

La rétinopathie pigmentaire : restauration visuelle par thérapie optogénétique

Botond Roska¹, Volker Busskamp¹, José Alain Sahel^{2,3,4,5,6,7,8} et Serge Picaud^{2,3,4,5}

¹ Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Maulbeerstrasse 66F, 4058 Basel, Switzerland

² UPMC Université Paris VI, Institut de la Vision, UMRS 968, 75012 Paris, France

³ INSERM, U968, 75012 Paris, France

⁴ CNRS, UMR7210, 75012 Paris, France

⁵ Fondation Ophthalmologique Adolphe de Rothschild, 75019 Paris, France

⁶ Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, 75012 Paris, France

⁷ Institute of Ophthalmology, University College of London, London EC1V9EL, UK

⁸ Académie des Sciences-Institut de France, 75006 Paris, France

Auteur correspondant : Botond Roska, botond.roska@fmi.ch

Reçu le 21 mai 2013

Résumé – La rétinopathie pigmentaire (RP) est une maladie héréditaire de la rétine conduisant à la cécité. Cette pathologie affecte deux millions de personnes dans le monde. Restaurer la vision de patients aveugles a été proposé par thérapie génique visant à transformer des cellules rétinienne en photorécepteurs par expression de gènes microbiens codant pour des canaux ou pompes ioniques activés par la lumière. Cette stratégie thérapeutique a été validée sur des modèles animaux de RP par enregistrement au niveau de la rétine et du cortex et par des tests de comportement. Le potentiel translationnel de ces thérapies optogénétiques a été évalué *in vitro* sur des tissus rétiens humains *post-mortem*. Cette revue présente ces résultats récents et les applications cliniques potentielles pour les patients atteints de RP.

Mots clés : Rétinite pigmentaire / thérapie optogénétique / photorécepteurs artificiels

Abstract – Retinitis pigmentosa: eye sight restoration by optogenetic therapy.

Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary retinal disease leading to blindness, which affects two million people worldwide. Restoring vision in these blind patients was proposed by gene delivery of microbial light-activated ionic channels or pumps “optogenetic proteins” to transform surviving cells into artificial photoreceptors. This therapeutic strategy was validated in blind animal models of RP by recording at the level of the retina and cortex and by behavioural tests. The translational potentials of these optogenetic approaches have been evaluated using *in vitro* studies on *post-mortem* human retinal tissues. Here, we review these recent results and discuss the potential clinical applications of the optogenetic therapy for RP patients.

Key words: Retinitis pigmentosa / optogenetic therapy / artificial photoreceptors

Rétinopathie pigmentaire et thérapie actuelle

La rétinopathie pigmentaire (RP) rassemble un groupe hétérogène de maladies progressives héréditaires de la rétine, qui conduisent à la cécité. Cette maladie affecte deux millions de personnes

dans le monde. La RP débute habituellement chez de jeunes adultes par une cécité nocturne, qui résulte du dysfonctionnement et/ou de la dégénérescence précoce des bâtonnets, responsables de la vision en très faible luminance. Ce premier événement est suivi d'un déclin progressif des cônes, photorécepteurs responsables de la vision des couleurs en condition de

plus hautes luminances. Des mutations sur au moins 44 gènes ont été rapportées dans différentes formes de RP (Farrar *et al.*, 2002; Kennan *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2010). Cependant, dans environ 55 % des cas, la mutation n'est pas encore identifiée. La plupart des gènes de RP connus sont exprimés dans les bâtonnets; dans ces cas-là, on interprète la dégénérescence des cônes comme une conséquence secondaire de la mort des bâtonnets (Sahel *et al.*, 2001; Leveillard *et al.*, 2004; Sancho-Pelluz *et al.*, 2008; Koenekoop, 2009; Leveillard & Sahel, 2010).

Si certaines stratégies thérapeutiques permettent de ralentir l'évolution de quelques formes de rétinopathies pigmentaires, d'autres traitements sont actuellement au stade des essais cliniques (Jacobson & Cideciyan, 2010). Les nouvelles stratégies appartiennent à trois groupes. En premier lieu, la thérapie génique (Smith *et al.*, 2009) est une stratégie séduisante, de conception simple si, comme c'est le cas dans la plupart des formes récessives, la RP est due à des mutations perte de fonction. Le succès de la thérapie génique pour une forme d'amaurose congénitale de Leber (Cremers *et al.*, 2002), provoquée par des défauts du gène *RPE65*, spécifique de l'épithélium pigmentaire rétinien, a non seulement apporté un espoir aux patients affectés par cette maladie, mais a aussi augmenté la confiance sur la sécurité et l'efficacité des vecteurs associés à l'adénovirus (AAV, *Adeno-Associated Virus*) après administration intra-oculaire chez l'Homme (Bainbridge *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2008; Hauswirth *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008). Comme la thérapie génique ne peut être mise en œuvre que si le type cellulaire exprimant le gène muté est encore vivant, il faut poser le diagnostic à un stade très précoce pour définir si les bâtonnets expriment le gène muté et mettre en œuvre la thérapie génique pour prévenir leur dégénérescence. La thérapie génique est plus compliquée à réaliser dans les formes dominantes de RP (Mussolino *et al.*, 2011), où la mutation initie une voie toxique, ainsi que dans les formes récessives, si la dimension du gène excède la capacité des vecteurs viraux. Néanmoins, si elle est possible, la thérapie génique est le moyen le plus évident et probablement le plus efficace pour restaurer la fonction. Une autre stratégie consiste à ralentir la dégénérescence des photorécepteurs et donc à retarder la progression de la maladie comme cela est réalisé avec des facteurs trophiques comme le CNTF (*Ciliary NeuroTrophic Factor*) (Kauper, 2012) ou le RdCVF (*Rod-derived Cone Viability Factor*) (Leveillard, 2010), voire d'autres agents thérapeutiques (Frasson *et al.*, 1999a, 1999b; Hamel, 2006; Sieving *et al.*, 2006; Punzo *et al.*, 2009; Fernandez-Sanchez *et al.*, 2011; Nakazawa *et al.*, 2011). Enfin un certain nombre d'approches n'interfèrent pas avec la progression inhérente

à la maladie mais cherchent à restaurer une fonction visuelle en créant de nouveaux photorécepteurs et en les couplant au circuit rétinien résiduel. Les patients légalement aveugles représentent la population-cible de ces thérapies. Trois différentes stratégies sont explorées : (1) l'implantation de photorécepteurs différenciés ou indifférenciés (Dahlmann-Noor *et al.*, 2010); (2) des implants rétinien électroniques (Zrenner & Will, 2002; Chader *et al.*, 2009; Zrenner *et al.*, 2011; Humayun *et al.*, 2012; da Cruz *et al.*, 2013); et (3) des approches dites « optogénétiques » (Bi *et al.*, 2006; Lagali *et al.*, 2008; Busskamp *et al.*, 2010), sujet de cette revue, qui font appel à des protéines photosensibles (Zhang *et al.*, 2007a; Miesenbock, 2009; Bamann *et al.*, 2010) pour rendre les cellules rétinien résiduelles sensibles à la lumière. Le succès de l'implantation cellulaire dépend de la formation de synapses fonctionnelles entre les photorécepteurs implantés et les cellules bipolaires endogènes, et de la présence d'épithélium pigmentaire de rétine pour apporter du 11-cis-rétinol aux photorécepteurs. Les implants électroniques et les approches optogénétiques sont analogues en ce que l'implant ou la protéine photosensible sont utilisés pour stimuler les cellules rétinien résiduelles. La différence critique entre ces deux techniques réside dans la manière par laquelle le courant généré par la lumière stimule les cellules. Dans le cas des implants électroniques, le courant est distribué à l'extérieur des cellules qu'il active par proximité ainsi que par l'intermédiaire d'autres paramètres physiques. Les essais cliniques avec des implants rétinien ont validé la possibilité de réactiver les circuits rétinien pour restaurer une certaine perception visuelle. Avec ces implants, certains patients aveugles peuvent à nouveau lire des lettres, voire des mots. Dans le cas de la thérapie optogénétique, le courant généré par des protéines photosensibles traverse la membrane cellulaire. L'avantage des approches optogénétiques est de pouvoir cibler l'expression de la protéine photosensible sur un ou plusieurs types cellulaires rétinien spécifiques. L'illumination induira donc un effet uniquement dans les cellules exprimant la protéine photosensible. Suivant la spécificité de cette expression, il est possible de stimuler ou inhiber un type cellulaire et ainsi de produire une activité rétinienne artificielle, proche de l'activité normale des circuits rétinien. Ces approches optogénétiques en sont seulement au stade des essais pré-cliniques sur les modèles murins ou sur des primates non-humains.

La présente revue décrit les avancées de la stimulation optogénétique de circuits rétinien sur les modèles animaux de RP et sur explants rétinien humains. Elle présente également les défis à relever avant l'application clinique de cette stratégie optogénétique.

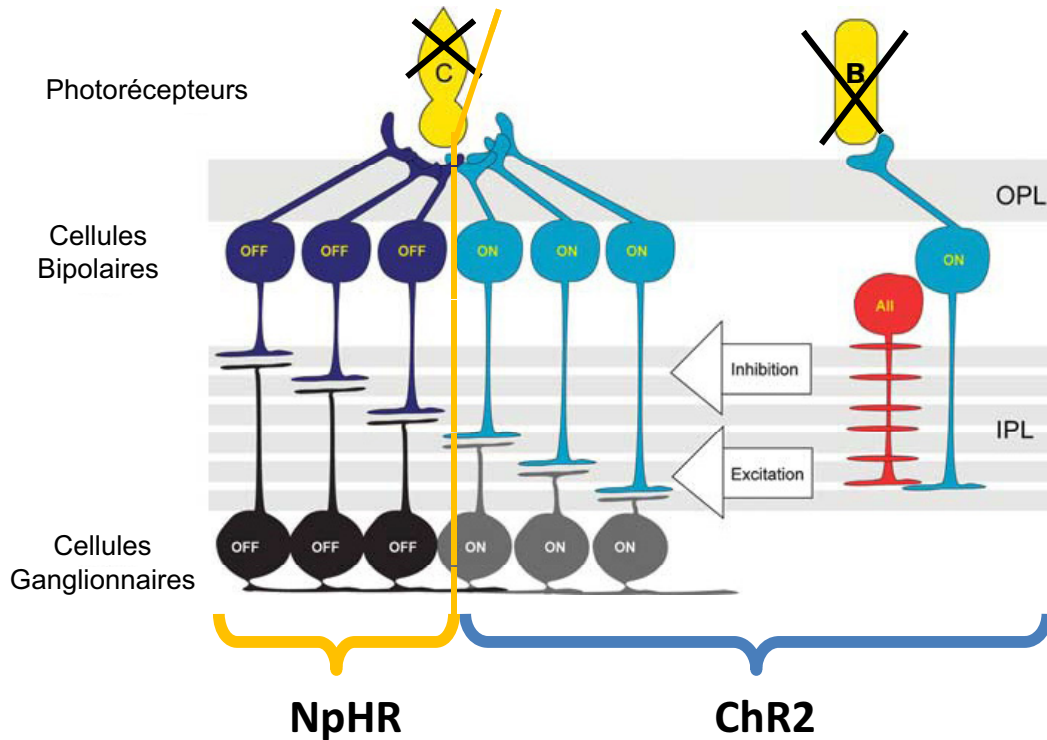


Fig. 1. Stratégies optogénétiques ciblées sur un type cellulaire pour restaurer la vision dans la RP. Dans cette pathologie rétinienne, les photorécepteurs de type bâtonnet (B) disparaissent puis les photorécepteurs de type cône (C) dégèrent mais certains cônes subsistent après avoir perdu leur partie photosensible laissant uniquement le corps cellulaire et sa connexion synaptique. Ces cônes non photosensibles sont alors dits « dormants ». La restauration optogénétique est basée sur l'expression d'une protéine photosensible qui peut soit hyperpolariser les cellules comme pour l'halorhodopsine (NpHR) soit les dépolariser comme pour la channelrhodopsine2 (ChR2). L'halorhodopsine sera exprimée dans les cellules s'hyperpolarisant à la lumière (cônes dormants, cellules bipolaires OFF, cellules ganglionnaires OFF), alors que la channelrhodopsine2 devra être ciblée dans les cellules se dépolarisant à la lumière (cellules bipolaires ON, cellules amacrine AII, cellules ganglionnaires ON). OPL : couche plexiforme externe ; IPL : couche plexiforme interne.

Créer des photorécepteurs artificiels dans le circuit rétinien résiduel

L'idée centrale de la restauration visuelle par l'optogénétique est de faire exprimer des protéines photosensibles par une stratégie génétique dans des cellules rétinienne d'importance stratégique, de manière à les convertir en photorécepteurs artificiels. Ces photorécepteurs artificiels auront leur activité modulée par la lumière ce qui réintroduira une information visuelle dans le circuit. Le défi consiste donc à choisir la cellule cible et la stratégie appropriée pour induire l'expression de la protéine photosensible dans cette cellule. L'objectif final est que l'activité rétinienne évoquée par la lumière dans ces photorécepteurs artificiels produise dans le circuit une activité analogue à celle induite dans le circuit normal par des véritables photorécepteurs. Pour comprendre les diverses stratégies, nous présenterons rapidement

le traitement de l'information visuelle dans le circuit rétinien dont la structure est relativement bien conservée au cours de l'évolution chez les mammifères.

Le circuit rétinien mammalien

La rétine des mammifères peut être considérée comme un processeur qui acquiert les images à l'aide d'une mosaïque de photorécepteurs et utilise ensuite des circuits neuronaux internes pour intégrer de nombreuses représentations neurales des scènes visuelles (Roska & Werblin, 2001 ; Gollisch & Meister, 2010). Celles-ci sont ensuite envoyées à des centres cérébraux supérieurs par les axones de différents types de cellules ganglionnaires de la rétine. Les photorécepteurs à cônes, responsables de la vision diurne, se connectent à dix types de cellules bipolaires (Masland, 2001 ; Wässle, 2004) (figure 1). La moitié des cellules

bipolaires connectées à des cônes sont activées (dépolarisées) par une diminution de luminance (cellules *OFF*) et l'autre moitié par une augmentation de luminance (cellules *ON*). Les terminaisons axonales des cellules bipolaires *OFF* et *ON* sont situées à différents niveaux de la couche plexiforme interne (CPI) : les terminaux *OFF* dans la partie distale, et les terminaux *ON* dans la partie proximale. La répartition se répète à une échelle encore plus fine : les terminaisons synaptiques des cellules bipolaires occupent seulement une ou quelques-unes des dix strates de la CPI.

Les dendrites de plusieurs types de cellules ganglionnaires s'arborescent également dans ces strates de la CPI et reçoivent des influx excitateurs des terminaisons synaptiques des cellules bipolaires. La réponse d'une cellule ganglionnaire est déterminée par la répartition de ces dendrites dans la CPI et par le type de cellule bipolaire qui lui communique l'information : *ON*, *OFF* ou *ON-OFF*. La synapse entre photorécepteur et cellule bipolaire dans la couche plexiforme externe est régulée par les cellules horizontales inhibitrices. La synapse excitatrice entre cellules bipolaires et cellules ganglionnaires est modulée par des cellules amacrines inhibitrices. Ces cellules reçoivent des influx excitateurs des cellules bipolaires et les transmettent aux terminaisons synaptiques des cellules bipolaires et sur les dendrites des cellules ganglionnaires. Les cellules amacrines sont extrêmement diverses avec plus de trente types morphologiques décrits, qui représentent presque la moitié de toutes les cellules rétinienne. La fonction de la plupart d'entre elles est inconnue. Selon l'interprétation actuelle, chaque type cellulaire ganglionnaire incorpore dans son circuit rétinien local quelques cellules bipolaires et quelques types de cellules amacrines. Ces circuits de cellules ganglionnaires sont modulaires, les cellules ganglionnaires du même type morphologique et physiologique étant arrangées en une mosaïque, qui couvre la totalité de la rétine. Chaque type de cellules ganglionnaires, avec son circuit local, extrait un aspect particulier de la scène visuelle.

En conditions de faible luminance, les images sont captées par les bâtonnets (B dans la figure 1). L'information est transmise par ceux-ci aux terminaisons axonales des cellules bipolaires *ON* et *OFF* à cônes par l'intermédiaire d'un petit circuit. Les bâtonnets sont connectés aux cellules bipolaires à bâtonnets, qui se terminent dans la partie la plus proximale de la CPI (figure 1). Ces cellules bipolaires sont des cellules de type *ON*. Les cellules bipolaires des bâtonnets excitent un type d'interneurones, les cellules amacrines AII, qui transmettent leur activation aux terminaisons axonales des cellules bipolaires *ON* à cônes par l'intermédiaire d'une jonction électrique. Cette jonction électrique permet de garder l'information *ON* issue

des cellules bipolaires à bâtonnets de type *ON*. Les cellules AII communiquent également l'information visuelle aux cellules bipolaires de type *OFF* à cônes par l'intermédiaire de leur synapse glycinergique inhibitrice. Cette synapse inhibitrice permet d'inverser le signe de la réponse *ON* issue des cellules bipolaires à bâtonnets. À partir des terminaisons axonales des cellules bipolaires à cônes, l'information visuelle suit la même voie que l'information visuelle issue des cônes (de Vries & Baylor, 1995 ; Soucy *et al.*, 1998).

Chez les primates, en particulier chez l'Homme, l'arrangement spatial de l'organisation du circuit rétinien décrit ci-dessus se modifie au niveau d'une aire rétinienne spécialisée, la fovea. Celle-ci est un lieu d'acuité visuelle élevée et a donc une importance centrale dans les activités visuelles humaines de routine, telle que la lecture. Alors que la connectivité de base de la fovea est similaire à celle de la périphérie, dans le cas des primates et des autres mammifères, il y a des différences à considérer pour les stratégies optogénétiques. D'abord, le seul type cellulaire présent dans la fovea est le cône. Tous les autres types cellulaires sont déportés autour de la fovea. De plus, la zone centrale a une densité de bâtonnets très faible, et ceux-ci sont complètement absents du centre de la fovea. Enfin le nombre de cônes fovéaux convergents sur une cellule ganglionnaire est beaucoup plus petit qu'à la périphérie, avec certains types cellulaires ganglionnaires connectés à un seul cône.

Outils optogénétiques et stratégies de leur utilisation dans les types cellulaires rétiniens

L'optogénétique fait appel à une expression ectopique de molécules pour modifier le potentiel de membrane des cellules cibles, lorsque l'intensité lumineuse augmente. Il y a deux catégories principales d'outils optogénétiques, ceux qui dépolarisent les neurones et, donc, les activent ; ceux qui les hyperpolarisent et les inactivent. Ces outils ont été décrits en détail dans d'autres revues (Mienssenbock, 2009 ; Bamann *et al.*, 2010). Nous discuterons ici de deux molécules microbiennes : la rhodopsine canal2 (*channelrhodopsin2*, ChR2) de *Chlamydomonas reinhardtii*, un canal cationique activé par la lumière, dépolarisant les cellules éclairées (Nagel *et al.*, 2003 ; Boyden *et al.*, 2005), et l'halorhodopsine de l'archée *Natromonas pharaonis* (NpHR), une pompe à ion chlorure activée par la lumière, hyperpolarisant les cellules illuminées (Schobert & Lanyi, 1982 ; Han & Boyden, 2007 ; Zhang *et al.*, 2007b). La stimulation lumineuse de la rétine saine induit deux réponses distinctes dans les cellules rétiniennes. Les photorécepteurs s'hyperpolarisent quand l'intensité lumineuse augmente. Les

cellules horizontales, les cellules bipolaires *OFF*, les cellules amacrines *OFF* et les cellules ganglionnaires *OFF*, connectées directement ou indirectement par des synapses excitatrices conservatrices de signaux aux photorécepteurs, réagissent donc également par l'hyperpolarisation. NpHR serait l'outil approprié à exprimer dans ces cellules *OFF* pour induire l'hyperpolarisation induite par la lumière (figure 1). Comme les connexions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires *ON* inversent les signaux, la ChR2 serait plus appropriée pour les cellules de type *ON*, telles que les cellules bipolaires *ON*, qui se dépolarisent sous l'effet d'une augmentation de l'intensité lumineuse (figure 1). De même, les cellules amacrines *ON* (amacrines AII par exemple) et les cellules ganglionnaires *ON* sont connectées par des synapses conservatrices de signaux aux cellules bipolaires *ON* et, par voie de conséquence, elles se dépolarisent aussi en réponse à une stimulation lumineuse. Par conséquent, l'activité normalement évoquée par la lumière dans les cellules *ON* devrait être mimée par la ChR2. Pour simplifier, les cellules *ON-OFF* sont omises de la discussion.

Stratégies de restauration optogénétique de la vision

Il y a au moins cinq moyens possibles de réactiver les circuits rétiniens dans la RP. Notons que l'état des circuits rétiniens dans la RP est différent de celui de la rétine normale (Milam *et al.*, 1998; Humayun *et al.*, 1999; Marc *et al.*, 2003; Jones, 2005; Vugler, 2010). Nous comparerons ces cinq méthodes dans le contexte de l'état de dégénérescence de la rétine, de l'activité résultant de la thérapie, et de l'applicabilité de l'optogénétique aux patients (figure 1).

L'une des stratégies consiste à mettre en œuvre un promoteur ubiquitaire fort dans différents types de cellules rétiniennes, c'est-à-dire sans cibler des types cellulaires particuliers. Après injection intravitréale de vecteurs AAV-2, un ensemble de cellules ganglionnaires et de cellules amacrines est transduit. L'injection intra-vitréale de ce vecteur portant ChR2 dans le modèle murin *rd1* de RP a apporté la première preuve de principe, selon lequel l'optogénétique peut restaurer la fonction rétinienne. La souris adulte *rd1* n'a ni bâtonnets ni cônes fonctionnels, elle représente donc un bon modèle pour tester la photosensibilité rétinienne après « restauration optogénétique ». Cette étude a mis en évidence des réponses *ON* dans toutes les cellules rétiniennes ganglionnaires et des potentiels évoqués visuellement dans le cortex (Bi *et al.*, 2006). Des traitements analogues ont évoqué des changements de comportements dans des modèles de RP chez le rat

(Farah *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2009). De plus, des souris (Thyagarajan *et al.*, 2010) et des rats (Tomita *et al.*, 2009) transgéniques aveugles ont été obtenus, qui n'expriment ChR2 que dans une fraction des cellules ganglionnaires. La rétine de ces animaux transgéniques a retrouvé la sensibilité lumineuse et les rats ont présenté un comportement dirigé par la vue. De même, l'expression étendue de NpHR peut provoquer des réponses *OFF* et l'expression combinée de ChR2 et NpHR des réponses *ON* et *OFF* (Zhang *et al.*, 2009) ou, si ces expressions sont distribuées différemment dans une cellule, une excitation centrale et une inhibition périphérique (Greenberg *et al.*, 2011). Des canaux sensibles à la lumière, élaborés à partir de récepteurs au glutamate, se sont révélés également capables d'évoquer des réponses de cellules ganglionnaires (Caporale *et al.*, 2011).

Les autres stratégies, décrites ci-dessous, diffèrent de la première, dans la mesure où la protéine optogénétique est exprimée dans une classe ou un type de cellules restreint, stratégiquement choisi pour permettre une stimulation rétinienne plus spécifique. Une deuxième stratégie consisterait à raffiner la première approche en exprimant différents outils optogénétiques dans les cellules ganglionnaires *ON* et *OFF*, de telle sorte que les cellules ganglionnaires *ON* expriment ChR2 et les cellules ganglionnaires *OFF* NpHR. Ceci assurerait le maintien de la polarité de leur réponse naturelle. Cela n'a pas encore été réalisé, probablement parce qu'on ne connaît pas de promoteurs spécifiques différenciant les cellules *ON* des cellules *OFF*.

Une troisième stratégie serait d'exprimer ChR2 sur des cellules bipolaires *ON* et NpHR sur des cellules bipolaires *OFF* pour réactiver la modulation inhibitrice des cellules ganglionnaires par les cellules amacrines. Dans la rétine saine, l'activité de ces dernières est importante pour une variété de fonctions rétiniennes, comme par exemple la détection de différents composants de l'image ou des mouvements oculaires. À l'aide de l'électroporation (Matsuda & Cepko, 2004), une méthode qui n'est envisageable que chez des animaux expérimentaux, ChR2 a été ciblée sur des cellules bipolaires *ON* chez des souris *rd1*. Chez ces souris, les cellules ganglionnaires *ON* ont été activées par les cellules bipolaires *ON* exprimant ChR2, et inhibées par les cellules amacrines, elles-mêmes excitées par les cellules bipolaires *ON* sensibles à la lumière. Il est à remarquer que des signes d'interactions latérales, comme le filtrage temporel et spatial, ont été observés et que seules les cellules qui présentaient la signature morphologique de cellules ganglionnaires *ON* (c'est-à-dire la stratification) ont répondu aux augmentations de lumière. Une activité évoquée par la lumière a été mesurée dans le cortex, et un comportement induit

par la lumière a été documenté (Lagali *et al.*, 2008). Depuis, l'administration virale de ChR2 a été ciblée avec succès dans les cellules bipolaires *ON* murines (Doroudchi *et al.*, 2011), mais l'expression génique à partir de sérotypes AAV courants et avec des promoteurs décrits n'est pas encore efficace dans les cellules bipolaires *ON* humaines (Fradot *et al.*, 2011). Par ailleurs, on ne connaît aucun promoteur capable de cibler spécifiquement toutes les cellules bipolaires *OFF*.

Une quatrième stratégie consiste à exprimer ChR2 seule dans les cellules amacrines AII. Les cellules AII activent les cellules bipolaires *ON* des cônes et inactivent les cellules bipolaires *OFF* des cônes; en principe donc, l'activation des cellules *ON* et *OFF* pourrait être déclenchée par une seule protéine optogénétique. Toutefois on n'a pas encore obtenu l'activation des AII par la ChR2.

Une cinquième stratégie en cours exploite le résultat trouvé chez le modèle *rd1* de RP, selon lequel la disparition complète des réponses à la lumière commandées par les bâtonnets et les cônes ne correspond pas à la mort de l'ensemble des bâtonnets et des cônes. Les corps cellulaires de certains cônes restent vivants longtemps après la perte de leur photosensibilité (Busskamp *et al.*, 2010). Leur nombre décroît, mais environ 25 % subsistent encore sept mois après cette perte initiale (Busskamp *et al.*, 2010). Une dissociation analogue entre fonction visuelle et mort des cônes existe également chez certains patients, et l'examen *post-mortem* des rétines de patients RP a révélé au moins une rangée de cônes persistant dans la fovea (Milam *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2009).

La conservation des cônes humains dans la périphérie n'a pas été documentée. Toutefois, aux stades tardifs de la RP, au moins chez les souris *rd1*, il n'est pas facile de distinguer morphologiquement les corps cellulaires des cônes de ceux des cellules bipolaires. Ni l'absence d'une couche nucléaire externe, ni même l'absence d'affinité pour un anticorps anti-opsine ne démontrent la perte des cônes. L'hybridation *in situ* avec des ARNm d'opsines de cônes, d'arrestine de cônes ou autres ARNm spécifiques des cônes, constituerait un meilleur indicateur pour démontrer la présence de corps cellulaires de cônes dormants. Lorsque NpHR a été exprimée dans de tels cônes ayant perdu leur sensibilité naturelle à la lumière dans des modèles murins de RP, ils retrouvent une réponse à la lumière qui se transmet aux cellules ganglionnaires *ON* et *OFF*. L'activité induite par la lumière se répercute jusque dans le cortex et produit un comportement évoqué par la lumière (Busskamp *et al.*, 2010). Il est à noter qu'un traitement de l'information visuelle aussi sophistiqué que celui de la détection unidirectionnelle du mouvement peut à nouveau être induit dans les cellules ganglionnaires spécifiques de cette

fonction dans des rétines exprimant NpHR dans les cônes. Pour évaluer la possibilité du transfert clinique de cette approche thérapeutique, l'un des vecteurs viraux utilisés dans cette étude a été appliqué sur des explants rétinien de rétine humaine *post-mortem*. L'utilisation de ces explants rétinien humains, qui conservent l'architecture du tissu rétinien, a permis de montrer une expression fonctionnelle de NpHR dans les photorécepteurs humains. En effet, l'expression de NpHR dans les cônes humains induit leur hyperpolarisation en réponse à la stimulation lumineuse (Busskamp *et al.*, 2010).

Choix d'une stratégie optogénétique

Dans la limite de nos connaissances actuelles, quelle est la meilleure stratégie à adopter pour des essais cliniques? Il n'y a pas de réponse simple à cette question; nous discuterons ici les avantages et les limites de chaque méthode. Le premier et plus important élément de réflexion est de considérer l'état de la rétine chez le patient à traiter. Le circuit neural chez les patients affectés de RP est différent du circuit normal (Humayun *et al.*, 1999). La pathologie induit une dégénérescence primaire des bâtonnets suivie d'une dégénérescence secondaire des cônes (Leveillard & Sahel, 2010). D'autres altérations affectent également la rétine interne avec le temps. Quoique nous ayons beaucoup d'informations sur l'état des types cellulaires rétinien dans le modèle murin *rd1*, la généralisation des observations est difficile à établir sur le tissu humain (voir Milam *et al.*, 1998; Humayun *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2009). Il est aussi incertain d'extrapoler les conclusions tirées du modèle murin à la pathologie humaine. Pour définir la cible de la thérapie optogénétique la plus adaptée suivant le stade d'évolution de la pathologie, il est crucial d'identifier les types cellulaires encore vivants au moment de l'intervention. La tomographie par cohérence optique (OCT) permet de réaliser une coupe optique de la rétine et ainsi d'identifier les classes de cellules encore présentes chez les patients. La corrélation des images d'OCT avec la progression clinique de la maladie dans des cohortes de patients caractérisés génétiquement et la comparaison des images d'OCT de différentes formes de RP apporteront des guides utiles aux approches optogénétiques. Cependant, il est souvent difficile d'obtenir des coupes OCT de bonne qualité, car la qualité de l'image dépend de la capacité à immobiliser l'œil, ce qui devient impossible après perte de la vision et donc des capacités de fixation du regard. Étant donné que les essais cliniques impliqueront probablement des patients profondément aveugles, il faudra développer des techniques OCT qui ne requièrent

pas l'immobilisation de l'œil, ou trouver le moyen de bloquer les mouvements oculaires pendant le test.

Faut-il se préoccuper du ciblage spécifique sur un type cellulaire ? Si le but est de mimer le mécanisme normal de la fonction rétinienne, la réponse est oui. Dans ce sens, plus nous pourrions stimuler la rétine en un point proche des photorécepteurs, plus normal sera le mécanisme fonctionnel rétinien évoqué, pourvu que les circuits soient encore intacts. Il n'est pas encore clair que d'autres contraintes soient impliquées, qui empêcheraient le ciblage d'un type cellulaire spécifique, ou que celui-ci soit vraiment nécessaire, car notre cerveau est si plastique qu'il peut apprendre à traiter tout type de stimulation. Une contrainte pratique est, par exemple, l'absence de promoteurs *ON* versus *OFF*, dans le cas des cellules ganglionnaires. Par conséquent, si on cible uniquement les cellules ganglionnaires, il n'y a pas à l'heure actuelle d'autre option que d'utiliser des promoteurs ubiquitaires et de commuter toutes les cellules soit en type *ON* avec ChR2, soit en type *OFF* avec NpHR, ou en un mélange des deux. En ce qui concerne la plasticité, les résultats des implants électroniques prédisent que le cerveau peut acquérir les caractéristiques de base de la scène visuelle par la stimulation rétinotopique. Toutefois la préservation du mécanisme fonctionnel normal de la rétine pourrait avoir un impact majeur sur le degré ou la qualité du fonctionnement visuel retrouvé. Un exemple en est l'effet sur le mouvement oculaire. Nous savons que la plupart des mammifères ont des cellules ganglionnaires spécialisées dans la stabilisation du regard. Les cellules ganglionnaires sensibles au mouvement dans une direction répondent en effet au déplacement lent de l'image ; elles sont supposées fournir un signal rétrocontrôle au réflexe vestibulo-oculaire et également agir sur les éléments du réflexe optomoteur. Il y a trois types de cellules ganglionnaires sensibles aux mouvements qui répondent préférentiellement aux mouvements dans trois axes différents, correspondant à l'orientation des canaux semi-circulaires de l'oreille interne. La fonction des cellules ganglionnaires directionnelles *ON* dépend d'une interaction avec une cellule amacrine spécialisée dans la CPI. La stimulation directe des cellules ganglionnaires abolirait la sélectivité directionnelle, provoquant probablement une déficience de la stabilisation du regard. D'un autre côté, la stimulation des cônes pourrait préserver la sélectivité directionnelle et, par conséquent restaurer le contrôle du regard. Une évaluation précise des mouvements oculaires avant et après le traitement optogénétique pourrait apporter des informations quant au choix des différentes stratégies.

Il faut également considérer l'arrangement anatomique des différentes cellules rétinienne. Les cônes, les cellules bipolaires et amacrines occupent des

compartiments restreints à l'œil, alors que les cellules ganglionnaires envoient leurs axones vers différentes structures du cerveau. Si une réaction inflammatoire apparaît malgré des tests de sécurité précliniques, traiter un problème oculaire est plus facile que traiter plusieurs sites de projections intracérébraux. Associer l'expression de la protéine optogénétique à des signaux de localisation dendritique pourrait diminuer, mais non abolir sa présence dans les axones et donc restreindre la localisation de la réaction inflammatoire éventuelle. Les cellules bipolaires et les cônes de la périphérie sont alignés verticalement, alors que les axones des cellules ganglionnaires suivent des voies parallèles au plan de l'image. Si l'expression des outils optogénétiques est élevée dans l'axone des cellules ganglionnaires, elle pourrait être excitée directement, induisant la perte de la carte rétinotopique. Dans ce cas également, la localisation dendritique de ChR2 pourrait aider à prévenir l'excitation axonale. Le problème majeur d'une expression dans les cellules de la rétine interne, comme les cellules ganglionnaires, concerne la stimulation de la fovea. Du fait de l'organisation des cellules bipolaires et ganglionnaires déportées sur le côté de la fosse fovéale, ce qui introduit une perte de la rétinotopie, il n'est pas possible de stimuler avec une image spatialement uniforme. Le mode de translation spatiale de chaque pixel lumineux vers chaque cellule bipolaire ou fovéale est inconnu et pourrait varier d'un individu à un autre. Nous pensons donc que, dans la fovea, il faudrait réactiver les cônes subsistants. Les seuls éléments qui sont organisés en mosaïque bi-dimensionnelle sont les segments externes et, peut-être dans une moindre mesure, les segments internes des cônes. Les corps cellulaires des cônes occupent plusieurs couches. Si les segments externes et internes sont perdus, la résolution spatiale est limitée par le diamètre de ces corps cellulaires. D'où la prédiction intéressante que, jusqu'à ce qu'il ne reste qu'une seule couche de cônes, la résolution de la vision réacquise par l'expression de NpHR ne dépendra pas de l'importance de la perte des cônes : tous les corps cellulaires des cônes sont supposés avoir une résolution similaire, pourvu que les corps cellulaires de cônes disposés en colonnes les uns sur les autres échantillonnent normalement des pixels voisins les uns des autres.

Les stratégies envisageables aujourd'hui sont celles qui utilisent des promoteurs ubiquitaires pour exprimer des outils optogénétiques dans les cellules ganglionnaires et le ciblage des cônes dégénérés subsistants à l'aide de promoteurs photorécepteurs-spécifiques. Les sérotypes AAV disponibles combinés avec des promoteurs de cellules bipolaires *ON*-spécifiques ne semblent pas être suffisamment efficaces pour exprimer assez de protéines optogénétiques dans un nombre important de cellules

bipolaires humaines. Cependant ce domaine évolue rapidement et la mise au point de nouveaux vecteurs plus performants pourrait intervenir dans un avenir proche.

La rétine humaine *post-mortem* comme système modèle

Les règles habituelles pour le développement de thérapies nouvelles imposent le passage de petits modèles animaux (rats ou souris) à des tests de sécurité chez les primates, suivis d'essais cliniques. Dans le cas de la thérapie optogénétique, la spécificité et l'efficacité du promoteur vis-à-vis de la classe ou du type cellulaire choisi ont une importance critique. Il n'est pas possible de tester *in vivo* beaucoup de promoteurs différents chez les primates. Le développement récent d'un système modèle *in vitro*, à savoir la culture de rétine humaine *post-mortem*, permet l'exploration de l'expression génique à partir de vecteurs viraux (Busskamp *et al.*, 2010; Fradot *et al.*, 2011). Quoique l'accès viral à différents types cellulaires rétinien soit probablement différent *in vitro* et *in vivo*, la transduction de rétine humaine en culture permet de faire des comparaisons quantitatives de l'efficacité et de la spécificité de différents promoteurs. Par exemple, l'expression vigoureuse d'un marqueur dans un type cellulaire spécifique, ciblé à partir d'un promoteur mais pas d'un autre, semble arguer en faveur de l'utilisation *in vivo* du premier de ces deux promoteurs. En revanche, une expression dans plusieurs types cellulaires non désirés inclinera à continuer le criblage avant de mettre en œuvre des tests de sécurité *in vivo* chez les primates. La photosensibilité intrinsèque, mise en œuvre par les bâtonnets ou les cônes, ne peut être mesurée dans ces cultures, mais l'expression de NpHR ciblée sur les photorécepteurs humains a restauré les réponses à la lumière dans les cellules photoréceptrices. On ne sait pas encore si les cellules bipolaires ou ganglionnaires répondraient également à la lumière mais, si elles le faisaient, la culture de rétine humaine ouvrirait la voie pour étudier l'architecture fonctionnelle des circuits rétinien humains. Cette nouvelle approche *in vitro* présente un intérêt éthique évident pour la réduction de l'expérimentation *in vivo* chez les primates non-humains.

Les points critiques à examiner dans la thérapie optogénétique

Adaptation

Les intensités lumineuses du monde naturel qui parviennent à notre œil peuvent varier de 12 unités

logarithmiques au-dessus du seuil de vision humaine. Les photorécepteurs ajustent leur sensibilité sur 8 à 9 unités logarithmiques selon des processus complexes d'adaptation à la luminance moyenne. En revanche, les cellules rendues photosensibles par les protéines optogénétiques ne bénéficient pas de ces phénomènes d'adaptation et peuvent répondre dans des gammes fixes d'intensités lumineuses qui ne couvrent que 2 à 3 unités logarithmiques. En conséquence, indépendamment du type de photorécepteur artificiel, un dispositif externe sera nécessaire, comprenant un capteur d'information visuelle adaptable à l'éclairage moyen du monde visuel et un stimulateur visuel projetant cette information visuelle sur la rétine dans la gamme de sensibilité de la protéine optogénétique utilisée. Quand les cellules ganglionnaires résiduelles jouent le rôle de photorécepteurs, ce dispositif externe doit non seulement réaliser l'adaptation et la stimulation mais aussi le traitement de l'information visuelle réalisé par le circuit rétinien comme par exemple l'augmentation du contraste au bord des objets.

Sensibilité

La sensibilité lumineuse d'une cellule manipulée par optogénétique dépend de trois facteurs : le nombre de protéines optogénétiques exprimées dans la membrane, l'amplitude du courant produit par la capture d'un photon par un récepteur individuel et la sensibilité intrinsèque de la protéine à la lumière (Degenaar *et al.*, 2009). À l'heure actuelle, la sensibilité des cellules transduites est faible, et les cellules ne produisent de photoréponses que dans une gamme de luminance correspondant aux plus fortes luminances normalement perçues par les cônes (Bi *et al.*, 2006; Lagali *et al.*, 2008; Busskamp *et al.*, 2010). Le nombre de protéines exprimées peut être augmenté, par exemple en utilisant des promoteurs forts, des titres d'AAV élevés et des sérotypes d'AAV adaptés à une cellule déterminée. Nous n'avons pas connaissance, en particulier, de sérotypes AAV qui transduiraient efficacement les cellules bipolaires de la rétine.

De plus, la membrane limitante interne très épaisse à la surface de la rétine des primates pourrait agir comme une barrière contre la pénétration de vecteurs viraux lors d'une administration intra-vitréale (au moins pour le sérotype AAV 2, cf. Yin *et al.*, 2011). Cela pourrait expliquer l'absence d'expression des gènes introduits par thérapie génique dans les cellules ganglionnaires situées hors de la fovea; l'ablation chirurgicale de cette membrane pourrait donc être nécessaire. En ce qui concerne les canaux activés par la lumière (mais pas les pompes), leur sensibilité pourrait augmenter en faisant accroître le courant membranaire produit par chaque proton capturé par

modulation de la conductance du canal. Cet objectif n'a pas encore été réalisé à un degré significatif. Un autre moyen d'accroître la sensibilité à la lumière des cellules consiste à prolonger le temps d'ouverture du canal ionique (Berndt *et al.*, 2009). Toutefois, des temps d'ouverture rallongés augmentent également le temps nécessaire à la cellule pour stopper sa réponse à l'extinction du signal lumineux. Ce changement de la dynamique des réponses pourrait entraîner la perception d'images en queue de comète lors du mouvement d'un objet. Pour résoudre ce problème de sensibilité, Bamberg et coll. (Kleinlogel *et al.*, 2011) ont légèrement augmenté la perméabilité au calcium de la protéine ChR2, augmentant ainsi le nombre d'ions Ca^{2+} pénétrant dans la cellule par unité de temps, ce qui modifie le potentiel de surface des cellules et abaisse le seuil auquel elles génèrent des potentiels d'action. Cette nouvelle forme de ChR2, appelée CatCh, a les mêmes cinétiques rapides que ChR2 mais la cellule qui l'exprime devient 70 fois plus sensible à la lumière. CatCh est donc un bon candidat pour la stimulation des cellules ganglionnaires. La perméabilité au calcium accrue est également bénéfique pour la stimulation des cellules sans potentiels d'action mais à potentiels gradués, comme les cellules bipolaires de la rétine, parce que la libération du glutamate est déclenchée par le calcium. Quelle est la sensibilité réellement nécessaire, si un dispositif externe est de toute façon requis pour remplacer les phénomènes d'adaptation ? Une définition pratique de la sensibilité maximale, comme le suggèrent Degenaar *et al.* (2009) est la quantité de lumière sans danger pour les tissus oculaires et donc « la quantité limite de lumière permise pour l'irradiation de l'œil par les agents de régulation ». Notons que cette irradiation maximum permise dépend de la longueur d'onde, une irradiation plus forte étant autorisée aux longueurs d'onde les plus élevées. Par conséquent, les protéines optogénétiques ayant une sensibilité dans le rouge seraient à privilégier. Certains patients atteints de RP ont une photophobie pour la lumière vive ; il est important d'effectuer une pré-sélection de ces patients par une stimulation lumineuse dans le domaine d'intensité optogénétique prévu. On pourrait également recommander une gamme de sécurité ou seuil de sensibilité en dessous duquel la lumière ne serait pas susceptible de produire des réponses rétiniennes, ce seuil pourrait correspondre à une intensité très élevée mesurée à l'intérieur. Définir ce seuil de sensibilité pourrait servir de barrière de sécurité. En effet, si l'excitation rétinienne restaurée par optogénétique causait des migraines ou des vertiges, le port de lunettes de soleil à l'extérieur et l'absence du système d'amplification à l'intérieur préserverait le patient de toute activation des cellules. Cependant, nous sommes encore loin de ce seuil de sécurité et il est donc nécessaire d'augmenter

la sensibilité de tous les outils disponibles à l'heure actuelle. Finalement, du fait de la convergence de l'information visuelle, on peut espérer que la sensibilité augmentera selon le type de cellule stimulée, cette sensibilité étant meilleure des cellules ganglionnaires aux cellules bipolaires et finalement aux cônes.

Le réflexe pupillaire

Le diamètre de la pupille contrôle l'importance de l'intensité lumineuse qui arrive à la rétine. Le réflexe pupillaire est partiellement fonctionnel chez les patients atteints de RP, probablement parce que leurs cellules ganglionnaires contenant de la mélanopsine et donc intrinsèquement photosensibles fonctionnent et contrôlent toujours ce processus (Foster & Hankins, 2002). Le pic de sensibilité de la mélanopsine à 480 nm est analogue à celui de ChR2 ; on peut donc attendre une constriction pupillaire importante à cette longueur d'onde. L'utilisation de protéines optogénétiques sensibles dans le rouge accroîtrait donc la quantité de lumière pénétrant dans l'œil jusqu'à la rétine par suite d'une constriction pupillaire moins efficace.

Vision des couleurs

La rétine humaine a trois types de cônes qui, avec leur circuiterie visuelle, sont responsables de la perception des couleurs. Actuellement, les recherches sur la thérapie optogénétique utilisent une protéine unique pour restaurer la sensibilité à la lumière, sauf dans deux études au cours desquelles ChR2 et NpHR ont été co-exprimés (Zhang *et al.*, 2009 ; Greenberg *et al.*, 2011). Pour restaurer la perception des couleurs il faudrait introduire dans les cônes différentes protéines optogénétiques avec différentes sensibilités spectrales. Les progrès récents de la compréhension et du contrôle de la vision des couleurs chez les primates (Mancuso *et al.*, 2009), de même que des préparations *in vitro* de rétine humaine *post-mortem* (Fradot *et al.*, 2011), offrent des possibilités de recherche dans ces directions.

Domaine dynamique

L'état de la cellule modifiée par optogénétique pourrait avoir un effet majeur sur l'étendue dynamique de la photosensibilité acquise. Nous allons expliquer ce problème dans le contexte de la restauration de la photosensibilité des cônes. Chez les patients RP, le potentiel de membrane des cônes est inconnu et il pourrait varier suivant la déficience génique et la progression

de la maladie. Si le potentiel de membrane est très négatif, une hyperpolarisation supplémentaire avec NpHR peut conduire à une diminution très limitée de la quantité de neurotransmetteur libéré et, par conséquent, à une modification des pics de quelques cellules ganglionnaires seulement. Dépolariser le photorécepteur à l'obscurité par l'activation de ChR2 pourrait accroître significativement le différentiel lors de l'activation de NpHR pour une exposition à la lumière et ainsi augmenter la modulation par la lumière des niveaux de libération du neuromédiateur. Des formes de ChR2 qui peuvent être verrouillées en configuration ouverte, pendant quelques secondes à quelques minutes, par une illumination de fond bleue, pourraient contrôler finement le potentiel de repos des photorécepteurs à l'obscurité, tandis que la stimulation de NpHR avec de la lumière rouge pourrait permettre leur hyperpolarisation en condition d'éclairage. L'expression simultanée de NpHR et ChR2, en même temps qu'une stimulation inverse « dépolarisation/hyperpolarisation » avec de la lumière bleue ou rouge, pourrait donc améliorer la stimulation des cônes. De plus, mimer la dynamique des photorécepteurs de primates en mettant en œuvre un filtre temporel digital entre le signal lumineux entrant dans la lunette de stimulation et la lumière stimulante pourrait induire des réponses des cônes correspondant aux réponses normales.

Mouvements oculaires

La perte de la vision centrale est souvent associée à des mouvements oculaires exacerbés. La grande amplitude de ces mouvements désorganiserait les paradigmes de la simple stimulation par un système externe. Il est possible que la photosensibilité rétinienne retrouvée réduise les mouvements oculaires. Cependant il serait préférable, lors du choix des patients pour la thérapie, de tenir compte des mouvements et des problèmes potentiels dont ils pourraient être responsables.

Patients à vision centrale persistante

La RP est une maladie progressive et beaucoup de patients ont une vision centrale résiduelle utile pour la plus grande partie de leur vie (Jacobson *et al.*, 2010). Initialement, la thérapie optogénétique se focalisera probablement sur les patients légalement aveugles, dont la vision centrale est abolie ou non mesurable. Toutefois, lorsque la sécurité aura été confirmée, le développement de nouveaux outils pourrait ouvrir le traitement optogénétique à des patients qui ont encore une vision résiduelle. Des outils particulièrement passionnants seraient de nouveaux dérivés de NpHR excitables aux longueurs d'onde proches de l'infrarouge.

L'expression de NpHR n'est pas toxique pour les photorécepteurs murins de type sauvage et elle induit un gain de fonction (Busskamp *et al.*, 2010). Les opsines de cônes natives restent actives et une photosensibilité supplémentaire est induite aux plus grandes longueurs d'onde. Ces approches utilisant des récepteurs dont le potentiel se situe dans le proche infrarouge pourraient améliorer la vision des patients sans perturber leur capacité visuelle résiduelle.

Réponse immunitaire

Une variable, critique mais inconnue, est le point auquel les outils optogénétiques, exprimés à partir des AAVs, pourraient induire des réactions immunitaires. L'œil et le cerveau sont des sites immuno-protégés et le fait que, malgré la mise en œuvre d'outils optogénétiques par un certain nombre de groupes de recherche dans les yeux et les cerveaux de primates et de rongeurs, aucune réponse immunitaire forte n'ait été signalée est encourageant. Notons qu'au moins une protéine photosensible, la ménélopsine humaine, ne stimulerait probablement pas de réponse immune. Si la cinétique lente des réponses induites par la mélanopsine pouvait être augmentée par ingénierie, il s'agirait d'un outil très précieux sur le plan de l'immunité (Lin *et al.*, 2008). La sécurité de l'AAV2 pour les patients humains a été démontrée (Simonelli *et al.*, 2010). Toutefois les sérotypes plus puissants, par exemple AAV-7 et AAV-8, n'ont pas encore été testés en clinique. Les essais pré-cliniques devraient vérifier avec soin le potentiel immunogénique des différents outils optogénétiques, en combinaison avec différents sérotypes d'AAV. Il a été rapporté que l'expression génique des AAVs dure pendant au moins 1 an 1/2 chez l'Homme (Simonelli *et al.*, 2010), mais on ne sait pas combien de temps la sensibilité des protéines optogénétiques peut persister. Dans les essais pré-cliniques, il faudrait donc tester également la ré-injection des AAVs exprimant des protéines optogénétiques (Amado *et al.*, 2010). Les réactions immunitaires humaines peuvent être différentes de celles des autres primates. Par conséquent, la sécurité de l'expression des protéines optogénétiques sera un élément essentiel du transfert clinique de ces thérapies.

Références

- Amado D., Mingozzi F., Hui D., Bennicelli J.L., Wei Z., Chen Y., Bote E., Grant R.L., Golden J.A., Narfstrom K., Syed N.A., Orlin S.E., High K.A., Maguire A.M., Bennett J.F., Kirby M., Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness. *Sci Transl Med*, 2010, 2, 21ra16.

- Bainbridge J.W., Smith A.J., Barker S.S., Robbie S., Henderson R., Balagran K., Viswanathan A., Holder G.E., Stockman A., Tyler N., Petersen-Jones S., Bhattacharya S.S., Thrasher A.J., Fitzke F.W., Carter B.J., Rubin G.S., Moore A.T., Ali R.R., Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2008, 358, 2231–2239.
- Bamann C., Nagel G., Bamberg E., Microbial rhodopsins in the spotlight. *Curr Opin Neurobiol*, 2010, 20, 610–616.
- Berndt A., Yizhar O., Gunaydin L.A., Hegemann P., Deisseroth K., Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci*, 2009, 12, 229–234.
- Bi A., Cui J., Ma Y.P., Olshevskaya E., Pu M., Dizhoor A.M., Pan Z.H., Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 2006, 50, 23–33.
- Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K., Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, 8, 1263–1268.
- Busskamp V., Duebel J., Balya D., Fradot M., Viney T.J., Siebert S., Groner A.C., Cabuy E., Forster V., Seeliger M., Biel M., Humphries P., Paques M., Mohand-Said S., Trono D., Deisseroth K., Sahel J.A., Picaud S., Roska B., Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science*, 2010, 329, 413–417.
- Caporale N., Kolstad K.D., Lee T., Tochitsky I., Dalkara D., Trauner D., Kramer R., Dan Y., Isacoff E.Y., Flannery J.G., LiGluR restores visual responses in rodent models of inherited blindness. *Mol Ther*, 2011, 19, 1212–1219.
- Chader G.J., Weiland J., Humayun M.S., Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. *Prog Brain Res*, 2009, 175, 317–332.
- Cideciyan A.V., Aleman T.S., Boye S.L., Schwartz S.B., Kaushal S., Roman A.J., Pang J.J., Sumaroka A., Windsor E.A., Wilson J.M., Flotte T.R., Fishman G.A., Heon E., Stone E.M., Byrne B.J., Jacobson S.G., Hauswirth W.W., Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 15112–15117.
- Cremers F.P., van den Hurk J.A., den Hollander A.I., Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet*, 2002, 11, 1169–1176.
- Dahlmann-Noor A., Vijay S., Jayaram H., Limb A., Khaw P.T., Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve. *Can J Ophthalmol*, 2010, 45, 333–341.
- Degenaar P., Grossman N., Memon M.A., Burrone J., Dawson M., Drakakis E., Neil M., Nikolic K., Optobionic vision – a new genetically enhanced light on retinal prosthesis. *J Neural Eng*, 2009, 6, 035007.
- da Cruz L., Coley B.F., Dorn J., Merlini F., Filley E., Christopher P., Chen F.K., Wuyuru V., Sahel J., Stanga P., Humayun M., Greenberg R.J., Dagnelie G., The Argus II epiretinal prosthesis system allows letter and word reading and long-term function in patients with profound vision loss. *Brit J Ophthalmol*, 2013, 97, 632–636.
- de Vries S.H., Baylor D.A., An alternative pathway for signal flow from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 10658–10662.
- Doroudchi M.M., Greenberg K.P., Liu J., Silka K.A., Boyden E.S., Lockridge J.A., Arman A.C., Janani R., Boye S.E., Boye S.L., Gordon G.M., Matteo B.C., Sampath A.P., Hauswirth W.W., Horsager A., Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol Ther*, 2011, 19, 1220–1229.
- Farah N., Reutsky I., Shoham S., Patterned optical activation of retinal ganglion cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2007, 2007, 6368–6370.
- Farrar G.J., Kenna P.F., Humphries P., On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO J*, 2002, 21, 857–864.
- Fernandez-Sanchez L., Lax P., Pinilla I., Martin-Nieto J., Cuenca N., Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, 52, 4998–5008.
- Foster R.G., Hankins M.W., Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21, 507–527.
- Fradot M., Busskamp V., Forster V., Cronin T., Leveillard T., Bennett J., Sahel J.A., Roska B., Picaud S., Gene therapy in ophthalmology: validation on cultured retinal cells and explants from post-mortem human eyes. *Hum Gene Ther*, 2011, 22, 587–593.
- Frasson M., Sahel J.A., Fabre M., Simonutti M., Dreyfus H., Picaud S., Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med*, 1999a, 5, 1183–1187.
- Frasson M., Picaud S., Leveillard T., Simonutti M., Mohand-Said S., Dreyfus H., Hicks D., Sahel J., Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*, 1999b, 40, 2724–2734.
- Gollisch T., Meister M., Eye smarter than scientists believed: neural computations in circuits of the retina. *Neuron*, 2010, 65, 150–164.
- Greenberg K.P., Pham A., Werblin F.S., Differential targeting of optical neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism. *Neuron*, 2011, 69, 713–720.
- Hamel C., Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1, 40.
- Han X., Boyden E.S., Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One*, 2007, 2, e299.
- Hauswirth W.W., Aleman T.S., Kaushal S., Cideciyan A.V., Schwartz S.B., Wang L., Conlon T.J., Boye S.L., Flotte T.R., Byrne B.J., Jacobson S.G., Treatment of

- Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther*, 2008, 19, 979–990.
- Humayun M.S., Prince M., de Juan Jr. E., Barron Y., Moskowitz M., Klock I.B., Milam A.H., Morphometric analysis of the extramacular retina from post-mortem eyes with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40, 143–148.
- Humayun M.S., Dorn J.D., da Cruz L., Dagnelie G., Sahel J.A., Stanga P.E., Cideciyan A.V., Duncan J.L., Elliott D., Filley E., Ho A.C., Santos A., Safran A.B., Arditi A., Del Priore L.V., Greenberg R.J., Interim results from the international trial of Second Sight's visual prosthesis. *Ophthalmology*, 2012, 119, 779–788.
- Jacobson S.G., Cideciyan A.V., Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. *N Engl J Med*, 2010, 363, 1669–1671.
- Jacobson S.G., Roman A.J., Aleman T.S., Sumaroka A., Herrera W., Windsor E.A., Atkinson L.A., Schwartz S.B., Steinberg J.D., Cideciyan A.V., Normal central retinal function and structure preserved in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51, 1079–1085.
- Jones B.W., Marc R.E., Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res*, 2005, 81, 123–137.
- Kauper K., McGovern C., Sherman S., Heatherton P., Rapoza R., Stabila P., Dean B., Lee A., Borges S., Bouchard B., Tao W., Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53, 7484–7491.
- Kennan A., Aherne A., Humphries P., Light in retinitis pigmentosa. *Trends Genet*, 2005, 21, 103–110.
- Kleinlogel S., Feldbauer K., Dempski R.E., Fotis H., Wood P.G., Bamann C., Bamberg E., Ultra light sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci*, 2011, 14, 513–518.
- Koenekoop R.K., Why do cone photoreceptors die in rod-specific forms of retinal degenerations? *Ophthalmic Genet*, 2009, 30, 152–154.
- Lagali P.S., Balya D., Awatramani G.B., Munch T.A., Kim D.S., Busskamp V., Cepko C.L., Roska B., Light activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*, 2008, 11, 667–675.
- Leveillard T., Sahel J.A., Rod-derived cone viability factor for treating blinding diseases: from clinic to redox signaling. *Sci Transl Med*, 2010, 2, 26ps16.
- Leveillard T., Mohand-Said S., Lorentz O., Hicks D., Fintz A.C., Clerin E., Simonutti M., Forster V., Cavusoglu N., Chalmel F., Dolle P., Poch O., Lambrou G., Sahel J.A., Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet*, 2004, 36, 755–759.
- Lin B., Koizumi A., Tanaka N., Panda S., Masland R.H., Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 16009–16014.
- Lin B., Masland R.H., Strettoi E., Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice. *Exp Eye Res*, 2009, 88, 589–599.
- Maguire A.M., Simonelli F., Pierce E.A., Pugh Jr. E.N., Mingozzi F., Bennicelli J., Banfi S., Marshall K.A., Testa F., Surace E.M., Rossi S., Lyubarsky A., Arruda V.R., Konkle B., Stone E., Sun J., Jacobs J., Dell'Osso L., Hertle R., Ma J.X., Redmond T.M., Zhu X., Hauck B., Zelenia O., Shindler K.S., Maguire M.G., Wright J.F., Volpe N.J., McDonnell J.W., Auricchio A., High K.A., Bennett J., Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2008, 358, 2240–2248.
- Marc R.E., Jones B.W., Watt C.B., Strettoi E., Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22, 607–655.
- Mancuso K., Hauswirth W.W., Li Q., Connor T.B., Kuchenbecker J.A., Mauck M.C., Neitz J., Neitz M., Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates. *Nature*, 2009, 461, 784–787.
- Masland R.H., The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*, 2001, 4, 877–886.
- Matsuda T., Cepko C.L., Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 16–22.
- Miesenbock G., The optogenetic catechism. *Science*, 2009, 326, 395–399.
- Milam A.H., Li Z.Y., Fariss R.N., Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*, 1998, 17, 175–205.
- Mussolino C., Sanges D., Marrocco E., Bonetti C., Di Vicino U., Marigo V., Auricchio A., Meroni G., Surace E.M., Zinc-fingerbased transcriptional repression of rhodopsin in a model of dominant retinitis pigmentosa. *EMBO Mol Med*, 2011, 3, 118–128.
- Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., Bamberg E., Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 13940–13945.
- Nakazawa M., Ohguro H., Takeuchi K., Miyagawa Y., Ito T., Metoki T., Effect of nilvadipine on central visual field in retinitis pigmentosa: a 30-month clinical trial. *Ophthalmologica*, 2011, 225, 120–126.
- Punzo C., Kornacker K., Cepko C.L., Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci*, 2009, 12, 44–52.
- Roska B., Werblin F., Vertical interactions across ten parallel, stacked representations in the mammalian retina. *Nature*, 2001, 410, 583–587.
- Sahel J.A., Mohand-Said S., Leveillard T., Hicks D., Picaud S., Dreyfus H., Rod-cone interdependence: implications for therapy of photoreceptor cell diseases. *Prog Brain Res*, 2001, 131, 649–661.
- Sancho-Pelluz J., Arango-Gonzalez B., Kustermann S., Romero F.J., van Veen T., Zrenner E., Ekström P., Paquet-Durand F., Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol*, 2008, 38, 253–269.

- Schobert B., Lanyi J.K., Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem*, 1982, 257, 10306–10313.
- Sieving P.A., Caruso R.C., Tao W., Coleman H.R., Thompson D.J., Fullmer K.R., Bush R.A., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 3896–3901.
- Simonelli F., Maguire A.M., Testa F., Pierce E.A., Mingozzi F., Bencicelli J.L., Rossi S., Marshall K., Banfi S., Surace E.M., Sun J., Redmond T.M., Zhu X., Shindler K.S., Ying G.S., Ziviello C., Acerra C., Wright J.F., McDonnell J.W., High K.A., Bennett J., Auricchio A., Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther*, 2010, 18, 643–650.
- Smith A.J., Bainbridge J.W., Ali R.R., Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends Genet*, 2009, 25, 156–165.
- Soucy E., Wang Y., Nirenberg S., Nathans J., Meister M., A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron*, 1998, 21, 481–493.
- Thyagarajan S., van Wyk M., Lehmann K., Lowel S., Feng G., Wässle H., Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci*, 2010, 30, 8745–8758.
- Tomita H., Sugano E., Fukazawa Y., Isago H., Sugiyama Y., Hiroi T., Ishizuka T., Mushiaki H., Kato M., Hirabayashi M., Shigemoto R., Yawo H., Tamai M., Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the thy-1.2 promoter. *PLoS One*, 2009, 4, e7679.
- Tomita H., Sugano E., Isago H., Hiroi T., Wang Z., Ohta E., Tamai M., Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp Eye Res*, 2010, 90, 429–436.
- Vugler A.A., Progress toward the maintenance and repair of degenerating retinal circuitry. *Retina*, 2010, 30, 983–1001.
- Wässle H., Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5, 747–757.
- Wright A.F., Chakarova C.F., Abd El-Aziz M.M., Bhattacharya S.S., Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet*, 2010, 11, 273–284.
- Yin L., Greenberg K., Hunter J.J., Dalkara D., Kolstad K.D., Masella B.D., Wolfe R., Visel M., Stone D., Libby R.T., Diloreto D., Jr., Schaffer D., Flannery J., Williams D.R., Merigan W.H., Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52, 2775–2783.
- Zhang F., Aravanis A.M., Adamantidis A., de Lecea L., Deisseroth K., Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat Rev Neurosci*, 2007a, 8, 577–581.
- Zhang F., Wang L.P., Brauner M., Liewald J.F., Kay K., Watzke N., Wood P.G., Bamberg E., Nagel G., Gottschalk A., Deisseroth K., Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 2007b, 446, 633–639.
- Zhang Y., Ivanova E., Bi A., Pan Z.H., Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration. *J Neurosci*, 2009, 29, 9186–9196.
- Zrenner E., Will retinal implants restore vision? *Science*, 2002, 295, 1022–1025.
- Zrenner E., Bartz-Schmidt K.U., Benav H., Besch D., Bruckmann A., Gabel V.P., Gekeler F., Greppmaier U., Harscher A., Kibbel S., Koch J., Kusnyerik A., Peters T., Stingl K., Sachs H., Stett A., Szurman P., Wilhelm B., Wilke R., Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proc Biol Sci*, 2011, 278, 1489–1497.