bloom FE. Nonnorepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci.* 1 août 1981;1(8):887-900.

210. Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW. Sleep Cycle Oscillation: Reciprocal Discharge by Two Brainstem Neuronal Groups. *Science.* 4 juill 1975;189(4196):55-8.

211. Aston-Jones G, Cohen JD. AN INTEGRATIVE THEORY OF LOCUS COERULEUS-NOREPINEPHRINE FUNCTION: Adaptive Gain and Optimal Performance. *Annual Review of Neuroscience.* 2005;28(1):403-50.

212. Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews.* 1 avr 2003;42(1):33-84.

213. Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiological Reviews.* juill 1983;63(3):844-914.

214. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature.* oct 2005;437(7063):1257-63.

215. Sara SJ. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci.* mars 2009;10(3):211-23.

216. Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci.* déc 2010;13(12):1526-33.

217. Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L, et al. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*. 22 mai 2009;324(5930):1080-4.
218. DeBusk RF, Haskell WL, Miller NH, Berra K, Taylor CB, Berger WE, et al. Medically directed at-home rehabilitation soon after clinically uncomplicated acute myocardial infarction: a new model for patient care. *Am J Cardiol*. 1 févr 1985;55(4):251-7.
219. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*. 1 juin 2005;62(6):593-602.
220. Lieb R. Anxiety Disorders: Clinical Presentation and Epidemiology. In: Holsboer F, Ströhle A, éditeurs. *Anxiety and Anxiolytic Drugs* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005 [cité 14 mars 2022]. p. 405-32. (*Handbook of Experimental Pharmacology*). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/3-540-28082-0\\_14](https://doi.org/10.1007/3-540-28082-0_14)
221. Troubles anxieux · Inserm, La science pour la santé [Internet]. [cité 7 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/troubles-anxieux/>
222. Charney DS, Deutch AY, Krystal JH, Southwick SM, Davis M. Psychobiologic Mechanisms of Posttraumatic Stress Disorder. *Archives of General Psychiatry*. 1 avr 1993;50(4):294-305.
223. Smith Y, Paré D. Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *Journal of Comparative Neurology*. 1994;342(2):232-48.
224. Carlsen J. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostriatal projection neurons. *Journal of Comparative Neurology*. 1988;273(4):513-26.
225. McDonald AJ. Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1982;208(4):401-18.
226. Krettek JE, Price JL. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*. 1978;178(2):225-53.
227. Krettek JE, Price JL. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *Journal of Comparative Neurology*. 1978;178(2):255-79.
228. Etkin A, Prater KE, Schatzberg AF, Menon V, Greicius MD. Disrupted Amygdalar Subregion Functional Connectivity and Evidence of a Compensatory Network in Generalized Anxiety Disorder. *Archives of General Psychiatry*. 1 déc 2009;66(12):1361-72.
229. Paré D, Quirk GJ, Ledoux JE. New Vistas on Amygdala Networks in Conditioned Fear. *Journal of Neurophysiology*. juill 2004;92(1):1-9.
230. Cioocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SBE, Letzkus JJ, Vlachos I, et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*. nov 2010;468(7321):277-82.
231. Beck AT, Emery G, Greenberg RL. *Anxiety disorders and phobias: A cognitive perspective*. New York, NY, US: Basic Books; 2005. xxxvi, 343 p. (*Anxiety disorders and phobias: A cognitive perspective*).
232. Rauch SL, Shin LM, Phelps EA. Neurocircuitry Models of Posttraumatic Stress Disorder and Extinction: Human Neuroimaging Research—Past, Present, and Future. *Biological Psychiatry*. 15 août 2006;60(4):376-82.
233. Yehuda R. Post-Traumatic Stress Disorder. *New England Journal of Medicine*. 10 janv 2002;346(2):108-14.
234. Rudy JW, O'Reilly RC. Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behavioral Neuroscience*. 1999;113(5):867-80.
235. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. - *PsycNET* [Internet]. [cité 14 mars 2022]. Disponible sur: <https://psycnet.apa.org/doiLanding?doi=10.1037%2F0735-7044.106.2.274>
236. Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behavioral Neuroscience*. 1993;107(6):1093-8.

237. McGaugh JL. Memory--a Century of Consolidation. *Science*. 14 janv 2000;287(5451):248-51.
238. Frankland PW, Josselyn SA, Anagnostaras SG, Kogan JH, Takahashi E, Silva AJ. Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus*. 2004;14(5):557-69.
239. Wiltgen BJ, Brown RAM, Talton LE, Silva AJ. New Circuits for Old Memories: The Role of the Neocortex in Consolidation. *Neuron*. 30 sept 2004;44(1):101-8.
240. Lee JLC, Everitt BJ, Thomas KL. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science*. 7 mai 2004;304(5672):839-43.
241. Fanselow MS, Gale GD. The Amygdala, Fear, and Memory. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;985(1):125-34.
242. Davis M. The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. *Annual Review of Neuroscience*. 1992;15(1):353-75.
243. Maren S. Synaptic Mechanisms of Associative Memory in the Amygdala. *Neuron*. 15 sept 2005;47(6):783-6.
244. Jüngling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD, et al. Neuropeptide S-Mediated Control of Fear Expression and Extinction: Role of Intercalated GABAergic Neurons in the Amygdala. *Neuron*. 31 juill 2008;59(2):298-310.
245. LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci*. 1 avr 1990;10(4):1062-9.
246. Miserendino MJD, Sananes CB, Melia KR, Davis M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*. juin 1990;345(6277):716-8.
247. Wilensky AE, Schafe GE, Kristensen MP, LeDoux JE. Rethinking the Fear Circuit: The Central Nucleus of the Amygdala Is Required for the Acquisition, Consolidation, and Expression of Pavlovian Fear Conditioning. *J Neurosci*. 29 nov 2006;26(48):12387-96.
248. Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang HL (Liz), Buch T, Waisman A, et al. Selective Erasure of a Fear Memory. *Science*. 13 mars 2009;323(5920):1492-6.
249. Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*. 1 nov 1997;20(11):517-23.
250. Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Ciocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, et al. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature*. nov 2010;468(7321):270-6.
251. Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, et al. Dynamics of Retrieval Strategies for Remote Memories. *Cell*. 28 oct 2011;147(3):678-89.
252. Hyman SE. *Depression: The Science of Mental Health*. Routledge; 2013. 316 p.
253. GBD Results Tool | GHDx [Internet]. [cité 7 avr 2022]. Disponible sur: <https://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2019-permalink/d780dffbe8a381b25e1416884959e88b>
254. Nierenberg D. Definitions of Antidepressant Treatment Response, Remission, Nonresponse, Partial Response, and Other Relevant Outcomes: A Focus on Treatment-Resistant Depression. *J Clin Psychiatry*. :5.
255. Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2004;18(6):601-7.
256. Maddox JC, Levi M, Thompson C. The compliance with antidepressants in general practice. *J Psychopharmacol*. 1 janv 1994;8(1):48-52.
257. Melfi CA, Chawla AJ, Croghan TW, Hanna MP, Kennedy S, Sredl K. The Effects of Adherence to Antidepressant Treatment Guidelines on Relapse and Recurrence of Depression. *Archives of General Psychiatry*. 1 déc 1998;55(12):1128-32.
258. Mayberg HS. Modulating limbic-cortical circuits in depression: targets of antidepressant treatments. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 1 oct 2002;7(4):255-68.
259. Pizzagalli DA, Roberts AC. Prefrontal cortex and depression. *Neuropsychopharmacol*. janv 2022;47(1):225-46.
260. Covington HE, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, et al. Antidepressant Effect

- of Optogenetic Stimulation of the Medial Prefrontal Cortex. *J Neurosci*. 1 déc 2010;30(48):16082-90.
261. Hoffman KL. 2 - What can animal models tell us about depressive disorders? In: Hoffman KL, éditeur. *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals* [Internet]. Woodhead Publishing; 2016 [cité 18 mai 2022]. p. 35-86. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000991000029>
262. Addictions · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 16 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/addictions/>
263. Schultz W, Dayan P, Montague PR. A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*. 14 mars 1997;275(5306):1593-9.
264. Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in Neurosciences*. 1 nov 1999;22(11):521-7.
265. Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*. 1 déc 1998;28(3):309-69.
266. Ikemoto S, Panksepp J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Research Reviews*. 1 déc 1999;31(1):6-41.
267. Volkow ND, Morales M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*. 13 août 2015;162(4):712-25.
268. Volkow ND, Koob GF, McLellan AT. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *New England Journal of Medicine*. 28 janv 2016;374(4):363-71.
269. Les addictions [Internet]. Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC). [cité 28 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.frcneurodon.org/comprendre-le-cerveau/le-cerveau-malade-et-ses-maladies-neurologiques/les-addictions/>
270. Wise RA. Ž. *Drug and Alcohol Dependence* 51 1998 13-22 Drug-activation of brain reward pathways.
271. Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*. nov 2005;8(11):1481-9.
272. NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory | Annual Review of Neuroscience [Internet]. [cité 22 févr 2022]. Disponible sur: [https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009?casa\\_token=ScKx5a2hgZ8AAAAA:yVCBR1cMMZPMeMvBXR0AsAcfshKJ\\_8iWnBkOTqqJfuSpRaANragHxz dP7GEBt9BX4x8Xh8o6k5nLKQ](https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009?casa_token=ScKx5a2hgZ8AAAAA:yVCBR1cMMZPMeMvBXR0AsAcfshKJ_8iWnBkOTqqJfuSpRaANragHxz dP7GEBt9BX4x8Xh8o6k5nLKQ)
273. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*. 1 sept 1993;18(3):247-91.
274. Ambroggi F, Ishikawa A, Fields HL, Nicola SM. Basolateral Amygdala Neurons Facilitate Reward-Seeking Behavior by Exciting Nucleus Accumbens Neurons. *Neuron*. 28 août 2008;59(4):648-61.
275. Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1 mai 2002;26(3):321-52.
276. Nicola SM, Yun IA, Wakabayashi KT, Fields HL. Firing of Nucleus Accumbens Neurons During the Consummatory Phase of a Discriminative Stimulus Task Depends on Previous Reward Predictive Cues. *Journal of Neurophysiology*. avr 2004;91(4):1866-82.
277. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1 sept 2018;66:157-86.
278. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *The Lancet*. 18 nov 2006;368(9549):1795-809.
279. Mendes HF, van der Spuy J, Chapple JP, Cheetham ME. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 1 avr 2005;11(4):177-85.
280. Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic Retinitis Pigmentosa Due to Mutations at the Unlinked Peripherin/RDS and ROM1 Loci. *Science*. 10 juin 1994;264(5165):1604-8.

281. *argusii\_transcription\_du\_23\_avril\_2019.pdf* [Internet]. [cité 16 mai 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-03/argusii\\_transcription\\_du\\_23\\_avril\\_2019.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-03/argusii_transcription_du_23_avril_2019.pdf)
282. Baumgardt E. Les mécanismes de la vision. *FeniXX*; 1952. 126 p.
283. Herrera E, Mason CA. The Evolution of Crossed and Uncrossed Retinal Pathways in Mammals. *Evolution of Nervous Systems*. 1 janv 2010;3:307-17.
284. Busskamp V, Picaud S, Sahel JA, Roska B. Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. *Gene Ther*. févr 2012;19(2):169-75.
285. *RetinitePigmentaire-FRfrPub659.pdf* [Internet]. [cité 7 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/RetinitePigmentaire-FRfrPub659.pdf>
286. RetNet: Summaries [Internet]. [cité 17 mars 2022]. Disponible sur: <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm>
287. La vision du patient atteint de rétinopathie pigmentaire [Internet]. [cité 28 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.retinapigmentosa.be/page/la-vision-du-patient.html>
288. Association Retina France - Tout savoir sur la rétinopathie pigmentaire ? [Internet]. Retina France. 2020 [cité 28 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.retina.fr/retinite-pigmentaire/>
289. Pagon RA. Retinitis pigmentosa. *Survey of Ophthalmology*. 1 nov 1988;33(3):137-77.
290. Maghami MH, Sodagar AM, Lashay A, Riazi-Esfahani H, Riazi-Esfahani M. Visual Prostheses: The Enabling Technology to Give Sight to the Blind. *J Ophthalmic Vis Res*. 2014;9(4):494-505.
291. Siy Uy H, Chan PS, Cruz FM. Stem Cell Therapy: a Novel Approach for Vision Restoration in Retinitis Pigmentosa. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*. 2013;2(2):52-5.
292. Tao W. Application of encapsulated cell technology for retinal degenerative diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 1 juill 2006;6(7):717-26.
293. Sahel JA, Roska B. Gene Therapy for Blindness. *Annual Review of Neuroscience*. 2013;36(1):467-88.
294. Petrs-Silva H, Linden R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:127-36.
295. Boye SE, Boye SL, Lewin AS, Hauswirth WW. A Comprehensive Review of Retinal Gene Therapy. *Molecular Therapy*. 1 mars 2013;21(3):509-19.
296. Dalkara D, Sahel JA. Gene therapy for inherited retinal degenerations. *Comptes Rendus Biologies*. 1 mars 2014;337(3):185-92.
297. *luxturna-epar-medicine-overview\_fr.pdf* [Internet]. [cité 16 mai 2022]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview_fr.pdf)
298. Ducloyer JB, Meur GL, Cronin T, Adjali O, Weber M. La thérapie génique des rétinites pigmentaires héréditaires. *Med Sci (Paris)*. 1 juin 2020;36(6-7):607-15.
299. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 26 août 2017;390(10097):849-60.
300. Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, et al. Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration. *Neuron*. 6 avr 2006;50(1):23-33.
301. Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, et al. Visual Properties of Transgenic Rats Harboring the Channelrhodopsin-2 Gene Regulated by the Thy-1.2 Promoter. *PLOS ONE*. 5 nov 2009;4(11):e7679.
302. Thyagarajan S, Wyk M van, Lehmann K, Löwel S, Feng G, Wässle H. Visual Function in Mice with Photoreceptor Degeneration and Transgenic Expression of Channelrhodopsin 2 in Ganglion Cells. *J Neurosci*. 30 juin 2010;30(26):8745-58.
303. Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 14 oct 2008;105(41):16009-14.
304. Melyan Z, Tartelin EE, Bellingham J, Lucas RJ, Hankins MW. Addition of human melanopsin

- renders mammalian cells photoresponsive. *Nature*. 17 févr 2005;433(7027):741-5.
305. GenSight Biologics obtient la désignation de médicament orphelin aux Etats-Unis pour GS030 dans la rétinopathie pigmentaire – GenSight Biologics [Internet]. [cité 17 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.gensight-biologics.com/fr/2017/01/31/gensight-biologics-obtient-la-designation-de-medicament-orphelin-aux-etats-unis-pour-gs030-dans-la-retinopathie-pigmentaire/>
306. Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C, Arleo A, Galluppi F, Martel JN, et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med*. juill 2021;27(7):1223-9.
307. Gouvain G, Akolkar H, Chaffiol A, Arcizet F, Khoei MA, Desrosiers M, et al. Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern discrimination compatible with vision restoration in non-human primates. *Commun Biol*. 27 janv 2021;4(1):1-15.
308. Picaud S, Dalkara D, Marazova K, Goureau O, Roska B, Sahel JA. The primate model for understanding and restoring vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 déc 2019;116(52):26280-7.
309. Posch C, Matolin D, Wohlgenannt R. A QVGA 143 dB Dynamic Range Frame-Free PWM Image Sensor With Lossless Pixel-Level Video Compression and Time-Domain CDS. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*. janv 2011;46(1):259-75.
310. Charters L. Novel gene therapy/medical device combo sheds light on retina in RP. *Digital Edition* [Internet]. 4 mars 2021 [cité 17 mai 2022];46(4). Disponible sur: <https://www.opthalmologytimes.com/view/novel-gene-therapy-medical-device-combo-sheds-light-on-retina-in-rp>
311. Table 2 Second test: counting and locating tumblers. [cité 17 mars 2022]; Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01351-4/tables/2>
312. Table 3 Third test: visual detection task (coupled with EEG recordings). [cité 17 mars 2022]; Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01351-4/tables/3>
313. Roska B, Sahel JA. Restoring vision. *Nature*. mai 2018;557(7705):359-67.
314. Sahel JA, Bennett J, Roska B. Depicting brighter possibilities for treating blindness. *Sci Transl Med*. 29 mai 2019;11(494):eaax2324.
315. Scholl HPN, Strauss RW, Singh MS, Dalkara D, Roska B, Picaud S, et al. Emerging therapies for inherited retinal degeneration. *Sci Transl Med*. 7 déc 2016;8(368):368rv6.
316. Flavell SW, Pokala N, Macosko EZ, Albrecht DR, Larsch J, Bargmann CI. Serotonin and the neuropeptide PDF initiate and extend opposing behavioral states in *C. elegans*. *Cell*. 29 août 2013;154(5):1023-35.
317. Keller EE, Jackson IT, Marsh WR, Triplett WW. Mandibular asymmetry associated with congenital muscular torticollis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. mars 1986;61(3):216-20.
318. Thiele TR, Donovan JC, Baier H. Descending control of swim posture by a midbrain nucleus in zebrafish. *Neuron*. 6 août 2014;83(3):679-91.
319. Lu Y, Truccolo W, Wagner FB, Vargas-Irwin CE, Ozden I, Zimmermann JB, et al. Optogenetically induced spatiotemporal gamma oscillations and neuronal spiking activity in primate motor cortex. *J Neurophysiol*. 1 juin 2015;113(10):3574-87.
320. GenSight Biologics Reports Second Patient Case Showing Significant Visual Recovery after GS030 Optogenetic Treatment – GenSight Biologics [Internet]. [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.gensight-biologics.com/2021/11/17/gensight-biologics-reports-second-patient-case-showing-significant-visual-recovery-after-gs030-optogenetic-treatment/>
321. biopharma-reporter.com. Allergan bolts on optogenetics platform with RetroSense buy [Internet]. biopharma-reporter.com. [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2016/09/07/Allergan-bolts-on-optogenetics-platform-with-RetroSense-buy>
322. Road P 5555 6925 OM, #701, Columbia, Blindness M 21045 D can be mailed directly to: FF, Box 45740 PO, Baltimore, et al. Bionic Sight's Optogenetic Therapy Enables Blind Patients to Detect Light and Motion in Early Trial [Internet]. Foundation Fighting Blindness. [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.fightingblindness.org/research/bionic-sight-s-optogenetic-therapy-enables-blind-patients-to-detect-light-and-motion-in-early-trial-217>

323. GS030 pour l'Atrophie Géographique (GA) de la DMLA sèche – GenSight Biologics [Internet]. [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.gensight-biologics.com/fr/product/gso30-pour-atrophie-geographique-dmla-seche/>
324. Massé A, Buhannic L. Vers un traitement personnalisé de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *Actualités Pharmaceutiques*. 1 avr 2017;56(565):26-9.
325. Neuropathie Optique Héritaire de Leber : GenSight Biologics lance une étude de phase III [Internet]. [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.caducee.net/actualite-medicale/13084/neuropathie-optique-hereditaire-de-leber-gensight-biologics-lance-une-etude-de-phase-iii.html>
326. GenSight Biologics annonce la publication d'une revue des essais de thérapie génique pour la NOHL dans *International Ophthalmology Clinics* [Internet]. La Bourse et la Vie TV L'information éco à valeur ajoutée. 2021 [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.labourseetlavie.com/actualites-economiques-et-financieres-actualites/gensight-biologics-annonce-la-publication-dune-revue-des-essais-de-therapie-genique-pour-la-nohl-dans-international-ophthalmology-clinics>
327. Thérapie génique · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/therapie-genique/>
328. Matonti F, Roux S, Denis D, Picaud S, Chavane F. Cécité et réhabilitation visuelle. *Journal Français d'Ophtalmologie*. 1 févr 2015;38(2):93-102.
329. Approach - Q-State Biosciences, Inc. [Internet]. [cité 27 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.qstatebio.com/approach>
330. Daumas S. Allumer la lumière et ré-activer les souvenirs perdus.... *Med Sci (Paris)*. 1 déc 2014;30(12):1084-6.
331. Lindner R, Hartmann E, Tarnawski M, Winkler A, Frey D, Reinstein J, et al. Photoactivation Mechanism of a Bacterial Light-Regulated Adenylyl Cyclase. *Journal of Molecular Biology*. 5 mai 2017;429(9):1336-51.
332. Córdova C, Lozano C, Rodríguez B, Marchant I, Zúñiga R, Ochoa P, et al. Optogenetic control of cancer cell survival in ChR2-transfected HeLa cells. *Int J Exp Pathol*. déc 2021;102(6):242-8.
333. Wong AA, Brown RE. Visual detection, pattern discrimination and visual acuity in 14 strains of mice. *Genes, Brain and Behavior*. 2006;5(5):389-403.
334. Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 28 févr 2003;463(1):55-65.
335. He Y, Tian X, Hu X, Porreca F, Wang ZJ. Negative Reinforcement Reveals Non-Evoked Ongoing Pain in Mice With Tissue or Nerve Injury. *The Journal of Pain*. 1 juin 2012;13(6):598-607.
336. King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J, et al. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci*. nov 2009;12(11):1364-6.
337. Park HJ, Stokes JA, Pirie E, Skahen J, Shterman Y, Yaksh TL. Persistent Hyperalgesia in the Cisplatin-Treated Mouse as Defined by Threshold Measures, the Conditioned Place Preference Paradigm and Changes in Dorsal Root Ganglia Activated Transcription Factor 3: The Effects of Gabapentin, Ketorolac and Etanercept. *Anesth Analg*. janv 2013;116(1):224-31.
338. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*. 21 août 2002;134(1):49-57.
339. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In: Guest PC, éditeur. *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2019 [cité 17 mai 2022]. p. 69-74. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4)
340. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 1 juin 2012;211:39-50.
341. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Internet]. 2017 [cité 17 mai 2022];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00284>

---

## ABSTRACT

---

### Contribution of optogenetics in medicine

Optogenetics combines the optical and genetic domains. The method consists in introducing a gene that codes for a photosensitive protein, called opsin, to target cell in order to make it photosensitive. Its illumination will activate or inhibit it according to the type of opsin expressed. Named method of the year by the journal "Nature methods", optogenetics allows a precise, real-time, and reversible spatio-temporal control in order to study and manipulate the functionality of cellular networks in a living animal. The diversity of opsins has allowed the development of the field of optogenetics and the achievement of various goals in ex-vivo or in-vivo experiments. Initially confined to the neurosciences, today the technique brings a lot to medicine in terms of fundamental knowledge and physio-pathological understanding various experiments on rodents have been conducted to better understand various neurological, psychiatric and ophthalmic disorders. It is also finding its place in therapeutics, as since October 2021, the first experimental optogenetic treatment has been developed: GS030 is indicated for non-syndromic retinopathy of pigment and allows a blind man to recover (partially) his vision. Optogenetic neuromodulation is a mutation-independent approach to restoring physiological functions, such as vision, in a sick subject, which is a real advance. This technology opens the way to other applications in ophthalmic or neurological diseases.

**Keywords:** *optogenetics - genetics - optics - opsin - photosensitive - neuroscience - medicine - neurology - psychiatry - ophthalmology - neuromodulation - therapeutic targets - treatment - GS030 – retinosis pigmentosa.*

**Writer:** BOURZIK Iness

**Thesis supervisor:** LAJOIE-MAZENC Isabelle

# L'APPORT DE L'OPTOGÉNÉTIQUE EN MÉDECINE

---

## RÉSUMÉ

---

L'optogénétique associe le domaine optique et le domaine génétique. La méthode consiste à introduire un gène qui code pour une protéine photosensible, appelée opsine, dans une cellule cible afin de la rendre photosensible. Son illumination l'activera ou l'inhibera en fonction du type d'opsine exprimée.

Nommée méthode de l'année par la revue « Nature methods », l'optogénétique permet ainsi un contrôle spatio-temporel précis, en temps réel et réversible afin d'étudier et manipuler la fonctionnalité d'une cellule ou de réseaux cellulaires d'un animal vivant.

La diversité des opsines a permis de développer le domaine de l'optogénétique et d'atteindre des buts variés lors d'expériences *ex-vivo* ou *in-vivo*.

D'abord cantonnée aux neurosciences, aujourd'hui la technique apporte beaucoup à la médecine en termes de connaissances fondamentales et compréhensions physiopathologiques : diverses expériences sur des rongeurs ont été menées pour mieux comprendre certains troubles neurologiques, psychiatriques et ophtalmiques.

Elle trouve également de plus en plus sa place dans la thérapeutique puisque depuis octobre 2021 le premier traitement optogénétique expérimental a vu le jour : l'essai de thérapie génique GS030 a été développé pour la rétinopathie pigmentaire non syndromique et a permis à un homme aveugle de retrouver (partiellement) la vue.

La neuromodulation optogénétique est une approche indépendante des mutations pour restaurer des fonctions physiologiques, telle que la vision, chez un sujet malade, ce qui est une réelle avancée. Cette technologie ouvre donc la voie à d'autres applications dans des maladies ophtalmiques ou neurologiques.

**Mots clefs :** *optogénétique – génétique – optique – opsine – photosensible – neurosciences - médecine – neurologie – psychiatrie – ophtalmologie - neuromodulation – cibles thérapeutiques – traitement – GS030 – rétinopathie pigmentaire.*

**Auteur :** BOURZIK Iness

**Directeur de thèse :** LAJOIE-MAZENC Isabelle