



**HAL**  
open science

# Stratégies génétiques de restauration visuelle corticale chez le rat et le primate non-humain

Matthieu Provansal

► **To cite this version:**

Matthieu Provansal. Stratégies génétiques de restauration visuelle corticale chez le rat et le primate non-humain. Organes des sens. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT: 2022SORUS539 . tel-04810232

**HAL Id: tel-04810232**

**<https://theses.hal.science/tel-04810232v1>**

Submitted on 29 Nov 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## Thèse de doctorat en Neurosciences

Sorbonne Université – Faculté des Sciences

École doctorale Cerveau – Cognition – Comportement (ED 158)

# STRATEGIES GENETIQUES DE RESTAURATION VISUELLE CORTICALE CHEZ LE RAT ET LE PRIMATE NON-HUMAIN

Présentée par Matthieu Provansal

Dirigée par Serge Picaud et co-encadrée par Fabrice Arcizet et Grégory Gauvain

Institut de la Vision

Équipe “ Transmission de l’information visuelle : codage et restauration visuelle ”

En collaboration avec l’Institut du Cerveau et l’Institut Langevin.

Soutenue publiquement le 28/11/2022 devant un jury composé de :

Isabelle Férézou  
Yves Trotter  
Sophie Pezet  
Frédéric Chavane  
Serge Picaud

Rapportrice  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Directeur de thèse



---

## RÉSUMÉ

---

### STRATEGIES GENETIQUES DE RESTAURATION VISUELLE CORTICALE CHEZ LE RAT ET LE PRIMATE NON-HUMAIN

La stimulation corticale du cortex visual primaire (V1) est une thérapie prometteuse pour restaurer la vision de patients aveugles dans le cas de pathologies entraînant une dégénérescence du nerf optique. Des études précédentes ont démontré l'efficacité des prothèses corticales électriques pour restaurer la vision de formes, mais ces prothèses reposent sur l'utilisation invasive d'électrodes résultant en une perte progressive de la vision restaurée. L'optogénétique et la sonogénétique sont des techniques permettant de rendre sensibles les neurones à des ondes respectivement lumineuses et ultrasonores. Ces thérapies corticales pourraient être des solutions alternatives car elles permettraient de stimuler V1 depuis sa surface. Pour les valider, il est nécessaire de sélectionner un vecteur viral conduisant à une expression efficace du transgène au sein des neurones ciblés, s'assurer que les stimulations de l'opsine ou du canal mécanosensible permettent une activation sélective de l'aire ciblée et démontrer par une tâche comportementale que la stimulation induit une véritable vision.

Sur des rongeurs, j'ai dans un premier temps établi la preuve de concept de la stratégie optogénétique de restauration visuelle. Les résultats obtenus par imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) et enregistrements unitaires multi-électrodes montrent que la stimulation chez le rat anesthésié en surface de V1 exprimant l'opsine ChrimsonR sensible à la lumière rouge conduit à l'activation neuronale jusque dans les couches corticales profondes, même à faible irradiance. De plus, l'activité initiée au sein de V1 se propage aux autres aires visuelles.

En parallèle, j'ai participé à apporter la preuve de concept de la stratégie sonogénétique chez le rongeur. Suite à l'expression d'un canal mécanosensible, la stimulation ultrasonore de V1 induit une activation neuronale avec une résolution spatiale (400  $\mu$ m) et temporelle (10 ms, 13 Hz) compatible avec la restauration visuelle. Les latences des réponses corticales sont inférieures à celles des réponses visuelles naturelles. De même la latence de la réponse comportementale associée à la stimulation sonogénétique du cortex visuel est inférieure à celle induite par la perception visuelle.

Dans la perspective d'une application clinique, j'ai amorcé la caractérisation d'aires corticales de primates non-humains. Ce travail abordé par une approche d'électrophysiologie

et d'imagerie ultrasonore m'a amené à identifier la contribution des activités neuronales unitaires au sein des variations de volume sanguin cérébral (CBV). Par une approche innovante, nous avons réalisé des co-enregistrements chez deux animaux au sein des cortex visuel primaire et fronto-médians lors de tâches comportementales en suivant en temps réel de l'insertion d'une électrode dans le cerveau. Nos résultats montrent également que les activités unitaires et les variations de CBV ne sont statistiquement pas corrélées pendant les périodes d'activité spontanées mais le deviennent lors des tâches comportementales. La composante des variations de CBV dues à l'activité unitaire isolée est inférieure à  $1 \text{ mm}^3$ . Enfin, j'ai réalisé des travaux préparatoires pour l'application de la thérapie sonogénétique chez le primate non-humain. J'ai ainsi validé l'efficacité du vecteur viral AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato chez deux animaux. De plus, j'ai caractérisé par imagerie ultrasonore la rétino-topie de la chambre d'enregistrement d'un premier animal. En parallèle, nous avons entraîné cet animal ainsi que deux autres singes à réaliser une tâche de détection de cibles visuelles. Ces résultats ont déterminé où injecter le vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato dans une région du cortex visuelle pertinente pour la validation physiologique et comportementale de la thérapie sonogénétique.

En résumé, l'ensemble de mes travaux ouvre une perspective de validation physiologique et comportementale de la thérapie corticale sonogénétique chez le primate non-humain.

Mots-clés : restauration visuelle, optogénétique, sonogénétique, primate non-humain, rongeur, imagerie fonctionnelle ultrasonore.

---

## ABSTRACT

---

### GENETIC APPROACHES FOR CORTICAL VISUAL RESTORATION IN RATS AND NON-HUMAN PRIMATES

Cortical stimulation of the primary visual cortex (V1) is a promising therapy for restoring vision in the case of pathologies resulting in optic nerve degeneration. Previous studies have demonstrated the efficiency of electrical cortical prostheses in restoring shape vision, but these prostheses rely on the invasive use of electrodes resulting in a gradual loss of restored vision. Optogenetics and sonogenetics are techniques that render neurons sensitive to light and ultrasound waves respectively. These cortical therapies could be alternative solutions because they would stimulate V1 from its surface. To validate them, it is necessary to select a viral vector leading to an effective expression of the transgene within the targeted neurons, to ensure that the stimulations of the opsin or the mechanosensitive channel allow a selective activation of the targeted area and to demonstrate by a behavioral task that stimulation induces true vision.

I first established the proof of concept of the optogenetic strategy of visual restoration in rodents. The results obtained by functional ultrasound imaging (fUS) and multi-electrode unit recordings show that surface stimulation of V1 in anesthetized rats expressing the red-shifted opsin ChrimsonR leads to neuronal activation down to the deep cortical layers, even at low irradiance. Moreover, the activity initiated within V1 spreads to other visual areas.

In parallel, I participated in demonstrating the proof of concept of the sonogenetic strategy in rodents. V1 stimulation induces neuronal activation with a spatial (400  $\mu\text{m}$ ) and temporal (10 ms, 13 Hz) resolution consistent with visual restoration. The latencies of the sonogenetic responses are also lower than those following a light stimulus, which is consistent with direct cortical activation. Similarly, the latency of the behavioral response associated with a sonogenetic stimulation of the visual cortex is lower than when induced by visual perception.

Besides, in the perspective of a clinical application of the sonogenetic strategy, I started the characterization of cortical areas under the recording chamber of non-human primates using electrophysiological recordings and fUS imaging. This led me to identify the contribution of single-unit activities within the variations of cerebral blood volume (CBV). We performed co-recordings in two animals within the primary visual and fronto-median cortices

during behavioral tasks. To this aim, we developed an innovative device allowing the combination of fUS imaging and electrophysiological recordings, and online tracking of the insertion of an electrode into the brain. Our results also show that single-unit activities and CBV variations are not statistically correlated during periods of spontaneous activity but become so during behavioral tasks. The component of CBV variations due to single-unit activities is less than 1 mm<sup>3</sup>.

Finally, I carried out preparatory work for the application of sonogenetic therapy in non-human primates. I validated the efficiency of the AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato viral vector in two animals. In addition, I characterized V1 retinotopy in the recording chamber of a first animal using fUS imaging. In parallel, we trained this animal as well as two other monkeys to perform a detection task of visual targets. Using this set of results, we determined for this first animal a region of the visual cortex that is relevant for the physiological and behavioral validation of sonogenetic therapy, in which we injected the AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato viral vector.

Altogether, this work opens a perspective of physiological and behavioral validation of sonogenetic cortical therapy in non-human primates.

Key words: visual restoration, optogenetics, sonogenetics, non-human primates, rodents, functional ultrasound imaging.

---

## REMERCIEMENTS

---

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements à Isabelle Férézou, Sophie Pezet, Yves Trotter et Frédéric Chavane pour me faire l'honneur de constituer mon jury de thèse et d'évaluer le travail réalisé pendant ces années. Je suis particulièrement reconnaissant envers Isabelle Férézou et Yves Trotter d'avoir accepté de tenir le rôle de rapporteurs pour ce manuscrit.

Je remercie d'autre part Brice Bathellier et Frédéric Chavane pour avoir participé à mes comités de suivi de thèse. Les discussions que nous avons pu échanger lors de ces occasions ont été très bénéfiques pour la poursuite de mon doctorat et m'ont permis d'avoir un recul et une confiance bienvenus sur mon travail.

Je souhaite évidemment adresser un grand merci à Serge Picaud, Fabrice Arcizet et Grégory Gauvain pour avoir été le trio dirigeant de mes recherches pendant ces années à l'Institut de la Vision. Merci à vous d'avoir toujours été disponibles pour répondre à mes questions et de m'avoir apporté les conseils dont j'avais besoin.

Grégory m'a accueilli dès mon stage de Master 2 et guidé au sein des sous-groupes de l'équipe S8 et des projets qui m'apparaissaient assez tentaculaires. Je te suis reconnaissant d'avoir nourri avec enthousiasme ma culture scientifique sur la physiologie du système visuel et de m'avoir éclairé sur l'optogénétique. Par la suite, Fabrice m'a pris sous son aile et m'a initié à la pêche aux neurones de primates (a.k.a., les « zozos ») et aux expériences de comportement. Merci de m'avoir appliqué ta rigueur aussi bien dans la pratique expérimentale que dans le raisonnement, et de m'avoir transmis les joies de l'illustration scientifique ! Enfin, je remercie Serge pour avoir dirigé ma thèse mais aussi l'ensemble des acteurs de ce projet en installant une relation de confiance. Tu as toujours pu proposer de nouvelles pistes scientifiques à explorer, souvent par de simples onomatopées et / ou mimes donc seul toi a le secret. Merci de m'avoir appuyé tant scientifiquement qu'humainement pour avancer !

Les co-enregistrements d'activités sur le primate n'auraient pas vu le jour sans l'aide de Pierre Pouget, qui a également été toujours présent pour vérifier le moindre détail ou les analyses effectuées. Merci pour ton bouillonnement permanent d'idées qui a permis d'ouvrir mon champ de perspectives sur le travail réalisé.

Je dois à Julien Claron toute ma maîtrise de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore chez le primate ainsi que le partage de cette étude de fUS et d'électrophysiologie. Merci à toi pour ta pédagogie concernant l'analyse des données ainsi que ton soutien pendant ces dernières années.

Plus généralement, je souhaite aussi remercier l'Institut Langevin et particulièrement Mickaël Tanter et Thomas Deffieux pour leur expertise concernant l'imagerie fUS. Cette collaboration avec l'Institut de la Vision est à l'origine de nombreux projets scientifiques, dont l'étude de co-enregistrement citée plus tôt ainsi que le développement de la sonogénétique.

Je souhaite un immense merci aux autres doctorants et doctorantes avec qui j'ai pu partager ma thèse et eu le plaisir de travailler : Sara Cadoni, Diep Nguyen, Julie Zhang, Ignacio Alcalá. Merci pour tout le soutien dont vous m'avez fait part, les rires partagés et les escapades (plus ou moins studieuses...) en congrès passées ensemble. Merci également à Kévin Blaize pour ses précieux conseils sur l'imagerie ultrasonore et Anna Verschueren pour ta disponibilité et ton aide sur le doctorat en général. Merci également à Louiza Arouche et Leyna Boucherit d'avoir égayé le partage de notre (petit) bureau.

Merci aux autres membres de l'équipe S8 avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pour ces projets. Je pense notamment à Antoine Chaffiol pour les discussions tant scientifiques que musicales pointues (et les improvisations sur instruments de musique de fortune), Corentin Joffrois pour la passion commune des semi-marathons et les réparations d'urgence de vélo (ce qui a permis d'économiser un temps précieux dans les trajets IDV – ICM) ou de set-up d'électrophysiologie, et Guillaume Labernède pour la joie partagée des productions virales et celle non partagée du traitement des coupes histologiques (merci pour tout ce travail !). Merci à Ruben Goulet et Emma Burban d'avoir pris en charge nos « zozos » et d'avoir partagé les joies et les galères de l'expérimentation sur primates. Merci également à Amine Kaci, Antoine Rizkallah, William Deschamps, Manon Valet. Merci à l'ensemble des personnes de l'équipe S8. Merci également à Camille Robert et Mélissa Desrosiers pour votre aide concernant les vecteurs viraux.

Je voudrais adresser mes remerciements aux personnels des animaleries ainsi que des SBEA rongeur de l'IDV et primate de l'ICM pour votre soutien, vos précieux conseils et le grand soin avec lequel vous avez apporté aux animaux. Merci plus particulièrement à Julie Dégardin, Manuel Simonutti, Quénot César, Elena Brazhnikova, Mylène Levant, Morgane Weissenburger, Estelle Chavret-Reculon, Lucile Aubrée et Bénédicte Daboval. Merci

également à Maxime Roustan, Pauline Perez, Elodie Lévy, Thomas Orset, Rafik Arab et Julie Royo pour m'avoir apporté un support bienvenu dans l'animalerie primate.

Enfin, un immense merci à mes proches et ma famille pour votre soutien constant qui a été vital dans les moments difficiles, et pour avoir partagé avec vous les plus beaux moments de ces dernières années.

---

# TABLE DES MATIERES

---

Introduction générale.....	17
1.1. Description du système visuel.....	18
1.1.1. Structure générale.....	18
1.1.2. Genèse et traitement du signal visuel au sein de la rétine .....	19
1.1.2.1. Les photorécepteurs convertissent le signal lumineux en amplitude d'hyperpolarisation lors de la phototransduction .....	20
1.1.2.2. Les cellules bipolaires intègrent les informations provenant de différents photorécepteurs et établissent un premier filtre du signal visuel .....	22
1.1.2.3. Les cellules ganglionnaires convertissent le signal en fréquences de potentiels d'action et filtrent plus finement les propriétés du signal visuel.....	23
1.1.3. Le colliculus supérieur code des informations visuelles responsables de comportements primaires.....	25
1.1.4. Le corps genouillé latéral organise rétinotopiquement les informations visuelles .....	26
1.1.5. Cortex visuel primaire intègre les informations visuelles géniculées et permet le codage de nouvelles propriétés du signal visuel.....	29
1.1.5.1. Structure générale.....	29
1.1.5.2. Organisation des projections géniculées au sein de V1 .....	29
1.1.5.3. V1 intègre les informations visuelles au sein de colonnes fonctionnelles spécialisées .....	30
1.1.5.4. Les couches 5 et 6 exercent un contrôle sur les structures visuelles centrales profondes.....	32
1.1.6. Les aires visuelles corticales supérieures codent des paramètres visuels plus complexes au sein des trajets d'information ventral et dorsal.....	33
1.1.7. Pathologies entraînant une déficience visuelle.....	34
1.1.7.1. Cataractes et autres atteintes du cristallin .....	34
1.1.7.2. Dégénérescence des photorécepteurs longs .....	35
1.1.7.3. Pathologies responsables d'une dégénérescence du nerf optique .....	36
1.1.7.4. Déficiences centrales de la vision.....	36
1.2. Peut-on recréer un signal visuel par génération de courants électriques exogènes ? .....	37
1.2.1. Prothèses visuelles électriques .....	37
1.2.1.1. Implants rétiniens.....	38



1.2.1.2.	Prothèses corticales.....	40
1.2.2.	Optogénétique .....	44
1.2.2.1.	Principe.....	44
1.2.2.2.	L'opsine excitatrice ChrimsonR sensible à la lumière rouge .....	45
1.2.2.3.	Importance du vecteur d'expression.....	47
1.2.2.4.	Thérapie optogénétique rétinienne .....	49
1.2.2.4.1.	Au sein des cellules ganglionnaires .....	49
1.2.2.4.2.	En amont des cellules ganglionnaires .....	51
1.2.2.5.	Thérapie optogénétique corticale .....	51
1.2.2.5.1.	Investigation optogénétique du fonctionnement du cortex visuel primaire chez le primate non-humain.....	51
1.2.2.5.2.	Application de la stimulation optogénétique de V1 à la thérapie corticale .....	52
1.2.3.	Contrôle de l'activité neuronale par émission d'ondes ultrasonores .....	55
1.2.3.1.	Les ondes ultrasonores peuvent moduler l'activité neuronale.....	55
1.2.3.2.	La sonogénétique permet d'exercer un contrôle ultrasonore plus fin de l'activité neuronale.....	57
1.2.3.3.	Le canal mécanosensible Mscl.....	58
1.3.	Comment valider physiologiquement l'efficacité de ces stratégies de restauration visuelle ?.....	60
1.3.1.	Bref aperçu des techniques de lecture de l'activité cérébrale.....	60
1.3.2.	Activités mesurées par les enregistrements électrophysiologiques.....	61
1.3.3.	L'imagerie ultrasonore fonctionnelle .....	62
1.3.3.1.	L'imagerie conventionnelle par ultrason.....	62
1.3.3.2.	L'imagerie ultrasonore ultrarapide .....	63
1.3.3.3.	Application de l'effet Doppler pour obtenir une imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) .....	63
1.3.3.4.	Applications de l'imagerie fUS dans la littérature.....	66
1.3.4.	Quel est la relation entre les signaux électrophysiologique et neurovasculaire ?.....	66
1.3.4.1.	La contribution des activités électrophysiologiques au sein du signal BOLD demeure incertaine dans la littérature .....	67
1.3.4.2.	Apport de l'imagerie fUS .....	67
1.4.	Objectifs de la thèse.....	68
	Résultats .....	69
2.1.	Chapitre 1 : preuve de concept pour la thérapie optogénétique au niveau cortical sur le rat.....	70
2.1.1.	Résumé .....	70

2.1.2.	Article scientifique.....	72
2.2.	Chapitre 2 : stimulation sonogénétique du cerveau à une résolution spatiotemporelle adaptée à la restauration visuelle .....	87
2.2.1.	Résumé .....	87
2.2.2.	Article scientifique.....	89
2.3.	Chapitre 3 : co-variations du CBV et de la décharge de potentiels d'action de neurones isolés chez le primate non-humain .....	135
2.3.1.	Résumé .....	135
2.3.2.	Article scientifique.....	136
2.4.	Chapitre 4 : développement de la stratégie sonogénétique de restauration visuelle corticale chez le primate non-humain .....	165
2.4.1.	Introduction.....	165
2.4.2.	Résultats .....	166
2.4.2.1.	Test du vecteur d'expression.....	166
2.4.2.2.	Tâche de détection .....	169
2.4.2.3.	Rétinotopie du cortex visuel.....	179
2.4.2.4.	Etablissement d'un plan d'injection du vecteur viral .....	183
2.4.3.	Conclusion .....	184
2.4.4.	Méthodes .....	185
2.4.4.1.	Animaux utilisés.....	185
2.4.4.2.	Injection du vecteur AA9-7m8-CaMKII-Mscl-G22S-tdTomato .....	185
2.4.4.3.	Préparation des coupes histologiques de cortex visuels primaires de primates non-humains.....	187
2.4.4.4.	Immunomarquages .....	187
2.4.4.5.	Acquisition des images histologiques.....	188
2.4.4.6.	Sortie des animaux entraînés à réaliser une tâche comportementale .....	188
2.4.4.7.	Tâche de détection .....	188
2.4.4.8.	Tâche de fixation passive (rétinotopie) .....	189
2.4.4.9.	Traitement des données comportementales.....	190
2.4.4.10.	Enregistrements d'imagerie ultrasonore .....	190
2.4.4.11.	Traitement des images ultrasonores.....	190
2.4.4.12.	Obtention du centre des champs récepteurs des pixels.....	191
	Conclusion et discussion générale .....	193
3.1.	Synthèse des principaux résultats.....	194
3.2.	Sélection d'une stimulation corticale : la thérapie optogénétique ?.....	195

3.2.1.	Activation directe ou indirecte des neurones des couches profondes .....	195
3.2.2.	Dispositif optique .....	196
3.2.3.	Spécificité de l'activation optogénétique.....	197
3.3.	Sélection d'une stimulation corticale : la thérapie sonogénétique ?.....	197
3.3.1.	Rappel des principaux résultats .....	197
3.3.2.	Comparaison des propriétés des activateurs optogénétiques et sonogénétiques.....	198
3.3.3.	Vers un contrôle et une lecture entièrement ultrasonore de l'activité neuronale ?..	201
3.4.	Relation entre les activités unitaires et les variations de CBV chez le primate non- humain.....	201
3.4.1.	Organisation spatiale des variations de CBV prédites par l'activité unitaire .....	202
3.4.2.	Contribution de différentes activités neuronales aux variations de CBV .....	203
3.4.3.	Différence de HRF entre les aires corticales.....	203
3.5.	Perspectives pour une application d'une thérapie corticale sonogénétique chez l'Homme.....	204
3.5.1.	Quelle zone d'expression du canal mécanosensible doit-on obtenir, et comment ?.	204
3.5.2.	Utilisation de l'imagerie fUS pour guider les injections .....	207
3.5.3.	Développement d'une interface machine / cerveau ultrasonore pour une stimulation efficace du cortex visuel primaire .....	208
	Références.....	211
	Annexe.....	226

---

## TABLE DES FIGURES

---

Figure 1. Anatomies comparées des systèmes visuels de la souris et du primate .....	19
Figure 2. Organisation cellulaire de la rétine chez la souris et le primate. ....	20
Figure 3. Cascade de phototransduction au sein des bâtonnets chez les Vertébrés.....	21
Figure 4. Cellules bipolaires à champs récepteurs ON et OFF.. ....	23
Figure 5. Les cellules ganglionnaires codent des champs récepteurs aux propriétés différentes.....	24
Figure 6. Organisation fonctionnelle du corps genouillé latéral chez le rongeur. ....	27
Figure 7. Organisation fonctionnelle du corps genouillé latéral chez le primate. ....	28
Figure 8. Organisation anatomique et fonctionnelle de V1 chez le primate. ....	30
Figure 9. Emergence de la sélectivité d'orientation et des hypercolonnes fonctionnelles (chez le primate uniquement). ....	32
Figure 10. Répartition des principales causes de cécité dans le monde par tranches d'âge. ....	34
Figure 11. Implants rétiniens.....	39
Figure 12. Perception de formes induites par une prothèse corticale électrique chez le primate non-humain.....	42
Figure 13. Les trois principales classes d'opsines permettent un contrôle optique de l'activité neuronale.. ....	44
Figure 14. Propriétés de Chrimson et de son variant plus rapide ChrimsonR. ....	46
Figure 15. Structure d'un AAV sauvage et d'un vecteur AAV utilisé comme vecteur d'expression. ....	48
Figure 16. Exemples de stimulations optogénétiques de V1 entraînant une perception visuelle adaptée à une restauration visuelle corticale.....	54
Figure 17. Différents mécanismes sous-tendent la modulation ultrasonore de l'activité neuronale. .	57
Figure 18. Structure et propriétés fonctionnelles du canal Mscl. ....	59
Figure 19. Loi de Snell-Descartes.....	62
Figure 20. Imagerie fonctionnelle Doppler conventionnelle et ultrarapide. ....	65
Figure 21. Expression de Mscl-G22S au sein des neurones de V1 obtenue chez le singe A. ....	167
Figure 22. Localisation de l'encre de Chine injectée chez le singe Z.....	168
Figure 23. Expression de Mscl-G22S au sein des neurones de V1 obtenue chez le singe E.....	169
Figure 24. Performances du singe L pour une séance exemple de la tâche de détection de cibles visuelles. ....	172
Figure 25. Performances du singe L pour la tâche de détection de cibles visuelles. ....	174
Figure 26. Performances du singe F pour la tâche de détection de cibles visuelles. ....	176
Figure 27. Performances du singe U pour la tâche de détection de cibles visuelles. ....	178
Figure 28. Méthode pour l'obtention de la carte d'excentricités préférées pour une séance d'enregistrement.....	180
Figure 29. Méthode pour l'obtention de la carte d'angles polaires préférés pour une séance d'enregistrement.....	181
Figure 30. Cartes rétinotopiques du cortex visuel primaire situé sous la chambre d'enregistrement du singe L.....	183
Figure 31. Plan d'injection du plan d'imagerie I chez le singe L.....	184
Figure 32. Illustration conceptuelle de prothèse visuelle ultrasonore.. ....	209

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

**AD** : adénovirus

**AAV** : Adeno-Associated Virus (virus adéno-associé)

**BOLD** : Blood Oxygenation Level-Dependent (niveau d'oxygénation du sang)

**CBV** : Cerebral Blood Volume (volume cérébral sanguin)

**CGL** : Corps Genouillé Latéral

**DVA** : Degree of Visual Angle (degré d'angle visuel)

**EcoG** : électrocorticographie

**EEG** : électroencéphalographie

**fUS imaging** : functional UltraSound imaging (imagerie fonctionnelle ultrasonore)

**HRF** : Hemodynamic Response Function (fonction de réponse hémodynamique)

**HSV** : Herpes Simplex Virus (virus de l'herpès simple)

**IRMf** : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

**IT** : Inferior Temporal area (aire inférieure temporale)

**ITR** : Inverted Terminal Repeats (répétitions terminales inversées)

**LFP** : Local Field Potentials (potentiels de champs locaux)

**LIP** : Lateral IntraParietal area (aire intrapariétale latérale)

**LV** : lentivirus

**MEG** : magnétoencéphalographie

**MscL** : canal mécanosensible à grande conductance

**MT** : Middle Temporal area (aire temporale moyenne)

**OCT** : Optic Coherence Tomography (tomographie en cohérence optique)

**SC** : Superior Colliculus (colliculus supérieur)

**SEF** : Supplementary Eye Field

**V1 à V4** : cortex visuel primaire à quaternaire

---

## AVANT-PROPOS

---

Soigner la baisse ou la perte de vision est un objectif médical très ancien comme en témoignent des traces de procédures ophtalmologiques datant de plusieurs siècles avant J.C. dans l'Égypte, la Grèce ou l'Inde antiques. Le papyrus Ebers constitue un exemple d'ancien traité médical dans lequel des maladies oculaires et leurs remèdes sont décrits. Les progrès techniques accumulés au cours des siècles suivants ont permis par la suite de raffiner les procédures chirurgicales. Cependant, ce n'est qu'après la moitié du XX<sup>ème</sup> siècle que les travaux fondateurs de Brindley et Lewin ont prouvé la possibilité de restaurer un signal visuel artificiel par la stimulation électrique du cortex visuel chez des patients non-voyants. Depuis, l'augmentation des connaissances dans plusieurs domaines scientifiques (génétique, imagerie fonctionnelle à haute résolution spatio-temporelle, développement des interfaces cerveau – machine) ont permis de développer différentes stratégies de restauration visuelle qui agissent à différents niveaux du système visuel.

De nombreux travaux ont démontré l'efficacité des stratégies de restauration visuelle rétinienne dont certaines sont en clinique aujourd'hui. Ces approches sont adaptées à des types de cécité dues à une perte de fonctionnalité de la rétine. Cependant, d'autres pathologies agissant sur le nerf optique entraînent une perte du lien entre la rétine et le cerveau. Une stratégie de restauration visuelle adaptée à ces pathologies doit donc obligatoirement cibler des structures visuelles cérébrales comme le cortex visuel primaire.

Dans ce manuscrit, nous établissons chez le rat les preuves de concept de deux stratégies génétiques de restauration visuelle corticale : la thérapie optogénétique et la thérapie sonogénétique. Ces dernières permettent de contrôler l'activité de neurones génétiquement modifiés exprimant des protéines respectivement photosensibles et mécanosensibles par l'application de stimulations lumineuses et ultrasonores. L'application de ces stratégies pour une thérapie de restauration visuelle nécessite d'enregistrer les activations neuronales consécutives à ces stimulations. Ceci permet d'ajuster ces dernières de façon à restaurer au mieux le signal visuel tel qu'il est présent au sein du cortex visuel primaire. Pour ce faire, nous avons utilisé les enregistrements électrophysiologiques ainsi que l'imagerie fonctionnelle ultrasonore. Nous avons de plus déterminé la relation entre les signaux détectés par ces deux méthodes d'enregistrement chez le primate non humain. Le choix de ce modèle animal est nécessaire afin d'obtenir une validation préclinique d'une thérapie de restauration visuelle. Enfin, nous avons effectué des travaux préparatoires pour apporter des preuves physiologiques et comportementales de l'efficacité de la stimulation sonogénétique du cortex visuel chez le primate non-humain.

En résumé, l'ensemble de ces travaux ouvre une perspective de validation de la thérapie corticale sonogénétique de restauration visuelle chez le primate non-humain.

---

## INTRODUCTION GENERALE

---

Nous détaillerons dans cette partie le fonctionnement du système visuel chez le rongeur et le primate non-humain avant de présenter les grands ensembles de pathologies qui entraînent des formes de déficiences visuelles voire de cécité. Par la suite, seront présentées les stratégies actuelles de restauration visuelle. Ces stratégies nécessitent de lire l'activité neuronale générées par les stimulations afin de valider l'efficacité de la restauration visuelle. Dans ces travaux, l'activité neuronale est détectée par enregistrements électrophysiologiques et par imagerie ultrasonore fonctionnelle. La dernière partie de cette introduction détaillera plus précisément les caractéristiques principales de ces deux techniques et leur complémentarité.

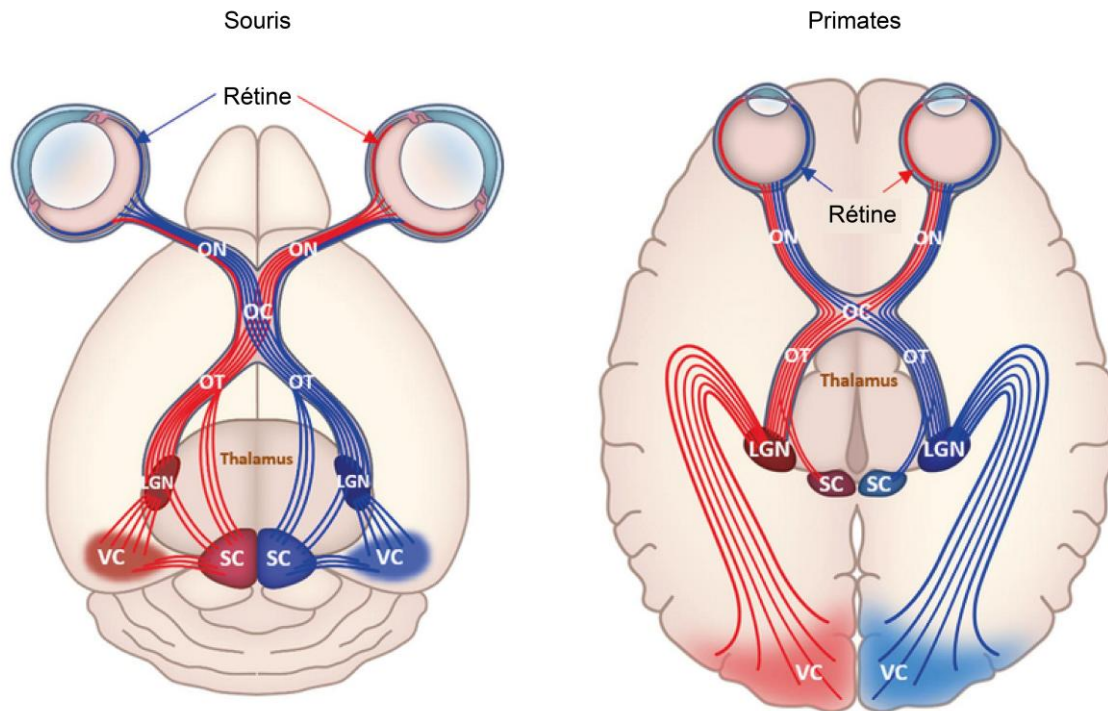


### 1.1.1. Description du système visuel

Le développement d'une stratégie de restauration visuelle consiste à recréer un signal visuel artificiel reproduisant au mieux les caractéristiques du signal naturel. Il est donc nécessaire de comprendre dans un premier temps comment ce dernier est traité au sein du système visuel. La partie suivante détaille le traitement du signal visuel chez le rongeur (souris et rat) ainsi que chez le primate non-humain, les deux modèles animaux utilisés dans ces travaux de thèse.

### 1.1.2. Structure générale

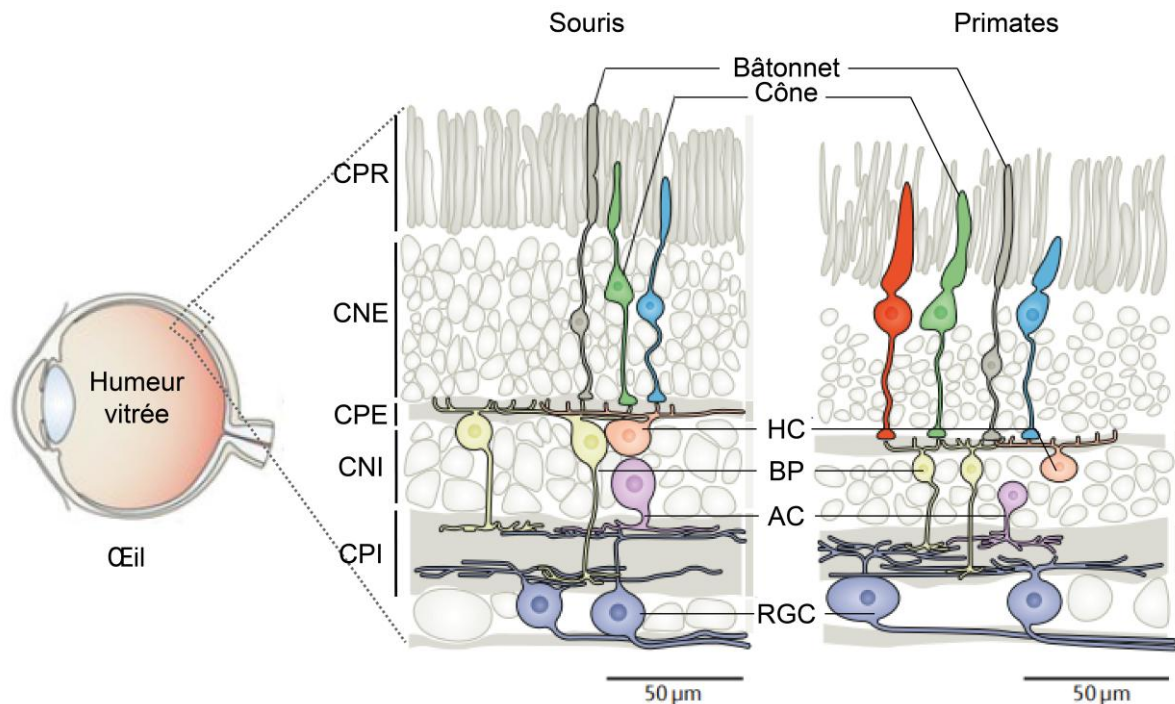
Chez les Mammifères, le signal lumineux est d'abord intégré au niveau de l'œil au sein de la rétine (Fig. 1). Le signal se propage ensuite via le nerf optique vers deux principales structures : le corps genouillé latéral (CGL, LGN en anglais) au sein du thalamus et le colliculus supérieur. Chez la souris, la majorité des projections rétiniennes ciblent ce dernier, alors que c'est l'inverse chez les primates. Le signal intégré au niveau du CGL est ensuite essentiellement projeté vers le cortex visuel puis vers d'autres aires corticales, où il génère une perception visuelle. Les informations des hémisphères visuels droite et gauche sont traitées respectivement par les hémisphères gauche et droite. Chez le rongeur, les structures visuelles d'un hémisphère traitent très majoritairement les informations provenant de l'œil contralatéral uniquement. En revanche chez le primate, un hémisphère reçoit des signaux des deux yeux.



**Figure 1. Anatomies comparées des systèmes visuels de la souris et du primate.** ON : nerf optique. OC : chiasma optique. OT : tract optique. LGN : corps genouillé latéral. SC : colliculus supérieur. VC : cortex visuel. Modifié d'après Deng et al., 2019. Les informations rétinienne convergeant vers le cortex visuel gauche sont représentées en rouge, celles convergeant vers le cortex visuel droit sont représentées en bleu.

### 1.1.3. Genèse et traitement du signal visuel au sein de la rétine

La rétine est l'organe sensoriel qui convertit le signal lumineux en fréquences de potentiels d'action. Elle est située au fond de l'œil entre l'humeur vitrée et l'épithélium pigmentaire rétinien. Les photorécepteurs, cellules bipolaires et cellules ganglionnaires traitent séquentiellement le signal lumineux après qu'il ait atteint l'œil (Fig. 2). Deux classes d'interneurones majoritairement inhibiteurs, les cellules horizontales et les cellules amacrines, assurent une régulation et complexification du traitement du signal rétinien.

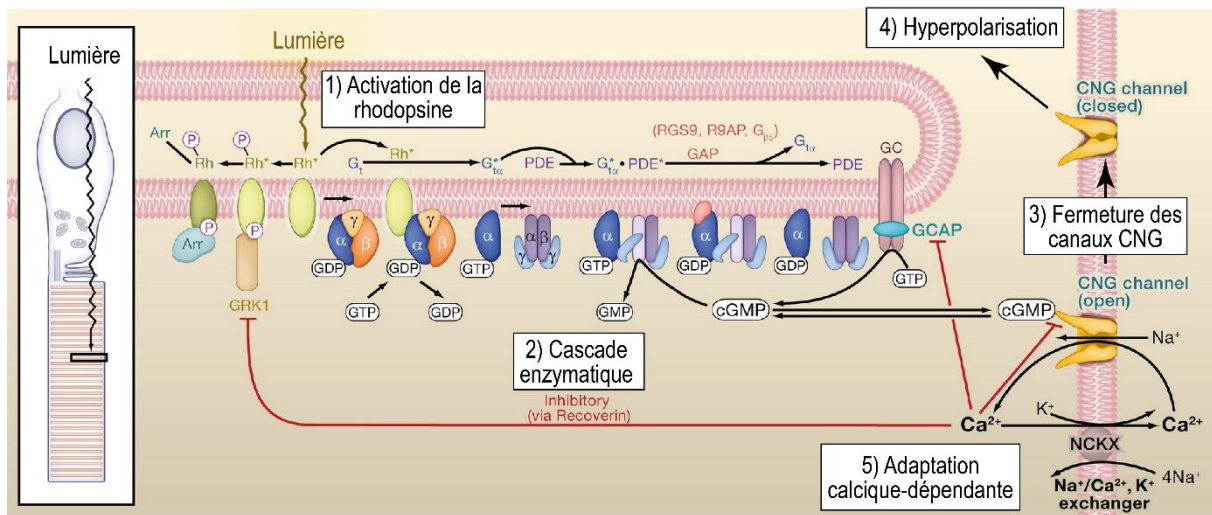


**Figure 2. Organisation cellulaire de la rétine chez la souris et le primate.** La souris ne possède que deux types de cônes sensibles aux longueurs d'onde bleu et verte, à l'inverse des Primates qui en possèdent trois sensibles aux longueurs d'onde bleu, verte et rouge. CPR : couche des photorécepteurs. CNE : couche nucléaire externe. CPE : couche plexiforme externe. CNI : couche nucléaire interne. CPI : couche plexiforme interne. HC : cellules horizontales. BP : cellules bipolaires. AC : cellules amacrines. RGC : cellules ganglionnaires. Modifié d'après Baden et al., 2020 et Byrne et al., 2020.

### 1.1.3.1. Les photorécepteurs convertissent le signal lumineux en amplitude d'hyperpolarisation lors de la phototransduction

La centaine de millions de photorécepteurs est immédiatement située vers l'intérieur de l'œil depuis l'épithélium pigmentaire rétinien, au sein de la couche nucléaire externe. Ce sont des cellules polarisées constituées d'un segment externe, siège de la conversion du signal lumineux en signal électrique, relié au segment interne et sa terminaison synaptique qui contacte les cellules bipolaires ainsi que les cellules horizontales (Kandel et al. 2021). Au repos, les canaux ioniques exprimés au niveau du segment externe sont ouverts et maintiennent une dépolarisation de la cellule responsable de la libération de glutamate au niveau de la terminaison synaptique. Lorsqu'une stimulation lumineuse intervient, les photons entraînent l'activation d'un récepteur membranaire appelé opsine, provoquant une cascade enzymatique dont la conséquence est la fermeture des canaux ioniques responsables de la dépolarisation de la membrane plasmique. Plusieurs étapes d'amplification du signal ont lieu lors de ce processus : une opsine initie en parallèle plusieurs cascades enzymatiques qui elles-mêmes sont responsables de l'hydrolyse de

plusieurs GTP (guanosine triphosphate) en GMPc (guanosine monophosphate cyclique), le nucléotide cyclique entraînant la fermeture des canaux sensibles au GMPc (canaux CNG). Ce processus que l'on appelle « cascade de phototransduction » (Fig. 3) hyperpolarise la cellule et réduit voire stoppe la libération de glutamate au niveau de la terminaison synaptique. L'amplitude de cette hyperpolarisation permet de coder l'intensité du signal lumineux.



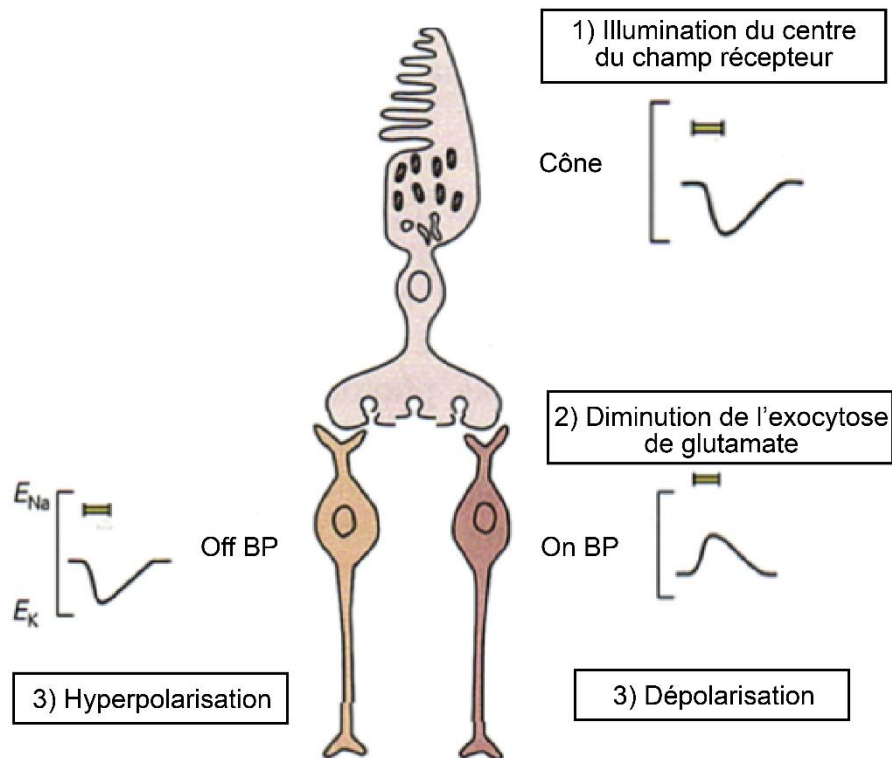
**Figure 3. Cascade de phototransduction au sein des bâtonnets chez les Vertébrés.** Au niveau du segment externe (encadré de gauche), la lumière active la rhodopsine membranaire (Rh). Il s'ensuit une cascade enzymatique ayant pour conséquence la fermeture de canaux sensibles aux nucléotides cycliques (canaux CNG) ce qui hyperpolarise la cellule. Des mécanismes calciques-dépendants permettent de limiter la durée de la phototransduction. Modifié d'après Yau et al., 2009.

Il existe deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes, ces derniers étant vingt fois moins nombreux que les bâtonnets chez l'Homme. L'opsine exprimée par les bâtonnets (la rhodopsine) a une efficacité d'activation maximale pour des luminances faibles, et saturent à des luminances élevées (Baden et al. 2018). La phototransduction consécutive à cette activation est par ailleurs plus amplifiée au sein des bâtonnets que chez les cônes. De plus, les bâtonnets expriment un plus grand nombre de copies d'opsines que les cônes. Ces propriétés font que ce sont les bâtonnets qui assurent le traitement visuel lors de faibles luminances (vision scotopique). A l'inverse, les cônes expriment un nombre plus réduit d'opsines dont les efficacités d'activation sont maximales pour des luminances plus élevées. La phototransduction est d'ailleurs moins amplifiée chez ce type cellulaire. De plus, il existe différentes classes de cônes dont les opsines ont des spectres d'excitation centrés autour d'une longueur d'onde spécifique. Les cônes assurent ainsi une vision photopique et la base du traitement des couleurs. Il existe deux types de cônes chez les rongeurs (S et M, respectivement spécifiques d'ondes courtes (bleu) et moyennes (vert)) avec l'addition des

cônes L chez les primates (Seabrook et al. 2017) pour les ondes longues (rouge) (S, M et L, spécifiques des ondes longues) (Fig. 2). Enfin, la distribution des deux types de photorécepteurs n'est pas homogène. Chez les primates, les bâtonnets sont exclus de la fovéa, la zone centrale de la rétine qui est située au centre du champ visuel (Kandel et al. 2021). Dans cette région, les ondes lumineuses ont directement accès aux photorécepteurs du fait de l'inclinaison locale des autres types cellulaires situés dans les couches plus internes et subissent donc le moins de phénomènes d'absorption ou de distorsion. De plus, l'activation des cônes suite à une stimulation lumineuse possède une plus grande résolution temporelle que les bâtonnets. D'autre part, au niveau de la fovéa, le signal d'un seul cône est transmis en sortie de rétine à deux cellules ganglionnaires rétinienne : cette divergence de la connectivité amplifie le signal contrairement aux zones périphériques de la rétine où il y a une convergence de l'information. Ces propriétés ont pour conséquence une plus grande acuité visuelle au niveau de la fovéa.

#### **1.1.3.2. Les cellules bipolaires intègrent les informations provenant de différents photorécepteurs et établissent un premier filtre du signal visuel**

Les noyaux des cellules bipolaires se situent au niveau de la couche nucléaire interne. Elles intègrent dans leurs dendrites les signaux des photorécepteurs et des cellules horizontales au niveau de la couche plexiforme externe. Leur terminaison synaptique située au niveau de la couche plexiforme interne contacte les cellules ganglionnaires ainsi que les cellules amacrines (Kandel et al. 2021). Il existe de nombreux sous-types de cellules bipolaires (Euler et al. 2014) (treize chez la souris), définis selon leurs profils moléculaires, leur morphologie et l'architecture du réseau de cellules connectées dont elles font partie. La conséquence est que chaque sous-type a des propriétés spécifiques dans son traitement du signal lumineux. L'ensemble de ces sous-types cellulaires assure ainsi un filtrage du signal au sein de différents canaux d'information spécifiques. C'est par exemple le cas du codage des champs récepteurs.



**Figure 4. Cellules bipolaires à champs récepteurs ON et OFF.** BP : cellule bipolaire. Modifié d'après Kandel et al., 2009.

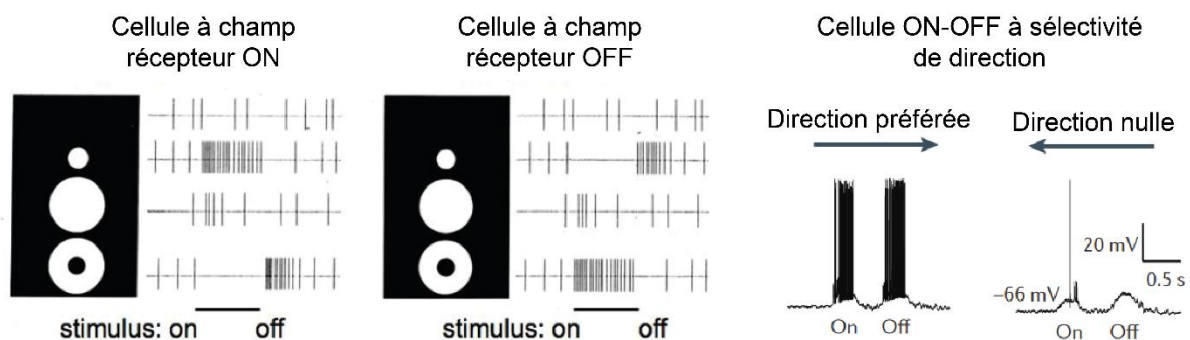
Chaque cellule bipolaire possède un champ récepteur, qui correspond à la zone du champ visuel dont elle intègre les informations. Le champ récepteur d'une cellule bipolaire est donc défini par le nombre de photorécepteurs qui la contactent ainsi que leur distribution spatiale au sein de la rétine. Il existe deux types de champs récepteurs (et donc deux types de cellules bipolaires) : ON et OFF (Kandel et al. 2021). Chaque photorécepteur contacte ces deux types de cellules (Fig. 4). Les cellules bipolaires ON expriment des récepteurs métabotropiques au glutamate qui inversent le signal et dont l'activation entraîne une hyperpolarisation. Les cellules bipolaires OFF expriment des récepteurs ionotropiques au glutamate qui entraînent une dépolarisation en réponse à leur activation. De part cette propriété, les cellules bipolaires ON et OFF répondent donc de manière opposée. Enfin, le signal des cellules bipolaires est influencé par l'activité des cellules horizontales inhibitrices qui assurent une connexion horizontale entre les cellules bipolaires.

### 1.1.3.3. Les cellules ganglionnaires convertissent le signal en fréquences de potentiels d'action et filtrent plus finement les propriétés du signal visuel



Les cellules ganglionnaires constituent le dernier site de l'intégration du signal visuel au sein de la rétine (Kandel et al. 2021). Elles reçoivent les signaux des cellules bipolaires et amacrines dans leurs dendrites au niveau de la couche plexiforme interne. Leur activation conduit à la dépolarisation de la membrane plasmique et, puisqu'elles expriment la machinerie moléculaire nécessaire, à la génération de potentiels d'action. Il s'agit du premier stade de l'intégration du signal visuel à partir duquel ce dernier est codé non plus en amplitudes de dépolarisation mais en fréquences de potentiels d'action. Les cellules ganglionnaires possèdent de longs axones qui convergent au niveau du disque optique au sein de la rétine puis se regroupent en formant le nerf optique.

Comme pour les cellules bipolaires, il existe différents sous-types de cellules ganglionnaires (Masland 2012b) (une quarantaine chez le rongeur) qui sont définis par leurs profils moléculaires ainsi que par l'architecture du réseau d'information qui les contactent (autrement dit, la nature et le nombre des cellules bipolaires et cellules amacrines (Masland 2012a) qui établissent une synapse avec chaque cellule ganglionnaire). Ceci permet d'établir un filtre supplémentaire des propriétés du signal lumineux. Chaque type de cellule ganglionnaire est donc spécifique d'une information visuelle codée (couleur, mouvement...). Ainsi, s'il existe comme pour les cellules bipolaires des cellules ganglionnaires ON et OFF, la diversité des microcircuits connectant les cellules ganglionnaires permet de coder de nouveaux paramètres, comme des champs récepteurs ON-OFF (ce sous-type de cellules ganglionnaires décharge lors de l'apparition et de la disparition du stimulus visuel). Chez la souris, un autre exemple de cette émergence de nouvelles propriétés du signal concerne les cellules ganglionnaires à sélectivité de direction (Vaney, Sivyer, and Taylor 2012) (Fig. 5).



**Figure 5. Les cellules ganglionnaires codent des champs récepteurs aux propriétés différentes.** Panels de gauche : effet de la stimulation de sous-parties du champ récepteur de cellules ganglionnaires ON ou OFF sur le nombre de potentiels d'action. Panel de droite : chez la souris, certaines cellules ganglionnaires possèdent des champs récepteurs aux propriétés plus complexes qui agissent différemment sur le potentiel membranaire. Modifié d'après Vaney et al., 2012.

Enfin chez le primate, les 17 (Nassi and Callaway 2009)) sous-types de cellules ganglionnaires peuvent être regroupés en deux catégories principales (Edward M Callaway 2005). Les cellules parasols ont des arbres dendritiques étendues couvrant des champs récepteurs larges. Elles sont donc sensibles à des fréquences spatiales basses. Elles sont de plus achromatiques et sensibles aux variations rapides de luminance. Elles forment le support de la détection des propriétés générales du signal visuel, des contrastes et des mouvements. A l'inverse, les cellules naines (midget) sont plus nombreuses, possèdent des arbres dendritiques et des champs récepteurs plus petits ce qui leur confère une sensibilité aux hautes fréquences spatiales. Différents sous-types spécifiques d'une longueur d'onde existe. Elles sont donc impliquées dans la perception de couleurs et assurent une acuité visuelle élevée et la détection de détails fins. En revanche, elles possèdent une résolution temporelle moins élevées que les cellules parasols. Au sein de la macula chez le primate, chaque cône transmet l'information à deux cellules ganglionnaires.

#### **1.1.4. Le colliculus supérieur code des informations visuelles responsables de comportements primaires**

Chez le rongeur, une écrasante majorité (environ 90%) des axones ganglionnaires projettent vers le colliculus supérieur (SC) (Ellis et al. 2016) . Ces contacts sont organisés en une rétinotopie, c'est-à-dire une organisation spatiale des cellules du SC en fonction de la portion du champ visuel pour laquelle elles sont préférentiellement activées. La partie dorsale du SC représente les projections de l'œil contralatéral entier (Dräger and Hubel 1976). La partie ventrale à l'inverse représente aussi la partie ventro-temporale de l'œil ipsilatéral (Xu et al. 2011). La majorité des cellules du SC chez le rongeur sont impliquées dans des circuits supports de comportements défensifs (« freezing » et fuite) (Shang et al. 2015; Wei et al. 2015; Zhao, Liu, and Cang 2014; Sans-Dublanc et al. 2021; Farrow et al. 2019) ou prédateurs (Hoy, Bishop, and Niell 2019) (captures de proie). L'importance biologique de tels comportements explique la prépondérance des projections rétino-colliculaires chez le rongeur. Enfin, de récents travaux ont démontré l'existence d'une sélectivité à l'orientation au sein du colliculus chez la souris (Ahmadlou, Zweifel, and Heimel 2018; Feinberg and Meister 2015). En revanche, la présence de colonnes de sélectivité directionnelles n'a pas été démontrée (H. Chen et al. 2021).

Chez le primate, les projections rétino-tectales sont beaucoup plus minoritaires (10%) (Seabrook et al. 2017). Des études ont montré que chez cette espèce, le SC est constitutif de circuits neuronaux impliqués dans des fonctions motrices (Wurtz and Albano 1980) (exécution de saccades) ou dans l'attention (Krauzlis, Lovejoy, and Zénon 2013).

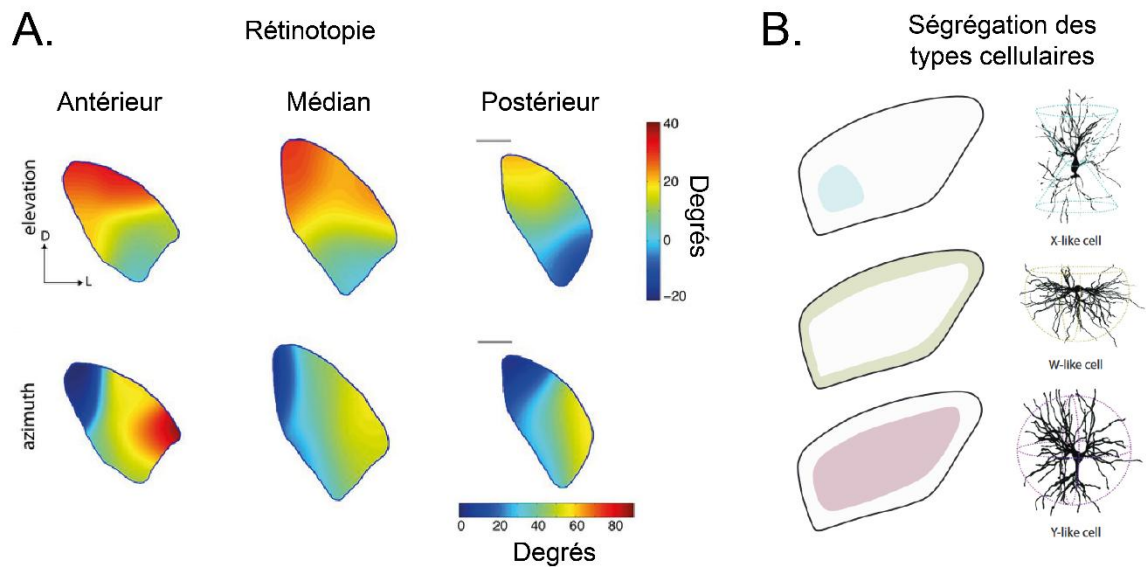


Chez ces deux groupes d'espèces, une partie des neurones du SC contacte le thalamus visuel (Seabrook et al. 2017). La sortie de ce circuit permet d'effectuer un contrôle de l'activité du corps genouillé latéral.

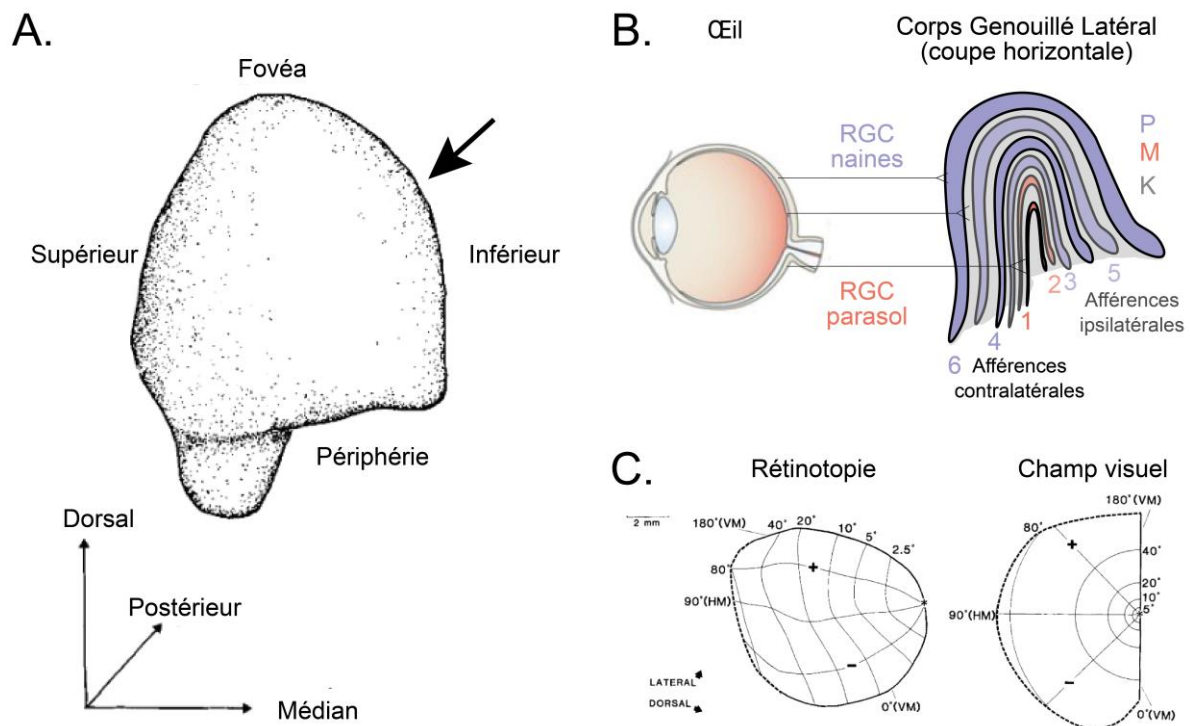
### **1.1.5. Le corps genouillé latéral organise rétinotopiquement les informations visuelles**

Les axones des cellules ganglionnaires excitatrices projettent au sein du corps genouillé latéral (CGL), un noyau profond du cerveau.

Chez le rongeur, ces projections sont minoritaires parmi les afférences des cellules ganglionnaires (30 à 40% (Seabrook et al. 2017)) et sont presque exclusivement des collatérales des projections ciblant le colliculus supérieur. Chaque corps genouillé latéral reçoit majoritairement les afférences de l'œil contralatéral, mais une partie plus dorso-médiane reçoit localement des afférences ipsilatérales (Seabrook et al. 2017). De plus, bien qu'aucune ségrégation cytoarchitectonique ne soit présente au sein du CGL chez le rongeur (contrairement aux primates), il existe tout de même une régionalisation au sein du CGL des afférences selon le sous-type de cellule ganglionnaire. Chacune de ces zones spécifiques est organisée de façon rétinotopique (Fig. 6). Certains travaux montrent que le champ visuel bas chez la souris est légèrement surreprésenté au sein de cette rétinotopie. D'autre part, il existe différents sous-types au sein des cellules receveuses des projections rétiniennes, qui sont différenciés selon des critères anatomiques (Krahe et al. 2011). Il semble que les cellules W reçoivent préférentiellement les projections des cellules ganglionnaires à sélectivité de direction ON-OFF, et que les cellules X et Y sont majoritairement contactées par les cellules OFF non directionnellement sélectives. Ces sous-types sont organisés spatialement au sein du CGL : les cellules W sont localisées dans le pourtour du CGL alors que les cellules X et Y constituent le cœur de cette structure. Enfin, la convergence des projections rétiniennes sur ces cellules receveuses est encore un domaine d'investigation, certaines cellules recevant un nombre limité (1 à 5) d'afférences codant une propriété identique alors que d'autres sont contactées par près de vingt cellules ganglionnaires codant des paramètres distincts (Hammer et al. 2015).



A l'inverse, le CGL des primates présente une organisation cytoarchitectonique en six couches distinctes (Fig. 7). Les couches 1 et 2 sont dites magnocellulaires (M) et sont contactées par les cellules ganglionnaires parasols. Les couches 3 à 6 sont dites parvocellulaires (P) et sont contactées par les cellules ganglionnaires naines. Elles constituent environ 80% des cellules du CGL. Entre ces couches sont localisées les couches dites koniocellulaires dont les caractéristiques ne sont pas encore totalement élucidées. Certaines études suggèrent que ces cellules sont spécifiques aux longueurs d'onde courtes (bleu) et qu'elles sont sensibles à de grands champs récepteurs. Contrairement aux rongeurs, les couches 1, 4 et 6 sont principalement contactées par les afférences contralatérales alors que les couches 2, 3 et 5 reçoivent principalement des projections ipsilatérales. Toutes les couches ont une organisation en rétinotopie et sont alignées les unes par rapport aux autres, de sorte qu'un point dans le champ visuel possède une ligne de projection entre ces six couches. Néanmoins, cette ligne de projection n'est pas respectée pour certaines grandes excentricités, les couches 4 et 5 ayant une carte rétinotopique réduite aux excentricités inférieures à 20° (Connolly and Van Essen 1984).



**Figure 7. Organisation fonctionnelle du corps genouillé latéral chez le primate. A.** Anatomie tridimensionnelle du CGL et ségrégation spatiale des afférences rétiniennes. La flèche indique l'axe de symétrie des couches représentées sur la section horizontale en B. **B.** Organisation des six couches et des inter-couches en voies fonctionnelles parallèles parvocellulaires (P), magnocellulaires (M) et koniocellulaires (K). Les afférences rétiniennes de ces voies sont cellules-spécifiques. Chacune des six couches (P) et (M) présente une spécificité monoculaire propre ainsi qu'une rétinotopie alignée par rapport aux couches. RGC : cellules ganglionnaires rétiniennes. **C.** Carte rétinotopique de la couche 6. Modifié d'après Connolly & Van Essen, 1984.

Enfin chez les deux groupes d'espèces décrits ci-dessus, de nombreux interneurons inhibiteurs sont présents au sein du CGL et permettent d'affiner le filtrage des informations propagées depuis la rétine. De plus, de nombreux neurones de la couche 6 du cortex visuel primaire exercent aussi un rétrocontrôle de l'information visuelle du CGL, soit par contact direct avec les cellules du CGL, ou indirectement via contact avec les neurones du noyau réticulaire qui est une structure thalamique voisine du CGL (Briggs and Usrey 2011). Les cellules du CGL reçoivent autant de contacts corticaux que d'afférences rétiniennes (Guillery 1969; Erişir, Van Horn, and Sherman 1997), ce qui indique l'importance fonctionnelle de ce rétrocontrôle. Une conséquence de ces cellules sur le traitement de l'information visuelle est qu'elles permettent d'accentuer les champs récepteurs des cellules du CGL (Briggs and Usrey 2008).

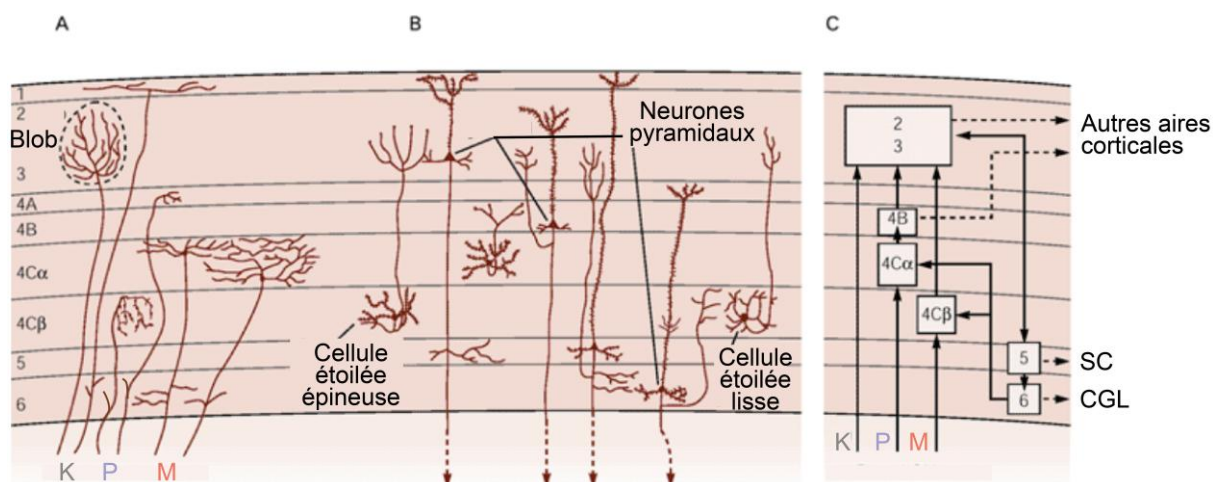
## **1.1.6. Cortex visuel primaire intègre les informations visuelles géniculées et permet le codage de nouvelles propriétés du signal visuel**

### **1.1.6.1. Structure générale**

Le cortex visuel primaire (V1) est situé dans la partie occipitale du cerveau et est organisé en six couches (Kandel et al. 2021). La dominance oculaire au sein de V1 diffère selon les espèces. Chez le rongeur, une partie plus médiane est strictement monoculaire et spécifique de l'œil contralatéral. Une zone plus latérale reçoit des informations binoculaires. Chez le primate non-humain, les deux hémisphères sont binoculaires mais possèdent des sélectivités locales qui sont organisées en colonnes de dominances oculaires. Cependant, chez ces deux groupes d'espèces, chaque hémisphère code les informations relatives à l'hémi-champ visuel contralatéral. De plus, V1 est comme le CGL organisé selon une rétinotopie au sein de laquelle les informations fovéolaires sont surreprésentées (Wässle et al. 1990).

### **1.1.6.2. Organisation des projections géniculées au sein de V1**

La couche 4 est le site majoritaire où projettent les cellules excitatrices du CGL recevant les afférences rétinienne. Chez le rongeur, il existe une ségrégation des afférences du CGL en fonction de leurs types cellulaires. Les cellules X et Y du cœur du CGL projettent par exemple majoritairement au sein de la couche 4 en établissant des collatérales au sein des couches 5 et 6. Les cellules W présentes dans le pourtour du CGL contactent à l'inverse les cellules de la couche 2-3. Chez le primate, la couche 4 est elle-même divisée en sous-couches (4A, 4B, 4C $\alpha$  et 4C $\beta$ ) au sein desquelles les projections géniculo-corticales sont spatialement ségréguées selon le type cellulaire, assurant une ségrégation spatiale et fonctionnelle des propriétés du stimulus visuel (Fig. 8). Les cellules M et P du CGL projettent vers les couches 4C $\alpha$  et 4C $\beta$ , respectivement, où elles contactent les cellules étoilées épineuses excitatrices parmi lesquelles on trouve les cellules simples. Les cellules M et P projettent aussi plus minoritairement des collatérales au sein de la couche 6, et au sein de la couche 4A pour les cellules P seulement. En revanche les cellules K projettent directement au sein des couches 1 et 2-3 où leurs contacts avec les neurones excitateurs pyramidaux sont regroupés en structures appelées blobs. Ces trois voies demeurent ainsi spatialement ségréguées dans V1.



**Figure 8. Organisation anatomique et fonctionnelle de V1 chez le primate.** Les voies koniocellulaires (K), parvocellulaires (P) et magnocellulaires (M) ségrégent sont traités en flux parallèles d'information. SC : colliculus supérieur. CGL : corps genouillé latéral. Modifié d'après Kandel et al., 2009.

### 1.1.6.3. V1 intègre les informations visuelles au sein de colonnes fonctionnelles spécialisées

Chez les primates, les cellules simples de la couche 4C contactées par les projections géniculées possèdent des champs récepteurs (ON ou OFF) qui présentent une sélectivité d'orientation. La géométrie du champ récepteur d'une cellule simple s'explique par la somme des champs récepteurs circulaires des cellules du CGL qui la contactent, la superposition des centres de ces champs récepteurs permettant de tracer l'orientation sélective de la cellule (Fig. 9, A).

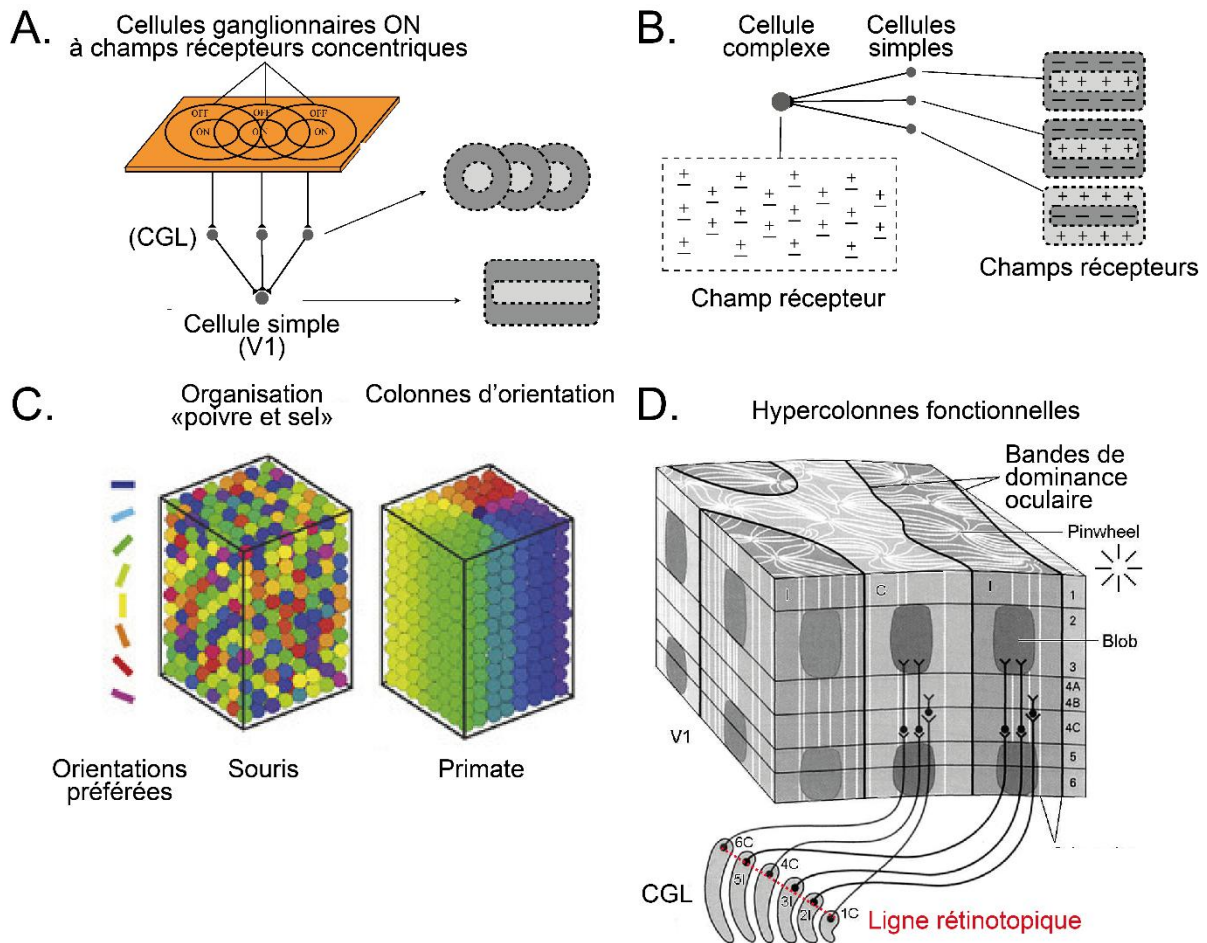
Les neurones pyramidaux de la couche 2-3 constituent le deuxième niveau d'intégration au sein du cortex visuel primaire. Les cellules de la couche 4C $\beta$  de la voie P contactent directement ces neurones qui sont répartis de manière uniforme entre les blobs directement contactés par les cellules géniculées K. Les cellules complexes constituent une catégorie de ces neurones récipiendaires des informations géniculées. Comme les cellules simples, elles conservent une sélectivité d'orientation mais l'intégration des informations des cellules simples confère aux cellules complexes des champs récepteurs plus grands et plus sensibles aux mouvements (Fig. 9, B). La sélectivité d'orientation est ainsi maintenue en colonnes d'environ 100  $\mu\text{m}$  de diamètre traversant l'ensemble des couches de V1. Ces colonnes d'orientation sont elles-mêmes organisées entre elles de façon circulaire : lorsqu'on fait le tour complet d'un des cercles, l'orientation préférée change de manière progressive et l'ensemble des colonnes prises en compte permet de couvrir toutes les orientations possibles. Néanmoins, ces colonnes d'orientation sont localement interrompues par la

présence des blobs formés par les neurones récipiendaires des projections géniculées K. De plus, les colonnes d'orientation présentant une même sélectivité présentent une forte connexion horizontale entre elles. Chez le rongeur, la sélectivité d'orientation est présente au sein de V1, mais les colonnes sont organisées de manière aléatoire entre elles (on parle d'organisation poivre et sel : Fig. 9, C).

Chez le primate, les cellules de la couche 4C $\alpha$  de la voie M contactent indirectement les cellules de la couche 2-3 par le relais de neurones pyramidaux et de cellules étoilées épineuses de la couche 4B. Les neurones cibles de la voie M au sein de la couche 2-3 sont préférentiellement centrés sous les blobs de la voie K (E. M. Callaway 1998). Ces cellules présentent une faible sensibilité aux contrastes de couleurs mais une grande sensibilité aux variations de luminances, ainsi qu'une sélectivité pour les fréquences spatiales faibles et les fréquences temporelles élevées. Les zones comprenant les cellules cibles de la voie P sont positionnées à cheval entre deux blobs de la voie K. Les neurones cibles de la voie P permettent de coder les couleurs et présentent une faible sensibilité aux variations de luminances. Ils présentent enfin une sélectivité aux fréquences spatiales élevées ainsi qu'aux fréquences temporelles faibles.

Le cortex visuel primaire présente donc chez le primate une double organisation en couches et en colonnes. Hubel et Wiesel ont introduit le concept d'hypercolonnes (Fig. 9, D). Une hypercolonne correspond à un cube de cortex visuel de 1 mm de côté comprenant l'ensemble des colonnes d'orientation, des colonnes de dominance oculaire d'un point donné du champ visuel et des blobs présents en un point du champ visuel. Elle permet de coder toutes les informations contenues en ce point: position (de part la position de cette hypercolonne au sein de la rétinitopie corticale), dominance oculaire, orientation, direction et couleur.





**Figure 9. Emergence de la sélectivité d'orientation et des hypercolonnes fonctionnelles (chez le primate uniquement).** **A.** Les cellules simples fusionnent des champs récepteurs concentriques en champ récepteur sélectif d'une orientation. **B.** Les cellules complexes maintiennent la préférence d'orientation et permettent l'émergence d'une composante directionnelle. **C.** Seuls les primates ont une organisation en colonnes d'orientation corticales. **D.** Chez les primates, une hypercolonne fonctionnelle code les orientations et les couleurs potentielles d'un point du champ visuel et ainsi que la dominance oculaire. Modifié d'après Ho et al., 2021 et Kandel et al., 2009.

#### 1.1.6.4. Les couches 5 et 6 exercent un contrôle sur les structures visuelles centrales profondes

Les neurones pyramidaux de la couche 2-3 projettent vers ceux de la couche 5, qui est la seule couche de V1 à ne pas recevoir de projections géniculées. La majorité de ces cellules exerce un rétrocontrôle (feedback) au sein du circuit cortical en faisant synapse avec les cellules des couches 2 à 4 (Fig. 8). D'autres en revanche contactent des structures tectales, dont pour la majorité d'entre elles le colliculus supérieur (Liang et al. 2015). Cette organisation est conservée chez le rongeur et chez le primate.

Enfin, les neurones de la couche 6 exercent eux aussi un rétrocontrôle sur les cellules de la couche 4C (chez le primate seulement) et sur les cellules du CGL (chez tous les Mammifères). Ce dernier rétrocontrôle a été succinctement décrit précédemment dans la section 1.1.4.

Pour finir, les neurones des couches 2-3 et 4B projettent vers d'autres aires corticales spécialisées dans l'extraction de paramètres plus complexes du signal lumineux.

### **1.1.7. Les aires visuelles corticales supérieures codent des paramètres visuels plus complexes au sein des trajets d'information ventral et dorsal**

Le cortex visuel primaire contacte chez le primate les cortex visuels secondaire (V2), tertiaire (V3) et quaternaire (V4) ainsi que l'aire temporale moyenne (MT). Les neurones qui projettent vers ces aires sont issus de couches distinctes au sein de V1. V2 reçoit des projections depuis les neurones pyramidaux et les cellules étoilées épineuses de la couche IVB. Ces dernières projettent aussi sur les cellules de l'aire MT. Enfin, V4 reçoit majoritairement des afférences issues des couches 2-3 corticales.

Ces aires sont organisées en deux trajets d'information qui codent des propriétés visuelles différentes : le trajet ventral qui part de V1 et contacte principalement V4 puis le lobe inférieur temporal (IT) et le trajet dorsal qui depuis V1 contacte d'abord MT puis l'aire intrapariétale latérale (LIP) notamment. Néanmoins, ces deux trajets ne sont pas exclusivement distincts et font intervenir des connexions indirectes. Enfin, ils partagent deux principes communs : si l'on suit séquentiellement chaque trajet, les aires cérébrales concernées présentent des champs récepteurs de plus en plus grands et codent des propriétés visuelles de plus en plus complexes (Kandel et al. 2021).

Au sein du trajet ventral, des études ont démontré que V4 est impliqué dans le codage de la couleur, bien que ces cellules présentent aussi une sélectivité à des formes (Livingstone and Hubel 1988). Enfin, d'autres travaux ont démontré que l'aire IT est le support de la reconnaissance des visages ou de formes complexes (Tanaka 1996). Le trajet dorsal quant à lui est impliqué dans le codage de mouvements (Born and Bradley 2005).

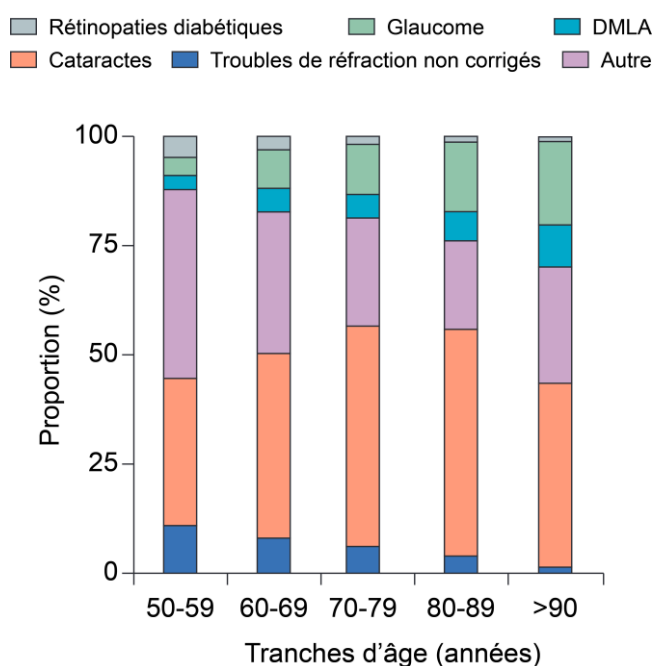
En conclusion, les différentes structures du système visuel et plus particulièrement la voie rétine-CGL-V1 agissent comme des filtres successifs de plus en plus fins permettant d'extraire séquentiellement des paramètres de plus en plus complexes. Chez le primate, un grand nombre de ces propriétés sont regroupées pour chaque point du champ visuel en hypercolonnes fonctionnelles au sein du cortex visuel primaire.



Comme tous les systèmes biologiques complexes, le système visuel peut être atteint de pathologies qui entraînent une malvoyance voire la cécité partielle ou totale. Dans les paragraphes suivants, je détaillerai ces principales pathologies.

### 1.1.8. Pathologies entraînant une déficience visuelle

La prévalence de l'ensemble des déficiences visuelles concerne quelques 285 millions de personnes dans le monde, dont 39 millions atteints de cécité. Les pathologies entraînant une cécité partielle ou totale sont diverses et font intervenir des mécanismes agissant sur différents relais du système visuel. Une méta-analyse de données de santé publique publiée récemment (GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators and Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study 2021) a permis de dresser la principale répartition des causes de cécité ces dernières 30 années (Fig. 10).



**Figure 10. Répartition des principales causes de cécité dans le monde par tranches d'âge.** DMLA : dégénération maculaire liée à l'âge. La catégorie « Autre » comprend notamment plusieurs formes de dégénérescence des photorécepteurs longs. Modifié d'après GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators, 2021.

#### 1.1.8.1. Cataractes et autres atteintes du cristallin

Les cataractes constituent la première cause de cécité totale au monde. Elles sont dues à une opacification du cristallin qui empêche la rétine de recevoir le signal lumineux. Il

existe différentes formes (Liu et al. 2017). La plus courante est la cataracte liée à l'âge qui résulte d'un stress oxydatif des cellules du cristallin (Vinson 2006). Dans ces situations, la dysfonction visuelle est progressive, les patients ayant d'abord une perte d'acuité visuelle qui peut évoluer vers la cécité totale. D'autre part il existe des formes dites pédiatriques principalement d'origine génétique (Liu et al. 2017). Enfin, les cataractes peuvent être le résultat de traumatismes accidentels ou être la conséquence de la prise de drogues (Li, Tripathi, and Tripathi 2008). Les cataractes peuvent être efficacement traitées par une chirurgie et ne constituent donc pas des cas où une thérapie de restauration visuelle est nécessaire.

#### **1.1.8.2. Dégénérescence des photorécepteurs longs**

Un autre ensemble majeur de formes de cécité provient de la dégénérescence des photorécepteurs longs ou bâtonnets (Wright et al. 2010). Ces pathologies génétiques peuvent être la conséquence d'une ou d'un groupe de mutations susceptibles de se produire au sein d'un vaste ensemble de sites (environ 150) au sein du génome humain. Les rétinites pigmentaires (RP) forment le principal groupe au sein de ces pathologies. La forme la plus courante fait intervenir en début d'âge adulte une perte des bâtonnets dans le champ visuel périphérique qui s'étend graduellement vers le centre (Hartong, Berson, and Dryja 2006). Les patients ne gardent donc qu'une vision centrale et perdent la vision scotopique. La dégénérescence des cônes principalement regroupés au sein de la macula peut intervenir dans un second temps. La diversité des mutations responsables de ces pathologies explique le large spectre de fonctions cellulaires susceptibles d'être dérégulées. Les atteintes de la physiologie du cil occupent une part importante, la raison probable est qu'elles entraînent un défaut des transports de métabolites de part et d'autre de ce carrefour critique de la cellule, responsable de sa mort (Fliegau, Benzing, and Omran 2007). Les mutations entraînant une vulnérabilité à la lumière et / ou un stress oxydatif représentent aussi des mécanismes fréquents ayant pour conséquence la mort des photorécepteurs par apoptose (Wright et al. 2010). La plupart des RP sont associées à des syndromes multiples affectant d'autres modalités sensorielles ou motrices. Le syndrome d'Usher entraîne ainsi en parallèle une surdité car il fait intervenir des mutations de gènes impliqués dans la physiologie du cil des photorécepteurs et des stéréocils des cellules sensorielles auditives dans la cochlée (Michalski and Petit 2015).

Enfin, il existe d'autres formes de rétinites pigmentaires faisant intervenir une dégénérescence spécifique des cônes (Wright et al. 2010). D'autre part, d'autres pathologies comme l'amaurose congénitale de Leber entraînent une dégénérescence des photorécepteurs mais se distinguent des rétinites pigmentaires du fait qu'elles interviennent

dès la naissance (Hartong, Berson, and Dryja 2006). A l'inverse, la dégénérescence liée à l'âge (DMLA) est une pathologie qui se déclare tardivement et qui cause une perte de l'épithélium pigmentaire rétinien par accumulations de lipides toxiques avec le temps ("Age-Related Macular Degeneration | NEJM" n.d.; Al-Zamil and Yassin 2017). Ceci entraîne une perte des photorécepteurs maculaires, responsable de la perte de la vision centrale pouvant évoluer vers une cécité totale.

#### **1.1.8.3. Pathologies responsables d'une dégénérescence du nerf optique**

D'autres pathologies agissent sur des structures situées en aval des photorécepteurs. C'est le cas du glaucome, qui constitue un ensemble de pathologies ayant pour conséquence la dégénérescence des cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique (Weinreb, Aung, and Medeiros 2014). La prévalence de cette maladie est d'environ 80 millions de personnes dans le monde. Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine du glaucome sont méconnus (Nickells et al. 2012). Toutefois, la majorité de ces causes entraîne une surpression intraoculaire. Cette augmentation de pression conduit à la dégénérescence du nerf optique.

Les neuropathies optiques constituent un deuxième groupe de maladies lors desquels la présence de toxines ou certains déficits alimentaires peuvent entraîner une dégénérescence du nerf optique (Grzybowski et al. 2015). Certaines formes sont héréditaires et suggèrent l'existence de facteurs génétiques.

Les rétinopathies diabétiques sont un autre ensemble de pathologies affectant les cellules ganglionnaires rétiniennes (Cheung, Mitchell, and Wong 2010). Ces maladies sont une complication du diabète, au cours desquelles la vascularisation de l'œil est endommagée. Cette dégradation est progressive : des micro-anévrysmes locaux apparaissent en premier mais peuvent se compliquer et entraîner des hémorragies plus importantes, une ischémie, une néovascularisation anormale pénétrant la rétine neurale et une inflammation (Lechner, O'Leary, and Stitt 2017). L'ensemble de ces facteurs est responsable de l'apoptose des cellules rétiniennes, notamment les cellules ganglionnaires.

Enfin, on peut ajouter à ces deux premiers groupes de maladie l'ensemble des traumatismes accidentels responsables de la section du nerf optique ou d'une autre structure située en aval au sein du cerveau.

#### **1.1.8.4. Déficiences centrales de la vision**

Les déficiences visuelles d'origine centrale concernent une minorité des déficiences visuelles, la plupart étant dues aux causes évoquées plus tôt qui agissent au niveau de l'œil ou du nerf optique. Néanmoins, une ischémie ou une hypoxie cérébrale peuvent être responsables de la perte de fonction partielle de structures centrales lors d'accidents vasculaires cérébraux (Good 2009; Pula and Yuen 2017; Grunda, Marsalek, and Sykorova 2013; Melnick, Tadin, and Huxlin 2016). Ces phénomènes entraînent la formation d'une tâche aveugle dont la taille dépend de l'étendue du dommage au sein de la structure visuelle cérébrale concernée.

L'ensemble des pathologies évoquées ci-dessus est responsable d'une cécité partielle ou totale. Ces situations ont pour point commun la perte du signal visuel au niveau d'un point précis de la séquence d'intégration de l'information. Une stratégie générale permettant de contourner ce problème pourrait être de recréer le signal visuel perdu de façon artificielle à l'étape où ce dernier est perdu, ou du moins à une étape ultérieure au sein du traitement séquentiel de l'information.

## **1.2. Peut-on recréer un signal visuel par génération de courants électriques exogènes ?**

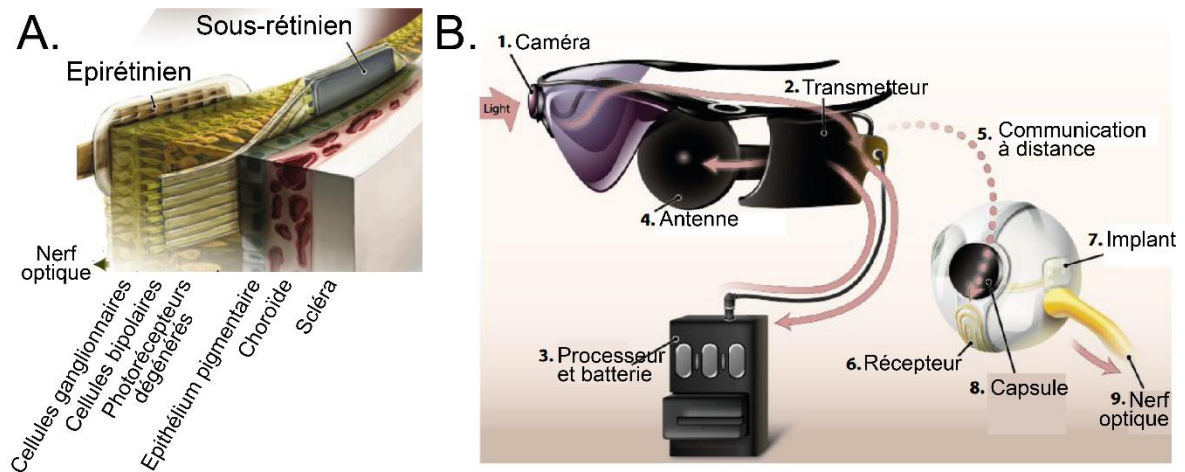
Si les cataractes peuvent être efficacement traitées par un acte chirurgical, il n'existe toujours pas de traitement disponible pour toutes les autres formes de cécité. Cependant, de nombreuses stratégies ont été développées ces dernières années (Roska and Sahel 2018) dont certaines atteignent le stade de l'essai clinique voire de la commercialisation. Les techniques de restauration visuelle par utilisation d'implants électriques ou par expression de canaux membranaires optogénétiques ou sonogénétiques sont intéressantes car elles permettent de palier les cécités induites par l'ensemble des formes de cécité autres que les cataractes. Les applications des stratégies électriques et optogénétiques aux niveaux rétinien et cortical sont détaillés dans la seconde partie de cette introduction. La technique récente de sonogénétique sera enfin présentée ainsi que son intérêt pour la restauration visuelle corticale. Je détaillerai ci-dessous les différentes stratégies thérapeutiques pour une restauration visuelle.

### **1.2.1. Prothèses visuelles électriques**

### 1.2.1.1. Implants rétiniens

Lorsqu'une dégénérescence des photorécepteurs a lieu, les couches plus internes de la rétine restent intègres. La stimulation de l'une de ces couches restantes est donc une potentielle stratégie de restauration visuelle (Ghezzi 2015). Les implants rétiniens occupent une surface de quelques millimètres carrés permettant de couvrir une portion du champ visuel de plus de  $10^\circ \times 10^\circ$  (Humayun et al. 2012; Zrenner et al. 2011; Stingl et al. 2013).

Ces prothèses sont classées selon leur lieu d'implantation au sein de l'œil (Fig. 11). Les implants épirétiniens de type Argus II sont insérés dans l'humeur vitrée et stimulent directement les cellules ganglionnaires (da Cruz et al. 2013; Humayun et al. 2012). Ils sont constitués d'un réseau d'électrodes (MEA, multielectrode array) relié à un stimulateur. Le codage de l'information repose sur une caméra (présente au sein de lunettes portées par le patient) qui capte la scène visuelle pour sa transformation en patterns de stimulations électriques par un ordinateur de poche. A l'inverse les implants sous-rétiniens sont insérés dans la couche des photorécepteurs à la place des cellules ayant dégénéré et permettent de cibler les cellules bipolaires (Stingl et al. 2013). L'avantage de cette configuration est de recréer un signal le plus en amont possible dans la rétine, ce qui laisse espérer que l'information transmise en sortie de la rétine se rapproche plus du signal naturel. Ces implants sont constitués d'un réseau de photodiodes (MPDA, multiphotodiode array). Dans cette configuration, chaque unité de base de l'implant ou pixel est composé d'une (ou plusieurs) photodiode(s) qui convertit le signal lumineux en signal électrique qui est injecté dans le tissu par une électrode. Pour les implants de la société allemande, Retina Implant AG, le signal électrique produit par la lumière naturelle devait être amplifié par des circuits d'amplification. Ces derniers doivent être alimentés par une batterie reliée par un fil (Chow et al. 2004; Mathieson et al. 2012). Pour les implants PRIMA de Pixium Vision, le signal lumineux produit dans l'infrarouge implique le port d'un convertisseur lumineux sous forme de lunettes ou d'une barrette devant la paire de lunettes (Prévot et al. 2020).



**Figure 11. Implants rétiniens.** **A.** Emplacement des implants épirétiniens et sous-rétiniens au sein de l'œil (vu ici en coupe). **B.** Système de codage d'un implant (ici épirétinien). Modifié d'après Zrenner et al., 2013.

D'autre part, une deuxième limitation concerne la résolution spatiale du signal visuel évoqué. Celle-ci est limitée par la densité des électrodes qui est bien inférieure à celle des photorécepteurs du fait de la différence d'échelle de ces structures. La résolution spatiale du signal visuel est donc environ 12 fois moins bonne (0.2 degrés) que celle assurée par une vision normale (Zrenner 2013). La meilleure acuité visuelle (20/460) est aujourd'hui assurée par l'implant PRIMA de Pixium Vision dont chaque pixel permet de stimuler une surface de  $100 \mu\text{m}^2$  sur la rétine. La résolution temporelle de la stimulation électrique dépend quant à elle de la fréquence de rafraîchissement d'images entre 5 et 30 Hz (valeur atteinte pour l'implant PRIMA de Pixium Vision (D. Palanker et al. 2022)), ce qui est légèrement inférieur à la résolution de la vision naturelle (Zrenner 2013).

Enfin, plusieurs modèles ont atteint les essais cliniques voire ont obtenu une mise sur le marché. Parmi les différents implants épi-rétiniens présents dans la littérature, le modèle Argus II développé par Second Sight Medical comporte 60 électrodes de  $200 \mu\text{m}$  espacées chacune de  $575 \mu\text{m}$  (da Cruz et al. 2013; Stronks and Dagnelie 2014). Il a été commercialisé et retiré du marché. Les patients implantés atteints de rétinopathie pigmentaire (plus de 350) étaient capables de localiser des objets (96% de succès au sein de la population de patients) et de discriminer des mouvements (57%) ou des orientations (23%). L'acuité visuelle maximale notée est de 20/1260. L'implant sous-rétinien Alpha IMS du groupe Retina Implant AG a obtenu sa mise sur le marché mais n'est plus commercialisé. Il comporte un ensemble de 1500 photodiodes adjacentes de  $70 \times 70 \mu\text{m}^2$ . Les patients (11 patients au sein d'une étude initiale suivi d'un essai clinique dans différents centres faisant intervenir 19 patients supplémentaires) ayant reçu cette prothèse sont capables de percevoir de la lumière et de la localiser, de détecter des mouvements ainsi que certaines orientations. Trois patients ont pu

identifier des lettres et lire des mots. Les implants sous-rétiniens de Pixium Vision SA (Daniel Palanker et al. 2020; D. Palanker et al. 2022) sont quant à eux en essais cliniques. Ils sont constitués de 378 photodiodes hexagonales activant une surface rétinienne de 100  $\mu\text{m}^2$ . L'essai clinique a démontré que cet implant offre une acuité visuelle de 20/460 à 2/565 pour les quatre patients atteints de DMLA et implantés en centrale avec la possibilité de lire (Palanker 2020) et de fusionner la vision naturelle périphérique et la vision artificielle infrarouge centrale (Palanker 2022).

#### 1.2.1.2. Prothèses corticales

Dans les années 1960-1970, les expériences fondatrices de Brindley & Lewin puis de Dobelle ont prouvé la possibilité d'utiliser des stimulations électriques du système visuel afin de générer une perception visuelle (Brindley and Lewin 1968; Dobelle and Mladejovsky 1974; Dobelle, Mladejovsky, and Girvin 1974; Dobelle et al. 1976). Des patients humains stimulés en surface du cortex visuel primaire perçoivent ainsi des phosphènes (c'est-à-dire la perception de tâches lumineuses localisées au sein du champ visuel). Ces travaux ont ouvert la voie au développement de prothèses électriques afin de restaurer une forme de vision par stimulation d'une structure du système visuel.

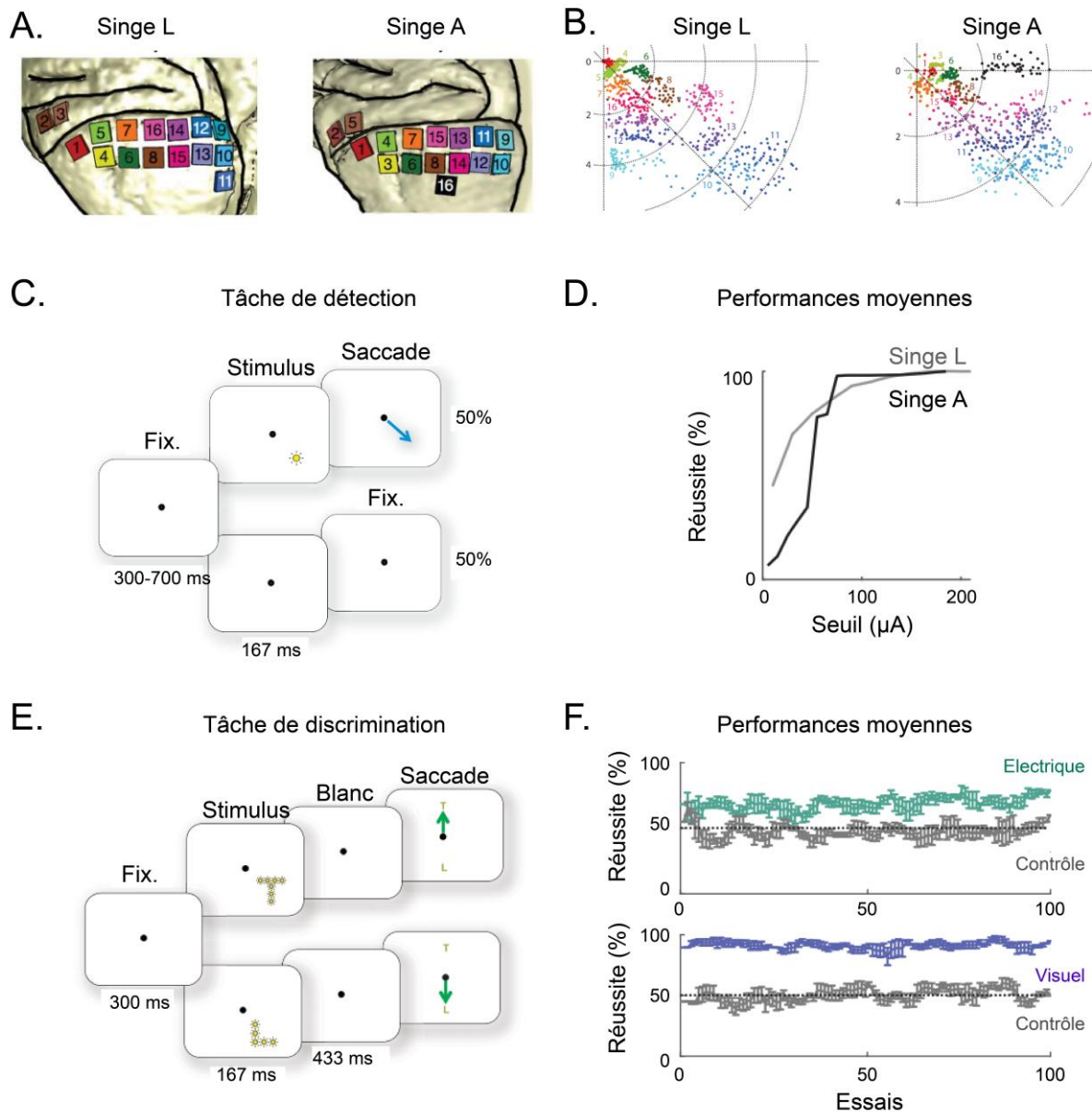
Lorsque le nerf optique est endommagé, les stimulations électriques de V1 peuvent engendrer des phosphènes et la vision de formes (Brindley and Lewin 1968; Dobelle and Mladejovsky 1974; Dobelle, Mladejovsky, and Girvin 1974; Dobelle et al. 1976).

Les travaux fondateurs évoqués ci-dessus reposent sur l'utilisation d'électrodes de surface. Cette approche est la moins invasive mais présente l'inconvénient d'activer des zones larges du cortex, de l'ordre de plusieurs millimètres. Le diamètre d'une colonne d'orientation étant d'environ 100  $\mu\text{m}$ , une activation si étendue peut difficilement servir de support à une restauration visuelle présentant une résolution spatiale élevée. De plus les courants électriques utilisés sont élevés (quelques milliampères) ce qui risque d'entraîner de larges activations toxiques pour les neurones. Néanmoins l'espacement important des électrodes (quelques millimètres) permet d'obtenir des phosphènes dont les champs récepteurs sont disjoints et localisés à l'endroit du champ visuel prédit par la rétinitopie. Plus récemment, l'implant surfacique Orion développé par Second Sight a été testé chez des patients humains (Beauchamp et al. 2020). Le codage de forme nécessite la formation de différents phosphènes sans que ces derniers ne fusionnent en un plus gros phosphène informe. Dans le cas de la prothèse Orion, la stratégie retenue pour éviter ce risque est l'activation séquentielle des électrodes. Les participants à l'étude sont ainsi capables de

détecter correctement des lettres. Cependant, la stimulation dynamique d'une même forme réduit de fait la résolution temporelle du signal évoqué.

Récemment, des prothèses reposant sur l'utilisation d'électrodes pénétrantes ont permis d'utiliser des courants électriques plus faibles de l'ordre de la dizaine de microampères. De plus, les études précliniques réalisées sur le primate non-humain montrent que chez les animaux implantés réalisant une tâche de détection de phosphènes, l'amplitude du courant nécessaire à la bonne performance de la tâche diminue avec l'apprentissage (Ni and Maunsell 2010). L'utilisation d'électrodes pénétrantes permet d'activer des zones corticales plus petites (quelques centaines de micromètres) et donc d'obtenir des champs récepteurs plus localisés pouvant atteindre l'ordre du dixième de degrés (Schiller et al. 2011). Ceci rend possible l'utilisation de réseaux d'électrodes denses, comprenant une centaine d'électrodes par unité, comme les modèles Utah développés par Blackrock dont l'espacement entre les électrodes est de 400  $\mu\text{m}$ . Des primates non-humains implantés par ces dispositifs sont capables de discriminer différents mouvements linéaires et différentes formes géométriques (Xing Chen et al. 2020).





**Figure 12. Perception de formes induites par une prothèse corticale électrique chez le primate non-humain.** **A.** Emplacement des 16 matrices d'électrodes au sein du cortex visuel gauche. 14 matrices sont implantées dans V1, 2 dans V4. **B.** Centre des champs récepteurs des électrodes ( $n=1024$ ) implantées. **C.** Tâche de détection. Chaque essai démarre par la fixation (Fix.) d'un point central. Dans la moitié des cas, une électrode est stimulée et induit un phosphène. Après la fin de la stimulation, l'animal doit effectuer une saccade vers le champ récepteur du phosphène. Dans l'autre moitié des cas, aucun stimulus n'est présenté et l'animal doit maintenir la fixation du point central. **D.** Performances moyennes des animaux en fonction du courant électrique utilisé. **E.** Tâche de discrimination. Après la fixation (Fix.) initiale, un stimulus visuel ou électrique représentant une lettre parmi deux (ici, L ou T) est présenté dans le champ visuel inférieur droit. Après une période de blanc, les deux stimuli sont présentés à l'écran. L'animal est alors autorisé à rompre la fixation du point central et doit effectuer une saccade vers la même lettre présentée plus tôt. **F.** Performances moyennes des animaux en condition visuelle ou électrique. Lors de la condition contrôle, les électrodes activées ne forment pas de lettres identiques à celles présentées dans le choix final. Modifié d'après Chen et al., 2021.

Dans cette étude, deux animaux sont implantés avec 16 matrices Utah de 64 électrodes au sein du cortex visuel gauche (14 localisés dans V1 et 2 dans V4), soit un total de 1024 électrodes (Fig. 12, A). Les auteurs ont d'abord identifié le centre du champ récepteur associé à chaque électrode (Fig. 12, B). Cette étape permet de connaître la position dans le champ visuel du phosphène associé à la stimulation de chaque électrode. Ceci est nécessaire pour le choix des électrodes à stimuler pour générer la perception d'une forme particulière. Cette perception doit être validée par des expériences comportementales. Les auteurs ont d'abord entraîné les animaux à réaliser une tâche de détection de cibles visuelles ou de phosphènes dus à la stimulation d'une électrode (Fig. 12, C). Leurs résultats démontrent que les animaux sont bien capables de détecter les phosphènes électriques et que leurs performances augmentent avec le courant électrique utilisé jusqu'à un plateau (Fig. 12, D). Enfin, les auteurs ont appris aux animaux à discriminer différents stimuli visuels (lettres L et T). Ils remplacent ensuite les stimulations visuelles par la stimulation des électrodes appropriées pour provoquer la perception de ces lettres (d'après les résultats de la cartographie obtenue en Fig. 12, B). Les résultats montrent que les animaux sont capables de discriminer les stimuli visuels entre eux (Fig. 12, F, courbe bleue), mais aussi les stimuli électriques entre eux (courbe verte).

Enfin, une autre étude réalisée chez un patient humain implanté avec une matrice de 96 électrodes de type Utah (similaire à celles utilisés chez les primates dans l'étude précédente) démontre que ce dernier est capable de reconnaître des lettres (Fernández et al. 2021). Il est important de noter que contrairement aux implants surfaciques, la stimulation des électrodes réalisée lors de ces études est statique et simultanée, ce qui permet théoriquement d'atteindre un codage du signal plus rapide.

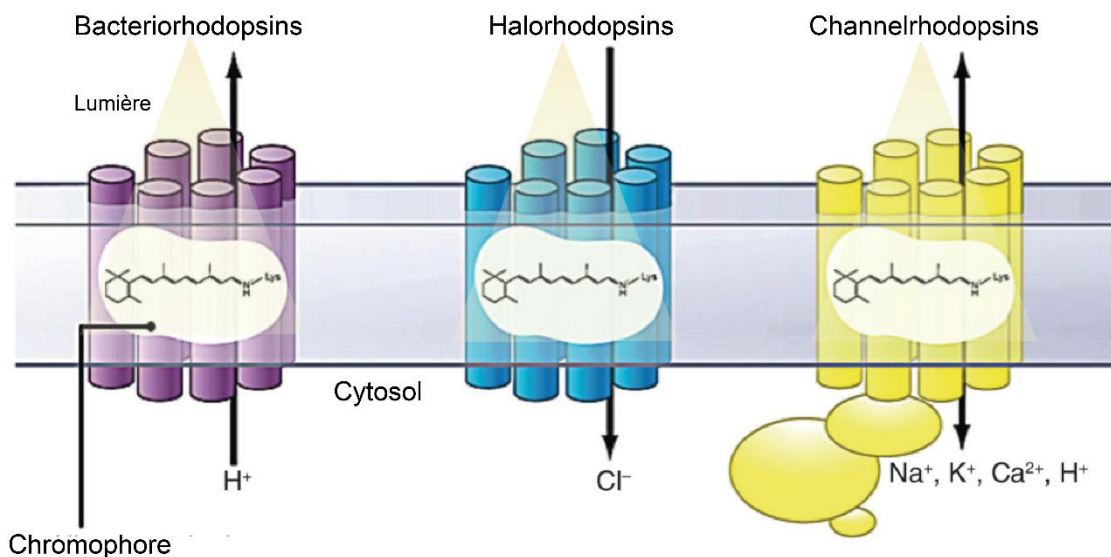
Les implants électriques sont donc efficaces pour restaurer partiellement la vision aux niveaux rétinien et cortical. Cependant, ces prothèses font face à quelques désavantages. Premièrement, il n'est pas possible d'activer spécifiquement un sous-type cellulaire parmi d'autres, ce qui est un objectif nécessaire pour recréer au mieux le signal naturel. D'autre part, concernant les implants corticaux, les modèles permettant d'atteindre les meilleures résolutions spatiales et temporelles sont ceux qui reposent sur l'utilisation d'électrodes pénétrantes. Ces implantations nécessitent de lourdes chirurgies, d'autant plus que le nombre total d'électrodes implantées doit être important pour aboutir à une résolution spatiale utile aux patients, ce qui est un frein notable au transfert clinique. Il faut également noter qu'au fil du temps, une gliose s'étend au contact des électrodes ce qui augmente l'impédance et diminue la transmission du signal imposé par la stimulation électrique.

## 1.2.2. Optogénétique

Cette partie décrira comment contrôler l'activité de neurones par des stimulations lumineuses et comment adapter cette stratégie à la restauration visuelle.

### 1.2.2.1. Principe

L'optogénétique permet de contrôler l'activité neuronale au moyen de l'expression ectopique de canaux ioniques membranaires sensibles à la lumière appelés opsines (Deisseroth 2015). La majorité des opsines utilisées proviennent de gènes de micro-organismes et en particulier de procaryotes (Zhang et al. 2011). Chez ces organismes, ils codent des protéines photosensibles responsables de fonctions diverses comme par exemple le phototactisme (Spudich 2006).



**Figure 13. Les trois principales classes d'opsines permettent un contrôle optique de l'activité neuronale.** Bactériorhodopsines et halorhodopsines sont inhibitrices alors que les channelrhodopsines sont excitatrices. Modifié d'après Deisseroth et al., 2015.

Les opsines peuvent être caractérisées selon plusieurs propriétés biophysiques. La première concerne le type d'ions auxquels elles sont perméables, ce qui détermine leur nature excitatrice ou inhibitrice (Deisseroth 2015; Fenno, Yizhar, and Deisseroth 2011) (Fig. 13). Les bactériorhodopsines sont des pompes évacuant les protons hors de la cellule ce qui conduit à leur hyperpolarisation. De même, les halorhodopsines établissent un courant entrant d'ions chlorure résultant en une hyperpolarisation des neurones. A l'inverse, la plupart des variants de la famille de la channelrhodopsine sont des canaux assurant un

courant entrant de cations parmi lesquels on peut citer les ions sodium, potassium ou calcium. Les conductances à ces ions varient en fonction des protéines de cette famille, certaines comme ChrimsonR étant moins perméables au calcium (Klapoetke et al. 2014). L'ensemble des opsines présente une latence d'activation permettant de contrôler l'activité neuronale avec une résolution temporelle de l'ordre de quelques millisecondes (Klapoetke et al. 2014; Sridharan et al. 2022) (même s'il existe des différences avec des exemples d'opsines présentant des activations extrêmement soutenues (Gong et al. 2020)). Ces constantes de temps définissent aussi la fréquence maximale de potentiels d'action qu'il est possible d'imposer au sein des neurones exprimant l'opsine considérée. Au-delà de cette limite, des phénomènes de décalage d'activation peuvent se produire.

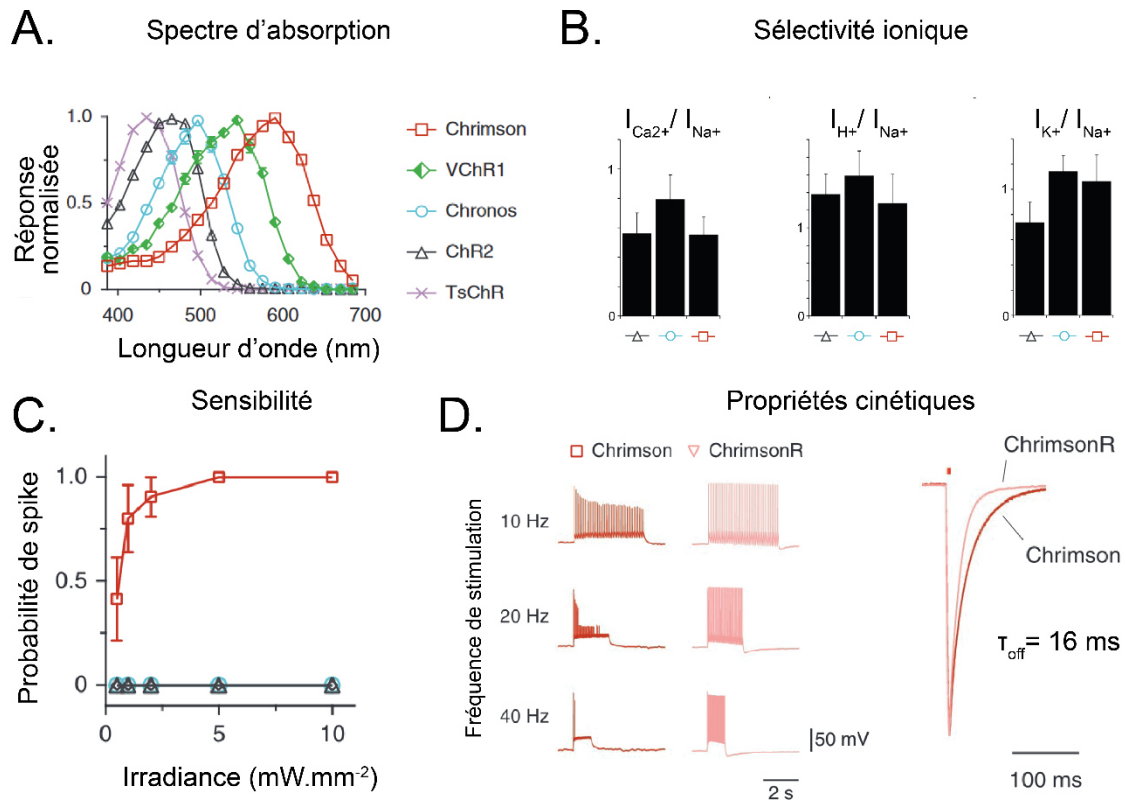
D'autre part, le spectre d'excitation de l'opsine est une autre variable importante. L'ensemble des spectres d'absorption des opsines décrites dans la littérature permettent de couvrir toutes les longueurs d'ondes de la lumière visible (Baker and Flannery 2018). L'utilisation d'opsines présentant des spectres d'excitation spécifiques et distincts est intéressante car elle rend possible l'activation de différentes sous-populations de neurones (Klapoetke et al. 2014). D'autre part, la lumière rouge pénétrant mieux dans les tissus et étant moins toxique que la lumière bleue (Marie et al. 2020), il est intéressant d'utiliser des opsines sensibles aux grandes longueurs d'ondes pour activer *in vivo* des structures cérébrales plus profondes depuis la surface du cortex, ce qui évite le recours à l'insertion invasive de fibres optiques dans le cerveau (J. Y. Lin et al. 2013; R. Chen et al. 2021). Une autre propriété importante liée au spectre d'absorption est la sensibilité de l'opsine à la puissance lumineuse. L'utilisation d'opsines présentant une forte sensibilité permet de réduire la quantité de photons nécessaire à leur activation et ainsi d'éviter des activations thermiques aspécifiques et d'endommager le tissu. Une attention particulière à ChrimsonR sera portée car c'est l'opsine que j'ai utilisée au cours de mes travaux de thèse.

### 1.2.2.2. L'opsine excitatrice ChrimsonR sensible à la lumière rouge

Chrimson est une opsine sensible à la lumière rouge qui a été décrite en 2014 par le laboratoire d'Edward Boyden (Klapoetke et al. 2014). Elle présente des conductances équivalentes au sodium, protons et potassium deux fois plus élevées que celle au calcium (Fig. 14). Son pic d'activation se situe à 590 nm. La structure de cette protéine-canal a été décrite par cristallographie à une résolution spatiale de 2.6 Å (Oda et al. 2018).

Plusieurs variants de Chrimson ont été conçus dans le but de modifier une propriété d'intérêt. Le variant ChrimsonR développé par le même laboratoire d'Edward Boyden possède ainsi une constante de désactivation de 16 ms, plus courte que celle de l'opsine

naturelle ou que celle de ReachR, une autre opsine sensible à la lumière rouge. Ceci permet à ChrimsonR de répondre sans saturation jusqu'à 40 Hz, une fréquence compatible avec la résolution temporelle nécessaire à la restauration visuelle. Pour ces raisons, ChrimsonR est une candidate intéressante pour une telle thérapie : les applications de ChrimsonR pour la restauration visuelle seront décrites dans la section 1.2.2.4.



**Figure 14. Propriétés de Chrimson et de son variant plus rapide ChrimsonR.** **A.** Chrimson est une opsine sensible à la lumière rouge dont le pic de spectre d'absorption est à 590 nm. **B.** Sélectivités cationiques normalisées par rapport au courant sodique. Chrimson présente une moindre affinité au calcium qu'au sodium, protons et potassium. **C.** Sensibilité de Chrimson à l'irradiance. **D.** Chrimson possède une constante de désactivation ne permettant pas de répondre sans saturation à des fréquences de stimulation supérieures à 20 Hz. Le mutant ChrimsonR présente des réponses plus transitoires et possède une constante de désactivation de 16ms. Modifié d'après Kaploetke et al., 2014.

D'autre part, d'autres ont développé le variant ChrimsonSA dont le pic d'excitation est décalé dans le rouge à 605 nm, et dont la constante d'activation est dix fois inférieure à celle du variant naturel (Oda et al. 2018). La conductance de ce nouveau canal photosensible est inférieure à celle de Chrimson mais néanmoins suffisante pour générer des potentiels d'action au sein de neurones. De plus, ChrimsonSA présente un spectre d'excitation plus spécifique de la lumière rouge que l'opsine naturelle.

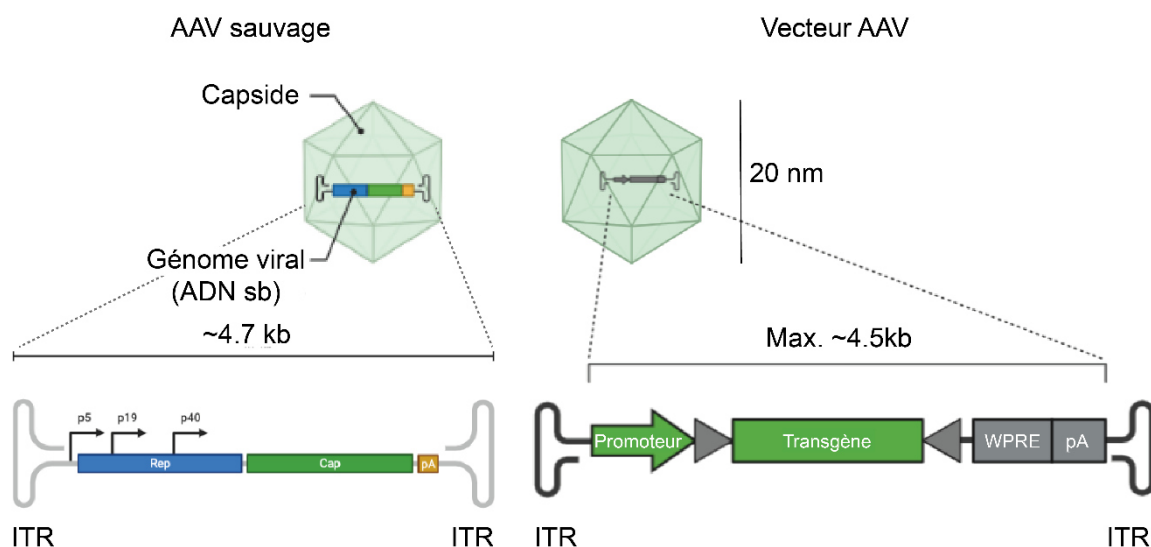
Enfin, le groupe de Tobias Moser a produit d'autres mutants présentant eux aussi une cinétique bien plus élevée que le variant naturel. Ces variants nommés f-Chrimson et vf-Chrimson (f : *fast*, rapide ; vf : *very fast*, très rapide) possèdent des constantes de désactivation de 3.2 et 1.6 ms, respectivement (Mager et al. 2018), mais une photosensibilité légèrement inférieure. Ces nouveaux variants ont été appliqués avec succès pour la restauration auditive. Dans ces travaux, les auteurs expriment grâce à un vecteur AAV ces opsines ultra-rapides au sein des cellules ganglionnaires auditives constituant le nerf auditif chez des souris issues d'une lignée modèle génétique de surdité. Ces animaux sont implantés avec un implant cochléaire optogénétique permettant d'appliquer des stimulations lumineuses sur ces cellules. Les résultats démontrent que l'activation optogénétique des cellules ganglionnaires auditives présente une résolution temporelle telle qu'elle permet des stimulations à des fréquences pouvant atteindre plusieurs centaines de hertz (Mager et al. 2018). De plus, cette activation optogénétique du nerf auditif permet de rétablir des potentiels évoqués auditifs corticaux.

### 1.2.2.3. Importance du vecteur d'expression

Il est nécessaire d'utiliser un vecteur pour induire l'expression de l'opsine choisie puisqu'elle n'est naturellement pas présente au sein des neurones des structures ciblées. Une première stratégie communément utilisée est l'emploi de vecteurs viraux (Trapani, Puppò, and Auricchio 2014), parmi lesquels les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAV), les vecteurs lentivirus (LV), les vecteurs dérivés du virus de l'herpès (HSV) ou enfin les vecteurs adénovirus (Ad). Le deuxième ensemble de stratégies comprend l'utilisation de vecteurs non-viraux comme les agents lipidiques qui enrobent les acides nucléiques et leur permettent de franchir les membranes biologiques, ou d'autres nanoparticules chimiques. Cet ensemble comprend aussi l'utilisation de procédés physiques comme l'électroporation. Un bon vecteur d'expression doit assurer une expression efficace, stable et sélective des cellules ciblées sans induire d'effets délétères, et être applicable chez l'homme dans le cas d'une thérapie génique.

Les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAV) répondent à ces exigences. Dans la nature, le génome sauvage est un brin d'ADN simple de 4.7 kb comprenant deux séquences codantes (CAP codant la capsid virale et REP codant les protéines nécessaires à la réplication du génome) entourées de deux séquences de répétitions terminales inversées (ITR). La production de vecteurs AAV consiste à remplacer l'intégralité des séquences codantes par une construction génétique comprenant un transgène d'intérêt (dans ce cas précis, le gène de l'opsine), un promoteur permettant de restreindre

l'expression du transgène à une sous-population cellulaire, et d'éventuels éléments supplémentaires (Trapani, Puppo, and Auricchio 2014) (Fig. 15). La taille maximale de cette construction ne doit pas excéder celle du génome sauvage. La plupart des combinaisons de gènes d'opsines et des promoteurs utilisés permettent néanmoins de respecter cette condition. Les vecteurs LV, AD et HSV cités plus hauts ont une capacité de cargo plus importante mais leur emploi demeure plus risqué du fait de leur profil plus immunogène. Les séquences ITR restent présentes autour du transgène car elles sont nécessaires à l'encapsidation du matériel génétique.



**Figure 15. Structure d'un AAV sauvage et d'un vecteur AAV utilisé comme vecteur d'expression.** ITR : terminaisons inversées répétées (Inverted Terminal Repeats). ADN sb : ADN simple brin. Rep et Cap sont les deux séquences génétiques codant les protéines de réplication du génome et de capsid, respectivement. WPRE et pA sont des éléments régulateurs post-traductionnels communément utilisés en génie biologique. Modifié d'après Addgene.

Le tropisme des vecteurs AAV dépendent de la capsid (qui définit le sérotype de l'AAV) et du promoteur choisis. Il existe aussi des spécificités entre différents organismes. Ainsi, parmi la dizaine de sérotypes d'AAV existant naturellement, certains présentent un tropisme neuronal à la fois chez le rongeur (Trapani, Puppo, and Auricchio 2014) et le primate (Tremblay et al. 2020) (AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9). De plus, l'efficacité d'expression dépend aussi du volume et de la concentration du vecteur AAV. Enfin, selon la voie d'injection, différentes barrières physiques peuvent aussi limiter l'accès des particules virales aux cellules cibles. Si l'on désire par exemple transduire les photorécepteurs, il peut être intéressant d'effectuer une injection des vecteurs AAV au sein de l'humeur vitrée car cette procédure est assez bénigne. Cependant, la membrane limitante interne ainsi que les couches externes de la rétine bloquent la progression des vecteurs vers les photorécepteurs, et les sérotypes naturels tels que AAV2 ou AAV8 ne permettent pas d'obtenir une expression



satisfaisante. Plusieurs études ont permis par mutagenèse dirigée (Petr-Silva et al. 2011) ou par évolution dirigée (Dalkara et al. 2013; Byrne et al. 2020) l'obtention de variants AAV capables de franchir plus efficacement ces barrières anatomiques et de transduire plus efficacement les photorécepteurs chez la souris et le primate non-humain. De même, d'autres travaux ont permis le développement de variants AAV capables de franchir la barrière hémato-encéphalique, offrant la possibilité de réaliser une injection intraveineuse des vecteurs moins invasive qu'une injection intracérébrale (Chan et al. 2017). Cependant, cette stratégie ne permet pas d'exprimer spécifiquement un transgène d'intérêt dans une région donnée du cerveau sans connaître de promoteur spécifique de cette région. Ainsi, pour assurer une expression d'une opsine au sein du cortex visuel primaire seulement, il est nécessaire d'effectuer une injection intracorticale locale du vecteur d'expression en ajustant certains paramètres (volume injecté, concentration du vecteur, etc.) pour assurer une diffusion du vecteur limitée à la zone d'intérêt.

Enfin, les vecteurs AAV présentent une immunogénicité faible ce qui rend possible leur utilisation en thérapie génique pour la restauration visuelle optogénétique (Trapani, Puppo, and Auricchio 2014).

#### **1.2.2.4. Thérapie optogénétique rétinienne**

##### **1.2.2.4.1. Au sein des cellules ganglionnaires**

La preuve de concept de thérapie optogénétique rétinienne a été établie dès 2006 par le laboratoire de Zhuo Pan. Ce dernier a démontré que l'expression de la channelrhodopsine 2 (ChR2) au sein des cellules ganglionnaires chez un modèle murin de dégénérescence de photorécepteurs permet de restaurer les réponses de ces cellules à la lumière bleue. Cette approche a été confirmée chez le ouistiti (Ivanova et al. 2010) et fait l'objet d'un essai clinique depuis 2015 (AbbVie 2022). D'autres travaux ont aussi démontré la possibilité d'utiliser CaTCh, une autre opsine microbienne sensible à la lumière bleue présentant une cinétique plus rapide et une plus grande sensibilité plus élevée que ChR2 (Kleinlogel et al. 2011; Chaffiol et al. 2017; Ferrari et al. 2020). Un autre consortium utilise Chronos au cours d'un essai clinique en cours (Bionic Sight LLC 2021). Chronos est une autre opsine microbienne sensible à la lumière bleue et présentant une constante de désactivation encore plus faible (Klapoetke et al. 2014). Enfin, d'autres ont utilisé une opsine de synthèse permettant de sensibiliser les cellules ganglionnaires à la lumière blanche avec un seuil d'activation plus bas (Batabyal et al. 2015; 2021; Tchedre et al. 2021). Cependant, l'utilisation d'opsines présentant une sélectivité à des longueurs d'ondes plus élevées que la



lumière bleue permettrait d'éviter le risque de toxicité cellulaire (Baker and Flannery 2018; Marie et al. 2020). C'est le cas de l'opsine excitatrice ChrimsonR, sensible à la lumière rouge (Fig. 15).

Dans la perspective d'un transfert clinique, ChrimsonR a été exprimée dans la rétine de primates non-humain pour sélectionner la meilleure protéine, ChrimsonR fusionné à tdTomato, et le meilleur vecteur, AAV2-7m8, tout en étudiant les risques d'inflammation et en recherchant la dose la plus adaptée. Sur ces rétine isolées, l'activation des cellules ganglionnaires exprimant ChrimsonR-tdTomato par des stimuli lumineux complexes (barres mobiles, formes géométriques) permet de démontrer la résolution spatiotemporelle procurée (Gauvain et al. 2021). Ces travaux *ex vivo* ont été complété par une autre étude démontrant l'activation *in vivo* des cellules ganglionnaires rétinienne chez le macaque (McGregor et al. 2020). De plus, l'activité induite au sein de la rétine engendre des potentiels visuels évoqués au sein de V1, même plusieurs mois après l'injection intraoculaire du vecteur AAV transportant le gène de l'opsine (Chaffiol et al. 2022). Cette stratégie fait actuellement l'objet d'un essai clinique (GenSight Biologics 2020). Un premier patient traité est capable de localiser, compter et saisir des objets lors de la stimulation de l'œil injecté par des lunettes spéciales codant la scène visuelle à 600 nm (Sahel et al. 2021). Ces lunettes sont indispensables pour assurer une stimulation efficace des cellules ganglionnaires pour compenser la perte de l'amplification du signal qui a lieu naturellement lors de la phototransduction. Les mêmes tests ont été effectués en l'absence de ces lunettes de stimulation et les résultats ne montrent pas de détection correcte. De plus, les électroencéphalogrammes réalisés chez ce patient lors de ces expériences confirment que lorsque l'œil traité est stimulé, seul le cortex visuel présente une modulation de l'amplitude du spectre de puissance des oscillations alpha, ce qui suggère un décodage cortical de la scène visuelle.

Les travaux précédents reposent sur l'utilisation d'opsines microbiennes. Certains laboratoires ont questionné la sûreté d'exprimer chez un patient une protéine issue d'un organisme phylogénétiquement éloigné car elle pourrait être ciblée par le système immunitaire. C'est pourquoi d'autres études ont aussi développé l'utilisation d'opsines de mammifères comme la mélanopsine, naturellement exprimée par certaines cellules ganglionnaires impliquées dans le rythme circadien, la rhodopsine et les opsines de cônes. Les deux premières montrent des résolutions temporelles trop faibles pour être compatibles avec une stratégie de restauration visuelle (B. Lin et al. 2008; Cehajic Kapetanovic et al. 2020; Gaub et al. 2014), mais les opsines de cônes ont montré des résultats plus encourageants (Berry et al. 2019).

#### **1.2.2.4.2. En amont des cellules ganglionnaires**

Les travaux cités ci-dessus ont en commun de cibler les cellules ganglionnaires et de les transformer en cellules ON optogénétiques, indépendamment de leur type cellulaire originel. Afin de mieux mimer la diversité des réponses ganglionnaires qui ont lieu physiologiquement, d'autres études ont ciblé des niveaux d'intégration situés en amont. Cibler les cellules bipolaires permet ainsi de restaurer des réponses ganglionnaires ON et OFF (Lagali et al. 2008; E. Macé et al. 2015; van Wyk et al. 2015; Berry et al. 2017). Enfin, d'autres ont ciblé un niveau intégratif encore antérieur en exprimant des opsines inhibitrices au sein des cônes dormants dans des modèles de rétinites pigmentaires (Buskamp et al. 2010; Khabou et al. 2018). Leurs résultats démontrent que cette stratégie permet de restaurer des réponses visuelles et l'exécution de tâches visuelles.

Il existe donc de nombreuses stratégies de restauration visuelle rétinienne optogénétique qui diffèrent principalement par le choix de la protéine photosensible stimulée ainsi que par le type cellulaire ciblé. Cependant, tout comme les implants rétiniens, ces stratégies ne sont pas adaptées pour des pathologies endommageant le nerf optique.

#### **1.2.2.5. Thérapie optogénétique corticale**

L'utilisation de l'optogénétique pour l'étude du fonctionnement du cortex visuel chez le rongeur fait l'objet d'une littérature abondante (Fenno, Yizhar, and Deisseroth 2011; Deisseroth 2015; Emiliani et al. 2015; Marshel et al. 2019; Carrillo-Reid et al. 2019). Cependant les études précliniques de restauration visuelle ont principalement été développées chez le primate non-humain du fait de la plus grande proximité de ce modèle animal avec l'homme et de son répertoire comportemental plus riche. Or, la transposition complexe d'outils développés majoritairement chez le rongeur fait que le nombre d'études optogénétiques réalisées chez le primate non-humain est beaucoup plus réduit (Tremblay et al. 2020). Ce faible nombre nécessite donc d'étudier à la fois les études de recherche fondamentale et appliquée utilisant l'optogénétique dans le cortex visuel primaire chez le primate non-humain pour développer une stratégie de restauration visuelle corticale. Les sous-parties suivantes présenteront dans un premier temps l'état de l'art concernant l'utilisation de l'optogénétique chez ce modèle animal pour l'étude du cortex visuel, puis les études réalisées démontrant la perception de stimuli optogénétiques comme stimuli visuels.

##### **1.2.2.5.1. Investigation optogénétique du fonctionnement du cortex visuel primaire chez le primate non-humain**

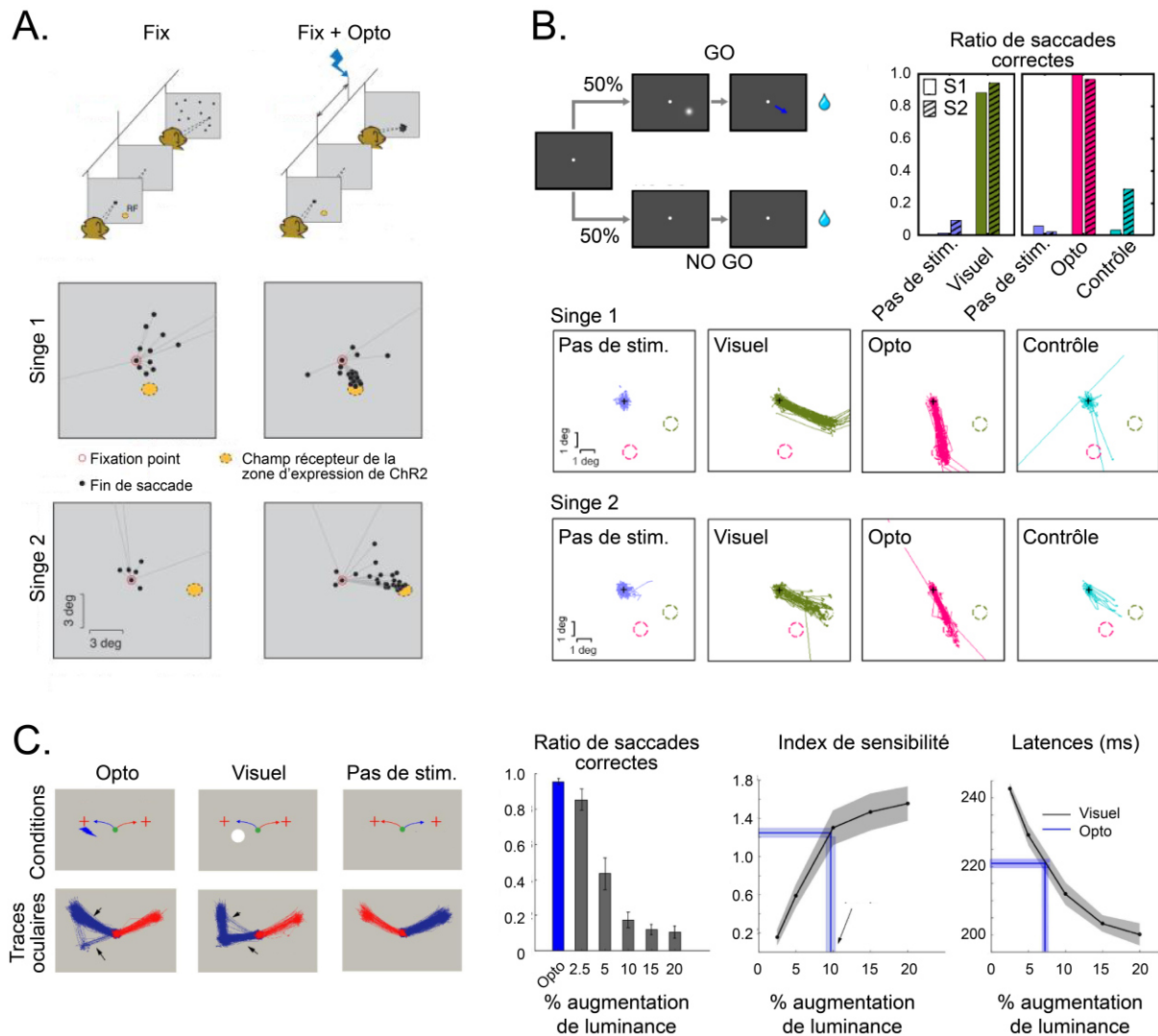
Une majorité de des travaux sur l'optogénétique dans le cortex visuel chez le primate ont enregistré des réponses physiologiques sans réponses comportementales. La stimulation de neurones de V1 exprimant ChR2 a ainsi permis d'imager les connexions inter-hémisphériques de ces neurones chez le macaque (Nakamichi et al. 2019). L'activation optogénétique de colonnes de dominance oculaire ou d'orientations induit une activation des colonnes voisines présentant la même sélectivité (Chernov et al. 2018). D'autres travaux ont montré l'existence de réponses non-linéaires lors d'activations optogénétiques des neurones de V1 (Nassi et al. 2015). Enfin, une autre étude a inactivé les terminaisons de V2 contactant V1 par l'expression de l'opsine inhibitrice ArchT. Cette inhibition est responsable de l'augmentation de la taille des champs récepteurs dans V1 ainsi que de la diminution de leur effet suppresseur en leur périphérie (Nurminen et al. 2018).

D'autres études de la physiologie de V1 chez le primate non-humain ont aussi ou seulement enregistré des effets comportementaux. Des animaux entraînés à détecter un stimulus visuel présentent un plus grand taux de réussite lorsque l'orientation du stimulus est identique à l'orientation préférée de la colonne de neurones de V1 activés (Andrei et al. 2019). D'autres ont aussi établi des tâches de détection de stimuli visuels présentant différents contrastes et montrent que la stimulation optogénétique engendre un effet masquant. Par rapport à la courbe psychométrique obtenue, le contraste nécessaire pour obtenir 70% d'essais corrects est multiplié par 2 voire 4 selon la puissance lumineuse utilisée (S. C.-Y. Chen et al. 2022). D'autre part, l'effet d'une inactivation optogénétique de V1 sur les courbes psychométriques obtenues lors de tâches comportementales similaires entraîne une plus grande diversité de perturbations du taux de décharge des cellules enregistrées en fonction du contraste du stimulus. De plus, ces différents motifs physiologiques ségrègent en fonction de la profondeur corticale. Concernant la réponse comportementale, le taux de réussite des animaux diminue pour certains contrastes uniquement lors des sessions où la grande majorité des cellules enregistrées présentent une inhibition de leur taux de décharge pour tous les contrastes (Andrei et al. 2021). Une autre étude montre que l'inhibition des neurones de V1 exprimant ArchT conduit à la suppression partielle des réponses neuronales évoquées par des stimuli visuels, et rend plus difficile la discrimination de stimuli visuels en fonction de leur luminance (Rajalingham et al. 2021). De plus, les courbes psychométriques sont perturbées uniquement lorsque la localisation du stimulus visuel correspond au champ récepteur de la stimulation.

#### ***1.2.2.5.2. Application de la stimulation optogénétique de V1 à la thérapie corticale***

Un nombre encore plus limité d'études démontrent qu'une activation optogénétique de V1 en l'absence de stimulus visuel concomitant entraîne une perception visuelle.

La première démonstration d'une perception visuelle d'un stimulus a été apportée en 2012 par le laboratoire de Gregory Horwitz (Jazayeri, Lindbloom-Brown, and Horwitz 2012) (Fig. 16, A). Dans ces travaux, les animaux expriment ChR2 dans V1 et sont entraînés à fixer un point central. Dans la moitié des essais, V1 est localement stimulé à l'aide d'une fibre optique en surface du cortex. La stimulation optogénétique induit une saccade des animaux vers le champ récepteur de la zone stimulée. Dans deux autres études (Ju et al. 2018; Ortiz-Rios et al. 2021), des animaux exprimant une opsine excitatrice dans V1 (C1V1 et ChR2 pour ces travaux respectifs) ont réalisé une tâche de détection lors de laquelle ils doivent effectuer une saccade vers la cible visuelle ou vers le champ récepteur de la zone activée par optogénétique pour être récompensés (Fig. 16, B et C, respectivement). Dans la première étude, la stimulation est réalisée par imagerie bi-photonique. Dans les autres travaux (non publiés encore), elle est réalisée à l'aide d'une fibre en surface du cortex. Les deux études démontrent que les animaux réalisent correctement la tâche lors de la stimulation optogénétique. De plus, la stimulation d'une zone de V1 où l'opsine n'est pas exprimée n'induit pas de saccades. Les plus récents de ces travaux (non publiés) montrent aussi par IRM fonctionnelle que l'activité initiée dans V1 se propage à d'autres aires visuelles (Ortiz-Rios et al. 2021). Cependant, contrairement aux travaux établis pour les prothèses corticales, il n'existe pas d'études apportant une preuve comportementale de la discrimination entre deux motifs de stimulation optogénétique. Une telle preuve doit donc être apportée pour démontrer l'efficacité de la thérapie optogénétique corticale.



**Figure 16. Exemples de stimulations optogénétiques de V1 entraînant une perception visuelle adaptée à une restauration visuelle corticale.** **A.** Dans cette étude, les singes sont entraînés à fixer un point central. La disparition du point central entraîne une saccade non stéréotypée (colonne de gauche). La stimulation optogénétique additionnelle (Fix + Opto, colonne de droite) redirige ces saccades vers le champ récepteur de la zone exprimant ChR2. Adapté de Jazayeri et al., 2012. **B.** Dans cette étude, les animaux sont entraînés à effectuer une saccade vers une cible visuelle lorsque cette dernière est présente (tâche de détection de type GO / NO GO). Les traces oculaires (panels du bas) montrent la détection correcte de la cible visuelle (cercle vert). Lors de la stimulation de la zone exprimant l'opsine C1V1, les animaux effectuent une saccade vers le champ récepteur de cette zone (cercle rose). Lors d'une stimulation contrôlée d'une zone corticale proche n'exprimant pas l'opsine, peu de saccades sont effectuées vers ce même champ récepteur. Les histogrammes montrent le ratio de saccades correctes effectuées lors de chaque condition pour chaque animal (S1 : Singe 1, S2 : Singe 2). Adapté de Ju et al., 2018. **C.** Lors de ces travaux, les animaux sont entraînés à indiquer par une saccade vers la croix rouge gauche la présence d'un stimulus visuel ou optogénétique (Opto), ou vers la croix rouge droite l'absence de stimulation (Pas de stim.). Les traces oculaires bleues et rouges indiquent les essais corrects et incorrects, respectivement. Notez que lors de la stimulation visuelle, les traces correctes font un « détour » par la zone où la cible visuelle est présentée avant de bifurquer vers la croix rouge gauche. Les panels de droite indiquent le ratio de saccades correctes, l'index de sensibilité et la latence des saccades effectuées. Modifié d'après Ortiz-Rios et al., 2021 (travaux non publiés mais en libre-accès).

D'autre part, l'application de cette stratégie en clinique nécessite l'utilisation d'un dispositif de stimulation optique qui doit idéalement répondre à plusieurs critères. Il doit être positionné au minimum en surface de la dure-mère pour être le moins invasif possible. Dans cette configuration, il faut donc démontrer que la stimulation en surface du cortex active effectivement les couches profondes de V1, et notamment la couche 4C qui reçoit les informations géniculées sans engendrer d'effets thermiques (Stujenske, Spellman, and Gordon 2015). De plus, le dispositif optique utilisé doit pouvoir générer différents motifs de stimulation pour coder des stimuli complexes. Une étude novatrice a récemment montré la possibilité d'utiliser une matrice de LED chez le macaque permettant d'illuminer spécifiquement une sous-partie de V1 (Rajalingham et al. 2021). De tels dispositifs pourraient être utiles à une stratégie de restauration visuelle optogénétique corticale.

Un ensemble important d'études démontrent donc l'efficacité de la restauration visuelle optogénétique rétinienne, qui fait l'objet de plusieurs essais cliniques chez l'homme. L'utilisation d'une opsine sensible à la lumière rouge telle que ChrimsonR est attrayant car ces ondes pénètrent mieux les tissus biologiques et sont moins toxiques que la lumière bleue. La thérapie optogénétique corticale, offre la possibilité de stimuler le cortex depuis la surface, or cette configuration présente une résolution spatiale faible dans le cas des prothèses électriques corticales. La mise en place d'une telle stratégie suppose d'obtenir une expression efficace de ChrimsonR au sein de V1 et de montrer que les couches profondes (notamment 4C) sont activées à la suite d'une stimulation de surface.

### **1.2.3. Contrôle de l'activité neuronale par émission d'ondes ultrasonores**

Les ondes lumineuses sont progressivement absorbées au sein des tissus biologiques. A l'inverse, les ondes ultrasonores subissent beaucoup moins d'atténuation et de dispersion au sein de ces milieux. Une stratégie de restauration visuelle corticale basée sur l'utilisation des ultrasons pourrait donc constituer une thérapie corticale efficace. Les sous-parties introductives suivantes expliqueront comment les ondes ultrasonores peuvent moduler l'activité neuronale et comment la sonogénétique permet un contrôle ultrasonore plus précis et efficace des neurones.

#### **1.2.3.1. Les ondes ultrasonores peuvent moduler l'activité neuronale**

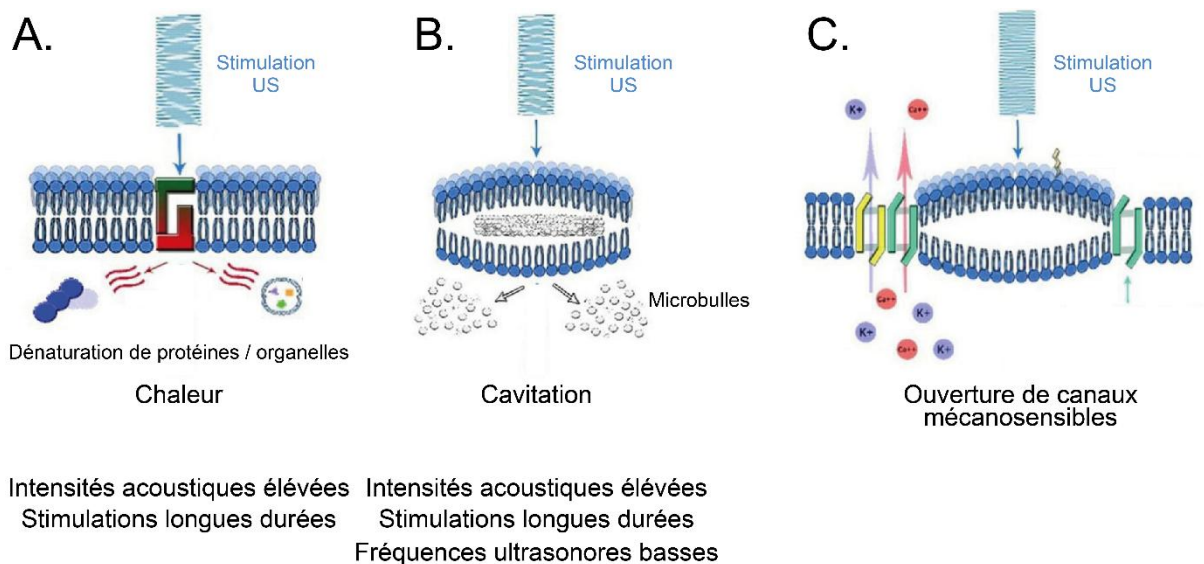
Les ultrasons comprennent l'ensemble des ondes acoustiques dont la fréquence est supérieure à 20 kHz. Edmund Harvey fut en 1929 le premier à démontrer que l'émission d'ondes ultrasonores est capable de moduler l'activité de fibres nerveuses et musculaires (Harvey 1929). Un ensemble important de laboratoires a depuis développé des stratégies de modulation ultrasonore de l'activité neuronale (Tyler et al. 2008; Tufail et al. 2010; 2011; Deffieux et al. 2013; Legon et al. 2014; Kubanek et al. 2016; 2018; Guo et al. 2018; Legon et al. 2018).

Deux paramètres de stimulation sont importants en regard de ces possibles mécanismes sous-jacents : la fréquence de l'onde ultrasonore et l'intensité acoustique  $I$  du signal. Cette dernière est fonction du temps et de la position dans l'espace du point considéré. L'intensité acoustique est égale au produit de la pression acoustique instantanée  $P$  et de la vitesse de déplacement de la particule mise en mouvement  $v$ .

$$I = P * v$$

Les études citées précédemment utilisent dans leur ensemble des valeurs assez variées pour ces deux paramètres.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, l'absorption des ondes ultrasonores dans les tissus biologiques convertit une partie de l'énergie acoustique en énergie thermique qui peut être responsable de l'activation neuronale. D'autre part, il peut se produire des phénomènes de cavitation lors desquels la formation et la désagrégation de microbulles peuvent engendrer des pores dans les membranes plasmiques. Ces deux premiers effets sont d'autant plus probables que les intensités acoustiques utilisées sont élevées (le risque augmentant nettement au-dessus de  $1 \text{ W.cm}^{-2}$ ). Ils dépendent aussi de la durée et de la fréquence de stimulations. De plus, les phénomènes de cavitation sont aussi plus susceptibles de se produire pour des fréquences faibles (en-dessous de 1MHz par exemple). Troisièmement, les ondes ultrasonores peuvent engendrer des variations de capacitance des membranes plasmiques des neurones. Enfin, la modulation ultrasonore peut être due à l'expression naturelle de certains canaux potassiques présentant une mécanosensibilité tel que MEC-4 chez *C. elegans* (Kubanek et al. 2018) ou Piezo1 (Qiu et al. 2019) (Fig. 17).



**Figure 17. Différents mécanismes sous-tendent la modulation ultrasonore de l'activité neuronale.** **A.** Conversion de l'énergie acoustique en chaleur. **B.** Les ultrasons peuvent introduire la formation de microbulles par cavitation qui peuvent générer des dommages cellulaires. **C.** Certains types cellulaires expriment naturellement des canaux mécanosensibles. Modifié d'après Wang et al., 2020.

Enfin, la résolution spatiale de la modulation dépend de la fréquence ultrasonore utilisée. La plupart des études citées précédemment utilisent des fréquences permettant d'obtenir une résolution spatiale supérieure à 3mm, ce qui n'est pas adapté à une stratégie de restauration visuelle corticale. La résolution temporelle est elle aussi trop importante pour une telle application. Augmenter la fréquence ultrasonore pourrait résulter en une meilleure résolution spatiale, mais des travaux montrent qu'il est nécessaire d'augmenter en parallèle l'intensité acoustique du signal pour garder la même efficacité de modulation, ce qui augmente les risques d'effets thermiques et de microhémorragies.

### 1.2.3.2. La sonogénétique permet d'exercer un contrôle ultrasonore plus fin de l'activité neuronale

La sonogénétique permet de contrôler l'activité neuronale au moyen de l'expression ectopique de canaux ioniques membranaires mécanosensibles sélectifs aux ultrasons. Comme pour l'optogénétique, le choix du vecteur viral transportant le gène d'intérêt permet de cibler plus précisément une sous-population de neurones. Dans la littérature, plusieurs protéines ont été testées dans ce but : la protéine Prestin naturellement exprimée dans les cellules ciliées auditives (Wu et al. 2020; Huang et al. 2020), les canaux ioniques des familles TRP (Ibsen et al. 2015; Yang et al. 2020) et Piezo (Pan et al. 2018; Prieto et al. 2018), exprimés dans différents types cellulaires chez les Mammifères et le canal ionique

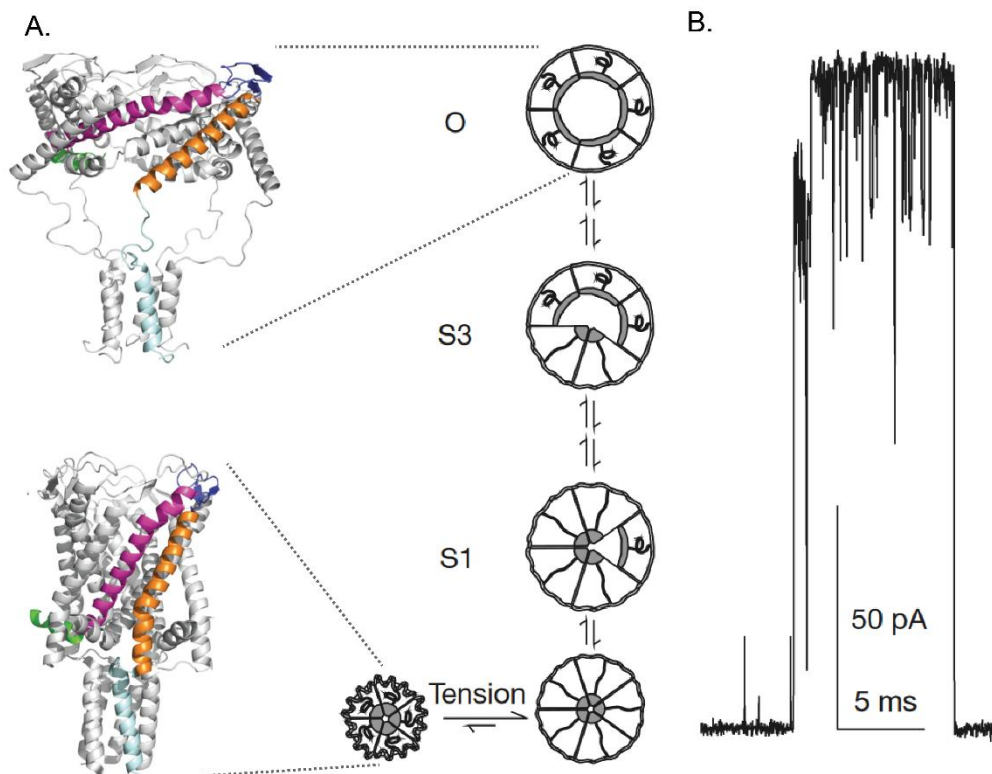


mécanosensible à large conductance MscL, d'origine bactérienne (Heureaux et al. 2014; Soloperto et al. 2018; Ye et al. 2018; Qiu et al. 2020). Cependant, une stratégie de restauration visuelle corticale sonogénétique nécessite d'utiliser un canal répondant à plusieurs critères. Il doit générer un courant exciteur de grande amplitude puisque le but est de mimer le signal visuel cortical par activation des neurones de V1. Ses constantes cinétiques doivent permettre d'atteindre une résolution temporelle d'activation de l'ordre de quelques millisecondes, ce qui n'est pas le cas des protéines Prestin et celles de la famille TRP. Dans le cas de cette dernière famille, une étude montre que les paramètres utilisés pour l'activation du canal TRPV1 entraînent une augmentation de température jusqu'à 42°C, ce qui risque de perturber l'homéostasie neuronale. De plus, doit être activé par des intensités acoustiques faibles pour les raisons expliquées précédemment. Le gène codant ce canal doit préférentiellement être court pour être inclus dans un vecteur AAV, ce qui exclut les gènes Prestin et Piezo1. Enfin, de nombreux canaux mécanosensibles répondent aussi à des stimuli d'autres natures (variations de potentiels électriques, de pH ou de température). Un canal purement mécanosensible est préférable car il assure un contrôle plus fin de l'activité neuronale. De plus, certaines des études citées précédemment co-injectaient des microbulles pour favoriser le contrôle ultrasonore de l'activité neuronale, une solution qui n'est pas compatible avec une application clinique de la sonogénétique.

### 1.2.3.3. Le canal mécanosensible MscL

Le canal MscL semble être un bon candidat pour une stratégie de restauration visuelle corticale sonogénétique car il respecte les critères détaillés précédemment : courant exciteur de grande amplitude, sensibilité à des intensités acoustiques faibles, activation à des stimuli mécaniques uniquement, gène de taille compatible avec une insertion dans un vecteur AAV. MscL est une protéine bactérienne exprimée chez de nombreux organismes dont *E.coli*, chez qui elle est impliquée dans les réponses à des changements de pression osmotique (Haswell, Phillips, and Rees 2011). Le canal est constitué de cinq monomères identiques entourant un pore central (Fig. 18). Chacun de ces monomères est constitué de 2 hélices  $\alpha$  transmembranaires et d'une hélice  $\alpha$  cytosolique. Lors d'un stress mécanique un mouvement des hélices  $\alpha$  transmembranaires s'engage et permet l'ouverture progressive du pore central (Haswell, Phillips, and Rees 2011; Sukharev et al. 2001; Walton et al. 2015). Le canal transite rapidement par différents sous-états d'activation avant d'atteindre l'ouverture complète (Sukharev et al. 2001). Il permet alors un courant exciteur cationique non-sélectif (aucune donnée n'indique une sélectivité ionique particulière, mais une étude démontre qu'il est au moins perméable au calcium (Qiu et al. 2020)) et de grande amplitude (~3 nS)

(Walton et al. 2015). Des expériences de patch-clamp enregistrant le courant induit par l'ouverture d'un canal unique démontre que ce dernier présente une latence inférieure à 5 ms (Sukharev et al. 2001). Enfin, un variant de cette protéine présentant la mutation G22S présente un seuil d'activation plus faible (Soloperto et al. 2018). Une étude démontre la possibilité d'utiliser MscL-G22S pour un contrôle sonogénétique de l'activité neuronale avec une grande résolution spatiotemporelle chez le cortex moteur de la souris, sans injection de microbulles (Qiu et al. 2020).



**Figure 18. Structure et propriétés fonctionnelles du canal MscL.** **A.** Lorsqu'une tension mécanique est appliquée à la membrane plasmique, un glissement progressif des cinq monomères du canal s'opère (états transitoires S1 à S3), permettant d'ouvrir le pore central (état ouvert, O). Les détails de la structure du canal dans les états ouverts et fermés obtenus par cristallographie sont présentés à gauche. **B.** Courant d'un canal unique obtenu par patch-clamp. Modifié d'après Sukharev et al., 2001 et Walton et al., 2015.

Pour parvenir à une stratégie de restauration visuelle corticale optogénétique, il faut démontrer la possibilité d'exprimer efficacement le canal MscL-G22S dans les neurones de V1 chez le rongeur puis le primate non-humain, puis d'apporter des preuves physiologiques et comportementales de l'efficacité de la stimulation.

## 1.3. Comment valider physiologiquement l'efficacité de ces stratégies de restauration visuelle ?

### 1.3.1. Bref aperçu des techniques de lecture de l'activité cérébrale

Différentes techniques sont utilisées en neurosciences pour détecter les activités cérébrales. Les résolutions spatiales et temporelles, la taille du champ d'observation ainsi que la nature du signal enregistré sont résumées pour chacune d'entre elles dans le Tableau 1 ci-dessous.

Nom	Résolution spatiale	Taille du champ d'enregistrement	Fréquence d'acquisition	Nature et cinétique du signal enregistré
IRMf	~ 1 mm <sup>3</sup>	Cerveau entier	1 Hz	BOLD. Réponse lente (plusieurs secondes)
PET	5 mm <sup>3</sup>		1.6*10 <sup>-2</sup> Hz	Activité métabolique. Réponse lente.
MEG	2-3 mm <sup>3</sup>		10 <sup>3</sup> Hz	Champs magnétiques cérébraux. Détection des ondes $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ et $\theta$ (4 - >35 Hz).
OCT	10 $\mu$ m <sup>3</sup>	Plusieurs mm <sup>3</sup>	1 Hz	CBF. Réponse lente (plusieurs secondes).
Imagerie optique intrinsèque	~ 40 $\mu$ m <sup>3</sup>	Limité en surface	10 <sup>2</sup> Hz	Oxygénation de l'hémoglobine. Réponse lente (plusieurs secondes).
fUS	100*100*400 $\mu$ m <sup>3</sup>	2D : 12.8*15*0.4 mm <sup>3</sup> 3D : cerveau entier (rongeur). Nécessite un accès au cerveau (craniotomie ou fenêtre chronique).	0.3 - 1 Hz	CBV. Réponse lente (plusieurs secondes)
EEG	~ 1 cm <sup>2</sup>	Dépend du nombre total d'électrodes et de sites par électrode. EEG et EcoG scannent des informations de surface.	10 <sup>3</sup> Hz	Potentiels électriques.
EcoG	~ 5 mm <sup>2</sup>		10 <sup>4</sup> Hz	Potentiels électriques.
Electrode pénétrante	Sphère de rayon ~ 100 $\mu$ m <sup>3</sup> pour chaque site (neurones uniques).		10 <sup>4</sup> Hz	Potentiels électriques : LFP et spikes. Réponses rapides (spikes > 300 Hz, LFP 8-300 Hz)
Imagerie calcique	Dépend du type de	Limité en surface jusqu'à 750 $\mu$ m de	10 <sup>3</sup> Hz	Fluorescence calcique-dépendante. La durée de la réponse

	microscopie utilisée. Microscopie bi-photonique :	profondeur pour la microscopie bi-photonique.		dépend de l'indicateur. Decay time de GCaMP6 : 100-500 ms.
<b>Imagerie voltage-dépendante</b>	~ 1 $\mu\text{m}^2$ (neurones uniques, sous-compartiments cellulaires).	La taille du plan d'imagerie est limitée par la taille de l'objectif et la surface de cerveau accessible.	$10^3$ Hz	Fluorescence voltage-dépendante. Decay time : ~10 ms.

**Tableau 1. Principales caractéristiques des techniques d'enregistrement de l'activité cérébrale.** IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle. BOLD : Blood Oxygenation Level Dependent (effet dépendant du niveau d'oxygénation du sang). PET : Topographie par Emission de Positons. MEG : magnétoencéphalographie. OCT : Tomographie par Cohérence Optique. CBF : flux sanguin cérébral. fUS : imagerie fonctionnelle ultrasonore. CBV : volume sanguin cérébral. EEG : électroencéphalographie. EcoG : électrocorticographie. LFP : local field potentials (potentiels de champs locaux).

Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, la réponse neuronale à la stimulation optogénétique ou sonogénétique est caractérisée par l'utilisation d'électrodes pénétrantes et / ou par imagerie fonctionnelle ultrasonore.

### 1.3.2. Activités mesurées par les enregistrements électrophysiologiques

Un enregistrement électrophysiologique de l'activité cérébrale réalisé avec une électrode intracérébrale permet d'obtenir l'évolution au cours du temps d'un potentiel électrique par rapport à une référence externe. Le potentiel enregistré est formé à partir de l'ensemble des courants électriques qui ont lieu dans le volume de cerveau scanné par l'électrode (Buzsáki, Anastassiou, and Koch 2012). Il est possible de séparer différentes composantes de ce signal en séparant le spectre de fréquences de ce dernier en différents intervalles.

Les fréquences inférieures à 300 Hz correspondent aux potentiels de champs locaux (LFP, Local Field Potentials). Les LFP proviennent de la superposition d'un nombre important de courants nécessairement lents pour pouvoir s'additionner en un signal détectable. Ce sont surtout les courants post-synaptiques qui respectent ces conditions, même si d'autres sources minoritaires peuvent s'additionner à l'activité synaptique.

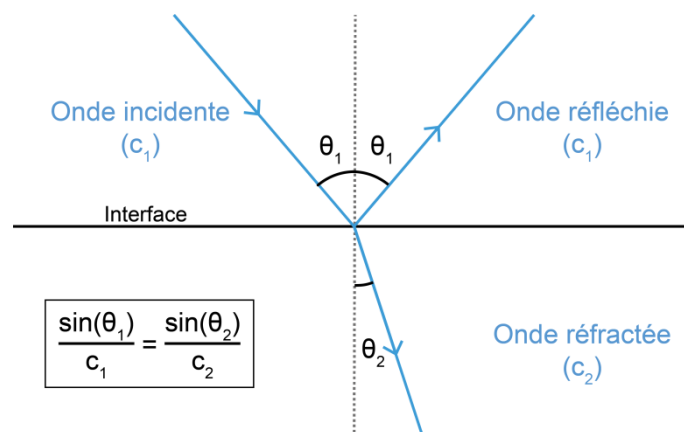
Les fréquences élevées (plus de 300 Hz) correspondent aux potentiels d'action qui peuvent être associés aux cellules uniques d'où ils sont originaires : on parle d'activités

unitaires à l'opposé d'activités multi-unitaires. Ces informations reflètent des signaux plus locaux que les LFP.

### 1.3.3. L'imagerie ultrasonore fonctionnelle

#### 1.3.3.1. L'imagerie conventionnelle par ultrason

Lorsque des ondes acoustiques ultrasonores traversent un tissu biologique, elles traversent des milieux qui diffèrent par la résistance des particules qui les constituent à être mises en mouvement par les ondes. On dit que ces milieux possèdent des impédances acoustiques différentes, et la frontière entre deux milieux d'impédances différentes est nommée interface. Au niveau de ces interfaces, les ondes sont réfractées et réfléchies selon la loi de Snell-Descartes (Fig. 19).



**Figure 19. Loi de Snell-Descartes.**  $C_1$  et  $C_2$  sont les célérités de l'onde acoustique au sein des deux milieux considérés.

L'imagerie conventionnelle par ultrason permet d'obtenir une représentation anatomique d'un tissu par reconstitution des différents réflecteurs présents au sein du plan de tissu imagé (Mace et al. 2013). On appelle une image ultrasonore anatomique une image B-mode. Brièvement, les ondes sont générées par conversion d'un signal électrique en ultrasons par une sonde constituée de plusieurs éléments dits piézoélectriques. Dans le cas de l'imagerie conventionnelle, le plan du tissu est scanné de façon séquentielle (Fig. 19 Fig. 20, A).

L'ensemble des éléments piézoélectriques génère un faisceau d'ondes focalisé qui rencontre de nombreuses interfaces le long de la colonne de tissu qu'il traverse. Les

différents échos (les ondes réfléchies) générés sont captés par ces mêmes éléments, qui calculent la position et la réflectivité de la région focale des ultrasons. L'image de ce volume focale est appelé pixel. En faisant varier en profondeur le point focal, on obtient ainsi une image de tous les pixels de la colonne. L'image du plan entier est obtenue en concaténant ces différentes colonnes de pixels.

Enfin, la résolution spatiale de l'imagerie ultrasonore est d'autant plus fine que la fréquence des ondes est élevée. Cependant, plus cette dernière est élevée, plus les ondes sont atténuées par le tissu ce qui réduit le champ d'imagerie en profondeur. Typiquement, la plupart des acquisitions sont effectuées à 15MHz, ce qui permet d'obtenir une résolution spatiale de  $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}^3$ . La résolution temporelle dépend quant à elle du nombre d'éléments piézoélectriques puisque l'imagerie se fait de façon séquentielle. Pour une sonde typique comprenant 128 éléments, la fréquence d'acquisition est de 120 images par seconde.

### **1.3.3.2. L'imagerie ultrasonore ultrarapide**

Cette méthode ne repose pas sur l'émission séquentielle d'ondes focalisées mais sur l'émission d'ondes planes par l'ensemble des éléments piézoélectriques (Mace et al. 2013). Les ondes réfléchies sont enregistrées simultanément et les analyses de la réflectivité des pixels du tissu sont effectuées en parallèle (Fig. 19 Fig. 20, B). Ce processus permet de multiplier par près de 200 la résolution temporelle de l'imagerie. Cependant, le rapport signal sur bruit des images obtenues est plus réduit du fait de la perte de la focalisation des ultrasons. Une solution pour augmenter la netteté des ondes images consiste à faire varier cycliquement l'angle d'émission des ondes. La combinaison des données de chaque image obtenue lors d'un cycle de variation d'angle permet d'obtenir un ensemble d'ondes réfléchies qui présentent de nombreuses intersections. Cette méthode permet de générer une focalisation synthétique des ondes sur l'ensemble de l'image. Plus le nombre d'angles est important, plus la focalisation synthétique l'est et meilleur est le rapport signal sur bruit de l'image composite. Cependant, puisque cette dernière est obtenue par synthèse de l'ensemble des images d'un cycle, augmenter le nombre d'angles revient aussi à diminuer la résolution temporelle de l'imagerie. Dans la pratique, un nombre d'angles compris entre 11 et 17 est un compromis fréquemment utilisé.

### **1.3.3.3. Application de l'effet Doppler pour obtenir une imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS)**

Pour détecter les particules en mouvement comme le flux vasculaire, la technique ultrasonore ultrarapide a été combinée à l'analyse de l'effet Doppler. Lorsqu'un point en mouvement avec une vitesse  $v$  au sein d'un milieu génère une onde acoustique de célérité  $c$  avec une fréquence  $f_{émise}$ , la fréquence reçue  $f_{reçue}$  par un émetteur fixe est légèrement différente à cause de la vitesse de l'objet : c'est l'effet Doppler. Cette fréquence reçue dépend aussi de la position relative de l'émetteur par rapport au récepteur. En considérant l'angle  $\theta$  formé à un instant donné entre la ligne reliant le récepteur à l'émetteur et le vecteur de la vitesse  $v$  du point en mouvement, on obtient :

$$f_{reçue} = 2 f_{émise} * v * \cos(\theta) / c$$

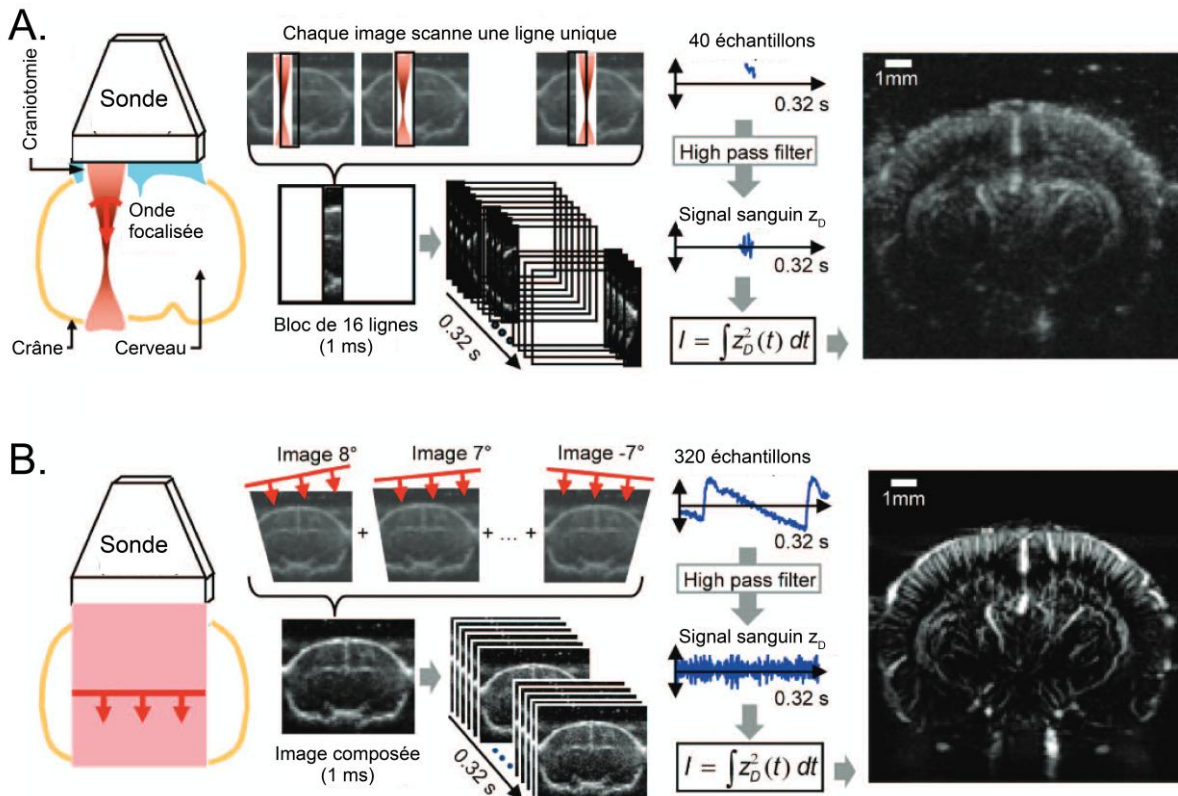
Il est possible d'appliquer cette formule à l'imagerie ultrasonore du flux sanguin au sein d'un tissu biologique. En considérant  $v$  comme la projection de la vitesse des globules rouges sur l'axe vertical,  $\theta$  correspond à l'angle d'inclinaison (variable) des ondes planes : les valeurs de  $\theta$  étant faibles, il est possible de négliger sa contribution et la relation précédente se simplifie ainsi (Mace et al. 2013) :

$$f_{reçue} = 2 f_{émise} * v / c$$

En pratique, les éléments piézoélectriques enregistrent une variation d'amplitude des ondes ultrasonores réfléchies au cours du temps. Pour obtenir uniquement l'effet du flux sanguin dans ces données brutes, il est nécessaire d'appliquer un filtre passe-haut permettant d'éliminer l'effet des mouvements intrinsèques du tissu (Mace et al. 2013; E. Macé et al. 2011) (Fig. 20). En établissant le spectre de fréquences du signal obtenu précédemment, il est possible d'obtenir après d'autres traitements (dont la décomposition en valeurs singulières (Baranger et al. 2018)) non détaillés ici deux paramètres importants pour chaque pixel de l'image :

- La fréquence centrale qui correspond à la fréquence  $f_{reçue}$  de l'équation précédente. Elle est proportionnelle à la vitesse du flux sanguin projeté sur l'axe vertical, c'est-à-dire  $v$  dans l'équation ci-dessus.
- L'intensité du signal ou Power Doppler, qui correspond à l'intégration de ce signal. Le Power Doppler est proportionnel à la variation de volume sanguin cérébral (Cerebral Blood Volume : CBV). Or lors d'une activation neuronale, les cellules nécessitent de consommer plus d'oxygène et de métabolites ce qui provoque une augmentation locale de CBV.





**Figure 20. Imagerie fonctionnelle Doppler conventionnelle et ultrarapide.** **A.** L'imagerie conventionnelle repose sur l'émission de faisceaux ultrasonores convergents. Chaque image est construite après scans successifs de toutes les colonnes du cadre d'imagerie. L'application des lois physiques de l'effet Doppler aux globules rouges et divers traitements du signal permettent de reconstituer une carte de l'intensité du signal ou Power Doppler, proportionnel au volume sanguin cérébral (CBV). **B.** L'imagerie ultrarapide repose sur l'émission d'ondes planaires avec des inclinaisons variant cycliquement couvrant l'ensemble du cadre d'imagerie. Le recouplement de ces images et la plus grande résolution temporelle permettent d'augmenter le rapport signal sur bruit de la carte de Power Doppler obtenue après les mêmes traitements qu'en A. Modifié d'après Macé et al., 2013.

L'imagerie ultrarapide ultrasonore peut donc être utilisée pour obtenir des cartes d'activation neurovasculaire basées sur les variations de CBV. Une sonde ultrasonore typique comportant 128 éléments permet de couvrir un plan d'imagerie de 12.8 mm de largeur et jusqu'à 15 mm de profondeur, ce qui permet d'imager une coupe coronale entière de cerveau de souris ou de rat. De plus, les cartes d'activation obtenues présentent une résolution de  $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}^3$  supérieure à celle d'autres techniques d'imagerie révélant des activités neurovasculaires comme l'IRM fonctionnelle. Enfin, des techniques d'imagerie optiques fonctionnelles (imagerie de sondes calciques ou d'indicateurs voltage-dépendants fluorescents) permettent d'obtenir une résolution spatiale plus élevée mais sont limitées en profondeur du fait de l'absorption de la lumière dans le tissu.



#### 1.3.3.4. Applications de l'imagerie fUS dans la littérature

De nombreuses études ont utilisé l'imagerie fUS pour l'analyse de l'intégration sensorielle chez le rongeur anesthésié ou éveillé (E. Macé et al. 2011; Gesnik et al. 2017; Aydin et al. 2020; É. Macé et al. 2018; Boido et al. 2019; Bergel et al. 2018; 2020; Brunner et al. 2020; Sans-Dublanc et al. 2021) ou chez le primate lors de tâches comportementales (Dizeux et al. 2019; Blaize et al. 2020; Norman et al. 2021). Cette technique a permis des applications cliniques du suivi de l'activité neurovasculaire cérébrale chez des nouveau-nés (Demene et al. 2017; Demené et al. 2019) ou des patients humains directement en contact avec la dure-mère lors de chirurgies (Imbault et al. 2017) ou même en imagerie transcraniale (Demené et al. 2021). D'autre part, des améliorations techniques ont été effectuées. Premièrement, des sondes miniaturisées ont permis d'effectuer des enregistrements chez des rongeurs se déplaçant librement (Urban et al. 2015). D'autres sondes ont été développées permettant chez le rongeur l'imagerie tridimensionnelle du cerveau entier au lieu de l'imagerie bidimensionnelle d'un unique plan (Brunner et al. 2020). Enfin, en utilisant le même ensemble d'analyses décrit précédemment, il est possible d'isoler le mouvement de n'importe quelle particule en mouvement au sein du tissu présentant une grande réflectivité. Les microbulles de gaz présentent un diamètre dix fois plus petit que les globules rouge et possèdent une grande réflectivité des ondes acoustiques. En les injectant en intraveineuse, il est possible de les utiliser comme agents de contraste et d'augmenter la résolution spatiale d'un facteur dix. Cette stratégie a été développée depuis quelques années (Errico et al. 2015) et permet d'obtenir des images d'une résolution de  $10 \times 10 \times 400 \mu\text{m}^3$ .

L'imagerie fUS est donc une technique bien décrite dans la littérature permettant l'obtention de cartes d'activités fines de coupes entières de cerveau (chez le rongeur). Elle est donc bien adaptée pour tester l'efficacité d'une thérapie de restauration visuelle corticale en complément des enregistrements électrophysiologiques qui permettent la détection directe de l'activité neuronale locale à une résolution spatiotemporelle plus élevée. Il est néanmoins important de connaître le lien entre ces deux activités pour l'interprétation des données générées par imagerie fUS. Or, le lien entre les activités électrophysiologique et neurovasculaire n'est pas encore totalement élucidé dans la littérature.

#### 1.3.4. Quel est la relation entre les signaux électrophysiologique et neurovasculaire ?

#### 1.3.4.1. La contribution des activités électrophysiologiques au sein du signal BOLD demeure incertaine dans la littérature

La grande majorité des études ayant étudié le lien entre les activités électrophysiologiques et la réponse neurovasculaire ont comparé les premières avec des données d'IRM fonctionnelle puisque l'imagerie fUS est une technique relativement récente. L'IRM fonctionnelle permet de détecter des réponses neurovasculaires en révélant les variations d'oxygénation du sang (on parle de signal BOLD, Blood Oxygenation Level-Dependent). La première étude ayant combiné chez le primate enregistrements électrophysiologiques et IMR fonctionnelle a démontré que les variations de BOLD corrèlent mieux avec les LFP qu'avec les activités multi-unitaires (Logothetis et al. 2001), un résultat partagé par un ensemble d'études qui montrent que les variations de potentiels d'action ne constituent pas une composante importante des variations de BOLD. Cependant, d'autres travaux montrent à l'inverse une plus grande similitude entre les décharges de potentiels d'action et les variations de BOLD qu'entre ces dernières et celles de LFP (Niessing et al. 2005; Viswanathan and Freeman 2007; Maier et al. 2008; Bartolo et al. 2011). Enfin, des manipulations causales de l'activité neuronale par optogénétique permettent de générer des variations de BOLD qui corrèlent avec les fréquences de potentiels d'action (Nir et al. 2008; Rees, Friston, and Koch 2000; Lima et al. 2014; Mukamel et al. 2005; Klink et al. 2021).

#### 1.3.4.2. Apport de l'imagerie fUS

Le débat de la contribution des activités unitaires au sein de la réponse neurovasculaire n'est donc pas clos. Il serait intéressant d'utiliser l'imagerie fUS dont la résolution spatiale est plus importante que celle de l'IRM fonctionnelle pour détecter la contribution de ces activités très locales au sein des variations de CBV. Dans la littérature, peu d'études présentent à la fois des traces l'activité neuronale et de l'imagerie fUS. De premiers travaux ont effectué des enregistrements électrophysiologiques et de l'imagerie fUS chez la souris mais de manière non simultanée (Sans-Dubanc et al. 2021). Une autre étude a permis d'établir une fonction de transfert entre les activations révélées par de l'imagerie calcique et les variations de CBV (Aydin et al. 2020). Cependant, les activations révélées par les sondes calciques ne constituent ni des activités unitaires ni des LFP. Enfin, une récente étude a réalisé des enregistrements d'activités multi-unitaires et des acquisitions d'imagerie ultrasonore chez la souris de façon simultanée. (Nunez-Elizalde et al. 2022) Leurs résultats montrent que dans le cortex visuel et dans l'hippocampe, les variations de CBV corrèlent avec les activités multi-unitaires notamment pour celles provenant de neurones inhibiteurs. Par conséquent, il reste encore très incertain quel lien relie les activités unitaires et les variations de CBV.

## 1.4. Objectifs de la thèse

Cette introduction suggère que les thérapies optogénétique et sonogénétique pourraient procurer des stratégies alternatives prometteuses pour l'activation sans contact du cortex visuel dans une démarche de restauration visuelle corticale. C'est pourquoi dans ce travail de thèse, j'ai étudié la possibilité de développer ces thérapies optogénétique (chapitre 2.1) et sonogénétique (chapitre 2.2) pour la stimulation corticale. Les conclusions de ces travaux ont ensuite été discutées dans une revue de la littérature incluse en annexe. Enfin dans la perspective d'une application clinique de ces stratégies, il est nécessaire de transférer les outils développés sur le rat chez le primate non-humain. J'ai ainsi commencé une caractérisation fine du champ visuel d'un animal pour programmer des injections virales pour l'une de ces thérapies. Ce travail abordé par une approche d'électrophysiologie et d'imagerie ultrasonore m'a amené à poser la question des corrélations entre l'activation neuronale mesurée par ces deux technologies d'investigation fonctionnelle (chapitre 2.3). En parallèle, nous avons évalué l'expression du transgène pour la thérapie sonogénétique dans le cortex visuel de primates non-humains et entraîné d'autres animaux à réaliser une tâche de détection (chapitre 2.4).

---

## RESULTATS

---

Les résultats obtenus pour répondre aux objectifs de la thèse sont organisés dans ce manuscrit en différents chapitres successifs. Dans le premier chapitre, nous établissons la **preuve de concept de la thérapie optogénétique corticale chez le rat** par imagerie ultrasonore fonctionnelle et enregistrements électrophysiologiques. Puis, nous montrons dans le deuxième chapitre la possibilité d'utiliser la **sonogénétique comme technique de stimulation corticale compatible avec une stratégie de restauration visuelle chez le rat et la souris**. Dans la perspective de l'utilisation de l'imagerie ultrasonore fonctionnelle pour caractériser l'activation consécutive à la stimulation corticale, il apparaît important de pouvoir déterminer la relation entre activité neuronale et variation du flux vasculaire. Nous avons pour cela établi dans le troisième chapitre des résultats la **relation entre les activités unitaires et les variations de CBV chez le primate non-humain**. Enfin, nous décrivons dans le dernier chapitre les **travaux préparatoires effectués pour appliquer la thérapie sonogénétique corticale** chez ce modèle animal nécessaire pour une validation préclinique d'une stratégie de restauration visuelle.

## 2.1. Chapitre 1 : preuve de concept pour la thérapie optogénétique au niveau cortical sur le rat

### 2.1.1. Résumé

Le développement d'une stratégie optogénétique de restauration visuelle corticale nécessite de démontrer la possibilité d'activer des neurones des couches profondes de V1 depuis la surface du cerveau. Cette activation dépend des propriétés de l'opsine choisie ainsi que des paramètres de la stimulation lumineuse appliquée. Il est intéressant d'utiliser une opsine sensible à la lumière rouge telle que ChrimsonR car ces longueurs d'onde se propagent mieux à travers les tissus biologiques, notamment le cerveau. D'autre part, il importe de mesurer précisément le volume d'activation engendré par la stimulation afin de pouvoir ajuster les paramètres de stimulation.

Pour mesurer cette activation corticale, l'imagerie fonctionnelle ultrasonore offre une technique de choix car elle permet de générer des cartes d'activités dans la profondeur du cortex sur des plans d'imagerie couvrant l'ensemble d'une coupe coronale entière de cerveau de rongeur avec une résolution de  $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}^3$ . Cependant, les premières expériences ayant couplé imagerie fUS et optogénétique ont montré que des stimulations réalisées avec de la lumière bleue ou rouge engendrent des activations non-spécifiques pour des puissances lumineuses au-delà de 2 mW. Notre objectif dans cette partie était de démontrer tant par électrophysiologie que par imagerie fUS que la stimulation en lumière rouge à la surface de V1 sur un rat anesthésié engendre une activation optogénétique spécifique et ce jusqu'au sein des couches corticales profondes.

Dans un premier temps, nous avons démontré que le vecteur AAV9-7m8-CamKII-ChrimsonR-tdT permet une expression efficace de l'opsine ChrimsonR au sein des neurones excitateurs de V1 chez le rat (Figure 1, a). Nous avons ensuite réalisé chez 10 animaux l'imagerie fUS des réponses à une stimulation visuelle de l'œil, puis des réponses à une stimulation optogénétique en surface de V1 et à une stimulation contrôle de l'hémisphère cérébral n'exprimant pas ChrimsonR (Figure 1, b-d). Ces acquisitions ont été réalisées de manière successive sur l'ensemble des plans d'imagerie compris entre -4 et -8.5 mm depuis le Bregma, de manière à pouvoir visualiser l'ensemble du CGL, du SC et de V1. Les résultats montrent que la stimulation optogénétique du cortex visuel primaire injecté engendre une activation spécifique jusque dans les couches corticales profondes, et ce à une puissance lumineuse de 7 mW (Figure 1, b-d). Nos enregistrements

électrophysiologiques confirment une activation neuronale dans toute la profondeur du cortex en accord avec l'augmentation de CBV consécutive à la stimulation optogénétique du cortex (Figure 1, e). Les latences très courtes de ces réponses neuronales sont en accord avec une activation optogénétique directe et non une activation visuelle ou une réponse non spécifique (Figure 1, f). Cette activité mesurée par fUS et par électrophysiologie est bien spécifique de l'activation optogénétique par l'opsine car la même stimulation lumineuse sur l'hémisphère non injecté ne produit pas d'activation de V1 (Figure S1).

Par la suite, nous avons regardé l'évolution des réponses détectées par enregistrements électrophysiologiques et par imagerie fUS en fonction de l'irradiance utilisée (Figure 2). Les résultats démontrent une relation de dose-réponse tant par électrophysiologie que par fUS avec une très bonne corrélation tant pour les seuils de détection que pour le maximum d'activation (Figure 2, b-c). Si le nombre de neurones activés augmente avec l'irradiance, leur répartition dans la profondeur du cortex demeure identique (Figure 2, c).

Pour déterminer si cette activation neuronale se propage au-delà de V1, nous avons mesuré les réponses fonctionnelles dans d'autres aires visuelles connues pour établir des connexions fonctionnelles avec cette aire comme le CGL ou V2. Les résultats obtenus par l'imagerie fUS et par les enregistrements électrophysiologiques montrent que cette activité se propage au CGL (Figure 3). Les coupes histologiques montrent que l'expression de ChrimsonR au sein du CGL est uniquement axonale et / ou dendritique et n'est pas présente au sein des corps cellulaires (Figure S2). De plus, les latences des activations optogénétiques sont supérieures à celles obtenues au sein de V1 mais toujours inférieures à celles d'une activation visuelle naturelle (Figure 3, d). Ces deux résultats suggèrent que la propagation de l'activité de V1 au CGL est assurée par des neurones de la couche 6 de V1 et contactant les neurones du CGL. D'autre part, les résultats obtenus par l'imagerie fUS et par les enregistrements électrophysiologiques montrent que l'activité initiée au sein de V1 se propage au sein de V2 (Figure 4). A nouveau, l'analyse des latences des réponses neuronales dans V2 (Figure 4 d) suggère que leur activation optogénétique est indirecte et est assurée par des neurones de V1 directement activés par la stimulation lumineuse.

En conclusion, ces travaux démontrent la faisabilité de stimuler le cortex visuel du rat par une activation optogénétique et que cette activation neuronale se propage ensuite au-delà de V1. Cette activation optogénétique est efficace dans la totalité de l'épaisseur du cortex visuel de rat depuis la surface. Les études suivantes devront adresser la résolution spatiale de ces activations pour la production de pattern lumineux.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Mickaël Tanter à l'Institut Langevin, grâce à laquelle nous avons pu disposer d'un scanner à ultrasons. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication au sein du journal *Scientific Reports* le 15/06/2021. L'article original est inséré ci-après.

### 2.1.2. Article scientifique.



OPEN

## Functional ultrasound imaging of the spreading activity following optogenetic stimulation of the rat visual cortex

M. Provansal<sup>1</sup>✉, G. Labernède<sup>1</sup>, C. Joffrois<sup>1</sup>, A. Rizkallah<sup>1</sup>, R. Goulet<sup>1</sup>, M. Valet<sup>1</sup>, W. Deschamps<sup>1</sup>, U. Ferrari<sup>1</sup>, A. Chaffiol<sup>1</sup>, D. Dalkara<sup>1</sup>, J. A. Sahel<sup>1,2,3</sup>, M. Tanter<sup>4</sup>, S. Picaud<sup>1</sup>, G. Gauvain<sup>1,5</sup> & F. Arcizet<sup>1,5</sup>

Optogenetics has revolutionized neurosciences by allowing fine control of neuronal activity. An important aspect for this control is assessing the activation and/or adjusting the stimulation, which requires imaging the entire volume of optogenetically-induced neuronal activity. An ideal technique for this aim is fUS imaging, which allows one to generate brain-wide activation maps with submesoscopic spatial resolution. However, optical stimulation of the brain with blue light might lead to non-specific activations at high irradiances. fUS imaging of optogenetic activations can be obtained at these wavelengths using lower light power (<2mW) but it limits the depth of directly activatable neurons from the cortical surface. Our main goal was to report that we can detect specific optogenetic activations in V1 even in deep layers following stimulation at the cortical surface. Here, we show the possibility to detect deep optogenetic activations in anesthetized rats expressing the red-shifted opsin ChrimsonR in V1 using fUS imaging. We demonstrate the optogenetic specificity of these activations and their neuronal origin with electrophysiological recordings. Finally, we show that the optogenetic response initiated in V1 spreads to downstream (LGN) and upstream (V2) visual areas.

Optogenetics has revolutionized investigation of the central nervous system<sup>1–5</sup> by allowing fine control of neurons in living systems. A key aspect of optogenetic investigation of neuronal circuits is the read-out of the activity since it demonstrates the efficacy of the stimulation and offers the possibility to adjust it. Ideally, the technique on which it relies should have good spatial and temporal resolutions and a spatial extent covering the whole brain.

Electrophysiological recordings can report optogenetic-induced neuronal activity with unmatched temporal resolution, but over a very small spatial area<sup>6</sup>. Besides, they need intracortical penetration. Calcium imaging is a technique that also allows a temporally fine read-out of the activity but it is spatially limited in depth due to light absorption. Conversely, Lee and colleagues have demonstrated the possibility to combine optogenetics with fMRI (a combination named ofMRI) in mice<sup>7</sup>, opening up a new horizon for mapping genetically specified neural circuits. Since then, ofMRI has been applied for the investigation of different brain pathways in rodents<sup>8–10</sup> and primates<sup>11</sup>, and for the assessment of neural transplant networks<sup>12</sup>. However, fMRI has a limited spatial resolution higher than 1 mm and requires complex equipments<sup>13</sup>. Like fMRI, ultrafast functional ultrasound imaging (fUS) can provide brain-sized maps of neurovascular activity changes, with a higher spatial resolution (100 μm × 100 μm) even in deep structures (up to 1.5 cm)<sup>14–16</sup>. This technique has been used to investigate sensory processing in anesthetized<sup>17</sup>, awake<sup>17–20</sup> and asleep<sup>21</sup> rodents, and in behaving primates<sup>22–24</sup>. fUS imaging and electrophysiological recordings can, therefore, be used to describe the dynamics of local neuronal activity accurately whilst scanning neurovascular activity over the entire brain.

Recent studies have showed some limitations of using fUS imaging as a read-out technique for cerebral activity after an optogenetic stimulation. For example, Rungta and colleagues showed that optical stimulation of the brain using blue light could generate non-specific activations in naïve mice<sup>25</sup>, at light powers higher than 2 mW

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France. <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, The University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA. <sup>3</sup>Department of Ophthalmology and Vitreo-Retinal Diseases, Fondation Ophtalmologique Rothschild, 75012 Paris, France. <sup>4</sup>Physics for Medicine Paris, INSERM, CNRS, Ecole Supérieure de Physique Et de Chimie Industrielles (ESPCI Paris), Paris Sciences Et Lettres (PSL) Research University, 75012 Paris, France. <sup>5</sup>These authors contributed equally: G. Gauvain and F. Arcizet. ✉email: matthieu.provansal@inserm.fr

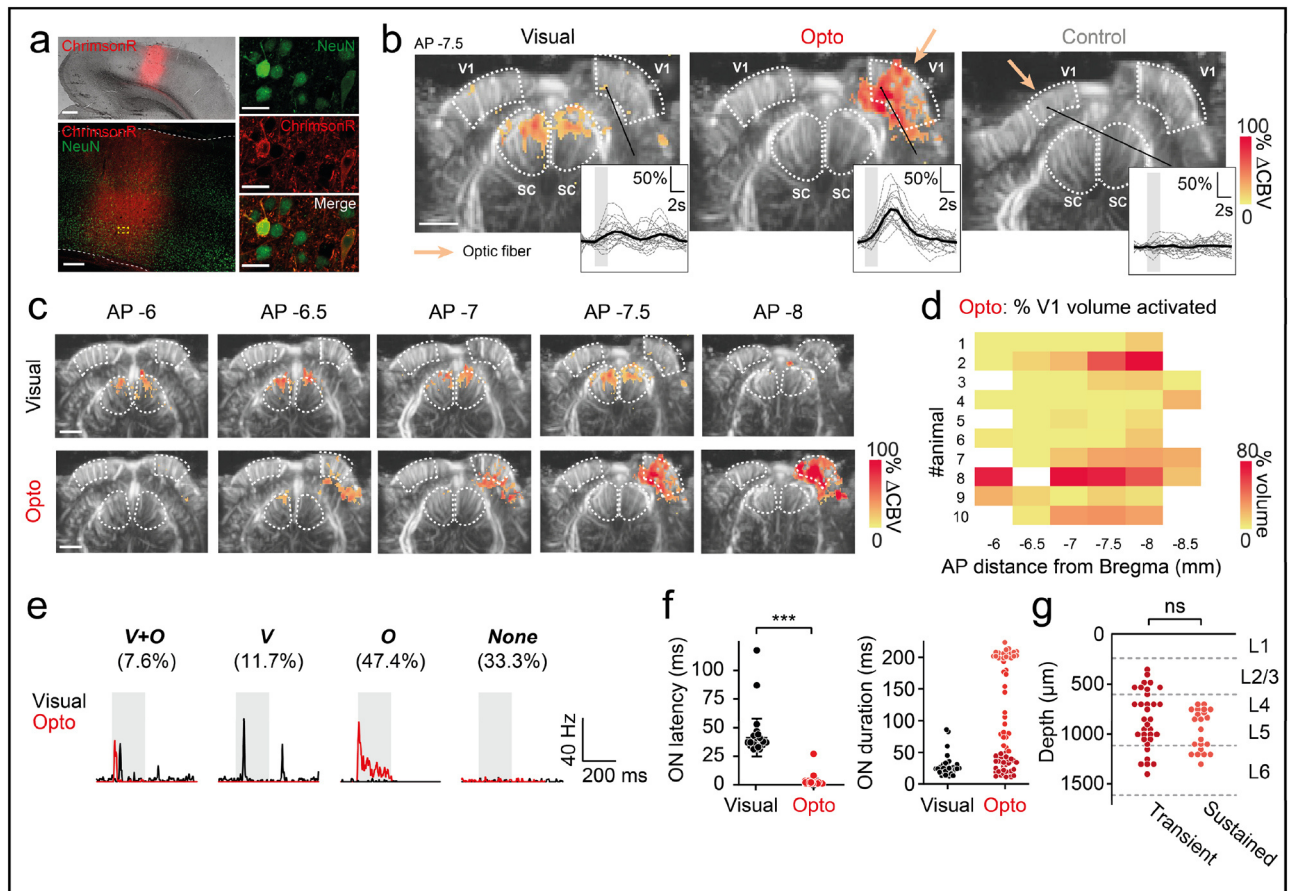


(corresponding to irradiances higher than  $18 \text{ mW mm}^{-2}$ ), restricting the range of light powers one can use to activate cerebral structures and consequently the depth of targeted areas. Recently, one study has demonstrated the possibility to detect specific optogenetic activations following blue light illumination of the retrosplenial cortex in Thy-ChR2 mice or the illumination of specific neuronal subpopulations of the superior colliculus in other transgenic lines<sup>19</sup> using lower light power ( $0.3 \text{ mW}$ , corresponding to an irradiance of  $1.5 \text{ mW mm}^{-2}$ ) to prevent non-specific activation. Another publication from the same group used the same combination of parameters to map collicular cell-specific activation circuits and their associated behaviors<sup>26</sup>. However, optogenetic activation at such low irradiances is uncertain in neurons with lower AAV-mediated expression of microbial opsins. In addition, working with blue wavelengths limits light penetration in the brain and therefore limits the maximal depth of neurons one can directly activate from the surface with low irradiances. Conversely, red-shifted opsins offer a powerful alternative for deeper neuronal stimulation, as red light propagates deeper and can be used safely at higher intensities to activate neurons than blue light<sup>27–29</sup>. In the present study, we show that red light stimulation at the cortical surface can activate visual neurons localized in deep cortical layers without triggering a thermal hemodynamic response and toxicity. In addition, we scale the entire volume of V1 activation following a focal red light stimulation at the cortical surface. We prove the optogenetic specificity of these activations even at high irradiances and we recorded their electrophysiological correlates. We were also able to follow the propagation of this information in other visual brain structures (i.e. LGN and V2). More generally, this work shows that fUS imaging has the potential to provide a clear, brain-wide mesoscopic view of the neuronal activities resulting from optogenetic stimulation even in deep structures, such as the LGN, inaccessible to optical techniques and with a higher resolution than fMRI.

## Results

**fUS imaging of V1 optogenetic activation in rats.** We used the optogenetic actuator ChrimsonR in the visual cortex of naïve Long-Evans rats, because of its red-shifted opsin properties<sup>27,30,31</sup>. We maximized the optogenetic activation of V1 by using the CaMKII promoter to ensure expression limited to the excitatory neurons of V1. Indeed, a ubiquitous promoter might lead to the silencing of pyramidal neurons through the recruitment of inhibitory neurons. ChrimsonR was fused to the fluorescent reporter tdTomato to facilitate the visualization of transfected areas. Following preliminary screening, we used the AAV9-7m8 mutated viral capsid to express ChrimsonR in the V1 neurons of Long-Evans rats (Fig. 1a). The mean rate of neuronal transfection was 5.5% over all cortical layers (Fig. S1). ChrimsonR expression was not restricted to the soma, but spread to the axons and dendrites (Fig. 1a). We assessed the efficacy of the optogenetic stimulation of V1 cortical neurons, by using fUS imaging to measure brain activity in a large proportion of the brain: from AP  $-3.5 \text{ mm}$  to AP  $-8 \text{ mm}$ , the zone in which most of the early visual system areas are located. Activity in the cortical layers was assessed following either direct stimulation of the contralateral eye with a white LED ( $58 \text{ mW cm}^{-2}$ ), or stimulation at  $595 \text{ nm}$  delivered with an optic fiber placed at the surface of the transfected or non-transfected V1 areas ( $7 \text{ mW}$ ,  $\sim 140 \text{ mW mm}^{-2}$  at the brain surface) (Fig. 1b). We chose to use durations and magnitudes of parameters similar to those previously used<sup>17,25</sup> for stimulation of the eye or cortex ( $2 \text{ s}$  at  $4 \text{ Hz}$  or  $20 \text{ Hz}$  for stimulation of the eye and cortex, respectively, separated by a  $13 \text{ s}$  period of darkness. This cycle was performed 20 times). For eye stimulation (Fig. 1b, left), we first imaged V1 with a single imaging plane at AP  $-7.5 \text{ mm}$  and constructed an activation map including only pixels displaying significant CBV (cerebral blood volume) responses ( $p < 0.05$  with Bonferroni-Holm correction, Wilcoxon signed-rank test, one-tailed, relative to baseline activity). With fUS imaging, we detected strong activation in both the ipsilateral and contralateral superior colliculi (SC) (ipsilateral,  $n = 121/488$  activated pixels; contralateral,  $n = 134/421$  activated pixels), but almost no activation in the ipsilateral and contralateral V1 areas (ipsilateral,  $n = 8/634$  activated pixels; contralateral,  $n = 9/370$  activated pixels). The lack of response detected with fUS imaging in both V1 areas and the strong signal in both SC may reflect the retinotectal nature of most rodent retinal outputs<sup>32</sup> or an effect of anesthesia<sup>33</sup>. An increase in CBV was already clearly visible on single-cycle responses (gray dashed lines), as illustrated for the significant pixel (#14-92) in the ipsilateral V1 area (insert). Following direct stimulation of the contralateral eye, the mean response (black curve) peaked 2 s after the two-second stimulation represented by the patch in gray (mean:  $19.8 \pm 18.3\%$ ). For cortical stimulation (Fig. 1b, center), we observed a broad activation of the ipsilateral V1 area ( $n = 310/634$  activated pixels). The activation spread out of the V1 area at each border (medial and ventral) with V1 projections onto other visual areas. Single-cycle responses of the same example pixel showed larger, less variable increases in CBV variation than for stimulation of the contralateral eye (optogenetic, mean:  $65.8 \pm 32.6\%$ ,  $p < 0.0001$ , Mann-Whitney). A previous study<sup>25</sup> showed that blue light delivery to the brain could itself generate non-specific changes in CBV at light powers higher than  $2 \text{ mW}$  (irradiances higher than  $18 \text{ mW mm}^{-2}$ ). We therefore performed a control stimulation by locating the optic fiber at the surface of the non-injected V1 area, which did not express ChrimsonR-tdT (Fig. 1b, right). We used the same light stimulation parameters for this control as before. We detected no significant CBV responses in the non-injected V1 area under such optogenetic stimulation conditions.

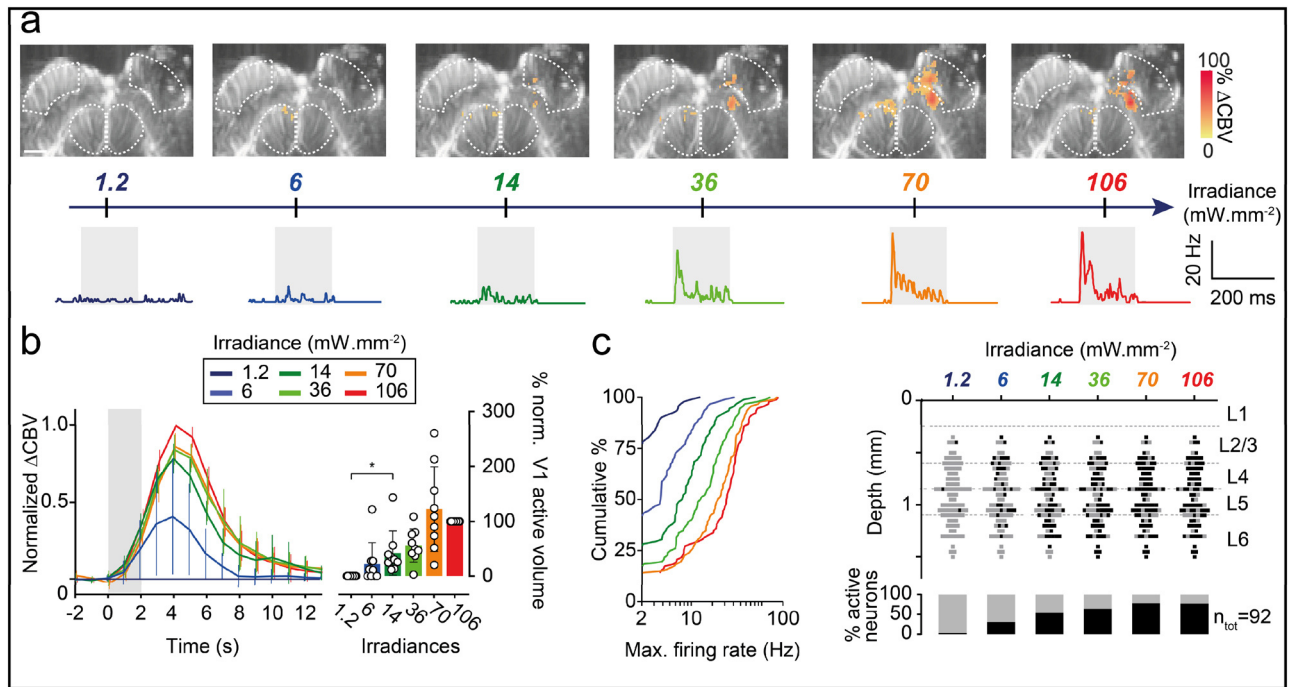
We further characterized the V1 activation volume generated by contralateral eye stimulation or by stimulation of the transfected V1 area, by imaging all the planes containing V1 (from AP  $-6$  to  $-8 \text{ mm}$ , Fig. 1c–d). As shown in Fig. 1b, direct eye stimulation induced CBV responses mostly in the SC areas, but very little activation was observed in the two V1 areas (mean:  $0.05 \pm 0.12\%$ ). Strikingly for the same animal shown (as shown in Fig. 1c), direct optogenetic stimulation of the injected V1 area generated significantly stronger CBV responses, with a mean active volume of  $37\%$  (range:  $0.5$  to  $75.9\%$ ). The percentage mean active injected V1 area, over all animals, was higher for optogenetic cortical stimulation than for direct eye stimulation (optogenetic, mean:  $16.2 \pm 17.8\%$ , Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p = 0.001$ , Fig. S1). Neurovascular activity and ChrimsonR expression were distributed similarly along the AP axis and their amplitudes were correlated (Fig. 1d, Fig. S1). Again, our control experiments demonstrated that direct optogenetic stimulation of a non-transfected cortical



**Figure 1.** V1 neurovascular and neuronal activations resulting from cortical surface stimulation in rats. **(a)** Left:  $2.5\times$  imaging (top) and  $20\times$  confocal imaging of a brain section showing the localization of ChrimsonR in V1. White dashed lines delimit the cortical surface and border between V1 and the white matter. Right: close-up ( $40\times$ ) of the area delimited by the yellow lines in the previous image, showing two ChrimsonR-expressing neurons. Scale bars:  $500\ \mu\text{m}$ ,  $200\ \mu\text{m}$ ,  $20\ \mu\text{m}$ . **(b)** fUS activation maps obtained after visual stimulation of the contralateral eye (left), optogenetic stimulation of the ipsilateral V1 area expressing ChrimsonR (middle) and control optogenetic stimulation of the uninjected contralateral V1 area (right), from a single imaging plane (AP  $-7.5\ \text{mm}$ ) from the same animal. White dashed lines delimit the V1 and SC areas. Colored pixels indicate significant CBV variation (Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni-Holm correction). Right insets: patterns of single-pixel activation. Gray lines represent single-trial activity ( $n=20$ ) and the black line represents the mean CBV variation. Colored patches indicate light stimulation (duration: 2 s) **(c)** fUS activation maps for visual and optogenetic activation, for all imaging planes (AP  $-6\ \text{mm}$  to AP  $-8\ \text{mm}$ ) in which V1 (delimited by white dashed lines) is present, from the same animal (animal #2). **(d)** Left: percentage of V1 activated during optogenetic stimulation for each fUS imaging plane, for all animals ( $n=10$ ). Right: AP distribution of the ChrimsonR expression area on brain sections. **(e)** Spike density function (SDF) of typical V1 single units during visual (black lines) or optogenetic (red lines) activation. Four subpopulations of neurons were identified: double-responsive ( $n_{V+O}=13$ ), responsive to the visual ( $n_V=20$ ) or optogenetic stimulus only ( $n_O=81$ ), non-responsive ( $n_{\text{None}}=57$ ). **(f)** Left: ON response latencies for visual ( $n=33$  units) and optogenetic ( $n=76$  units) stimulation (Mann-Whitney,  $p<0.0001$ ). Right: ON response durations for visual ( $n=33$  units) and optogenetic stimulation ( $n=72$  units). **(g)** Depth profile of transient (ON duration  $<51\ \text{ms}$ ,  $n=33$  units) and sustained (ON duration  $>197\ \text{ms}$ ,  $n=22$  units) neurons activated by optogenetics. **(c–d)** Scale bar:  $2\ \text{mm}$ . The irradiance used for optogenetic and control stimulation was  $140\ \text{mW}\ \text{mm}^{-2}$ .

area resulted in no activation. The findings for these control conditions indicate that the parameters we used for optogenetic stimulation at the cortical surface did not generate CBV variations in areas into which the virus was not injected (mean:  $0\pm 0\%$ ). These observations indicate that the optogenetic light stimulation used here does not trigger a vascular response detectable by fUS imaging. Consequently, with fUS imaging, we were able to visualize the entire volume of an optogenetically evoked response resulting from focal stimulation within the primary visual cortex.

We then sought to confirm that the observed changes in blood volume following optogenetic stimulation at the surface of V1 were indeed due to an increase in neuronal activity, and not to indirect factors, such as heating. We therefore performed electrophysiological recordings of V1 during the stimulation of the contralateral eye with white light (200 ms, 1 Hz, 100 cycles,  $58\ \text{mW}\ \text{cm}^{-2}$ ) or of the injected V1 area with light at 595 nm (200 ms, 1 Hz,



**Figure 2.** Dose–response relationship of optogenetic activations (a) Top: fUS activation maps of a single imaging plane (AP  $-7.5$  mm) from animal #4 at different irradiances. Scale bar: 2 mm. White dashed lines delimit the V1 and SC areas. Bottom: SDF from a typical V1 single unit during optogenetic stimulation for 200 ms (gray patch) at different irradiances. (b) Left panel: mean CBV variation over all animals ( $n=9$ ) for each irradiance. The values for each animal were normalized against those obtained at  $106$  mW mm $^{-2}$ . Error bars represent the standard deviation. The colored patch corresponds to the 2 s optogenetic stimulation. Right panel: normalized active volumes of the ipsilateral V1 area for each irradiance. Open circles are individual values, bars represent the mean and the standard deviation ( $n=9$  animals, Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p<0.05$ ). (c) Left: cumulative distribution of the mean maximal firing rates of all recorded V1 single units ( $n=92$ ) during optogenetic stimulation, for each irradiance. Right panel, top: depth profile of V1 single units activated (black squares) or not (gray squares) by the optogenetic stimulation, for each irradiance ( $n=92$  single units). Bottom: percentage of active (black) and non-responsive (gray) neurons for each set of conditions.

100 cycles,  $140$  mW mm $^{-2}$ ). We used the Spyking Circus algorithm<sup>34</sup> to sort the multi-unit recordings, to obtain single-cell responses. In total, we recorded a population of 171 neurons from nine animals expressing ChrimsonR in V1. These neurons displayed several distinctive patterns of activity under both direct eye and optogenetic stimulation conditions (Fig. 1e). We plotted the spike density function (SDF) of four V1 neurons for both direct eye stimulation (black lines) and optogenetic conditions (red lines), to highlight the diversity of these activity patterns. Based on the profiles of visual and optogenetic responses, we classified neurons into four different groups: neurons responding to both visual and optogenetic stimulation (V + O neurons,  $n=13$ , 7.6%, Wilcoxon signed-rank test, two-tailed,  $p<0.01$ , between baseline:  $[-100$  0] ms, and stimulus presentation window:  $[0$  200] ms), to visual stimulation only (V neurons,  $n=20$ , 11.7%), to optogenetic stimulation only (O neurons,  $n=81$ , 47.4%), and non-responsive neurons ('None' neurons,  $n=57$ , 33.3%). Most of the neurons responding to visual stimulation displayed phasic responses, with an ON response occurring after the start of stimulation followed, in some cases, by an OFF response. By contrast, the neurons responding to optogenetic stimulation displayed a unique ON response. We characterized the neuronal activation further, by comparing the onset latencies and durations of the V1 responses for both direct eye and optogenetic stimulation conditions, for V, O and V + O neurons ( $n=109$ , Fig. 1f). As observed for the representative neurons shown in Fig. 2a, the onset latencies of V1 responses were significantly shorter after optogenetic stimulation (mean:  $1.76 \pm 3.14$  ms,  $n=76$  units) than after stimulation of the contralateral eye (mean:  $41.24 \pm 16.61$  ms,  $n=33$  units, Mann–Whitney,  $p<0.0001$ ). These very short response latencies for optogenetic stimulation are consistent with the direct activation of transfected neuronal cell bodies, bypassing all retinal synapses, by contrast to natural visual signal transmission. We also analyzed the duration of visual/optogenetic responses, to determine whether V1 neurons presented transient or sustained activity, according to the type of stimulation. For direct eye stimulation, the duration of neuronal responses was tuned on a single ensemble, with a mean duration of activation of  $28.09 \pm 17.05$  ms ( $n=33$ ). By contrast, in optogenetic conditions, two subgroups emerged: neurons displaying transient and sustained responses. Based on these results, we defined two subsets of neurons: transient (durations  $<51$  ms,  $n=33$ ) and sustained (durations  $>197$  ms,  $n=22$ ) neurons. The remaining neurons ( $n=17$ ) had intermediate response durations. The transient responses may result from inhibitory cortical feedback from interneurons or a difference in voltage-gated channel properties between neuronal subtypes leading to the silencing of these neurons. We found no



Irradiance (mW mm <sup>-2</sup> )	Power (mW)
142	7.1
140	7.0
106	5.3
70	3.5
36	1.8
14	0.7
6	0.3
1.2	0.06

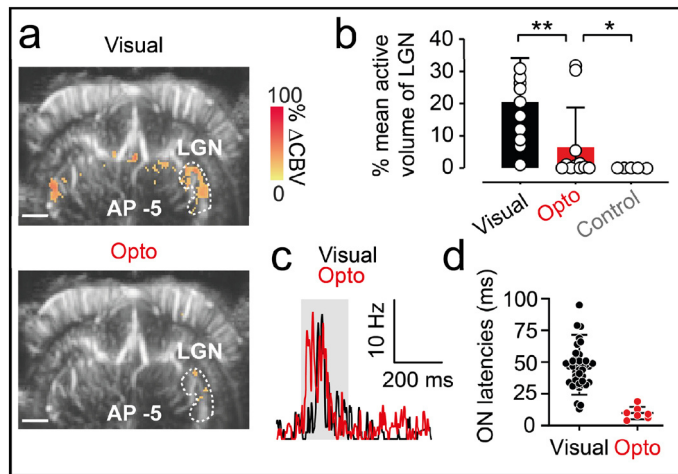
**Table 1.** 595 nm light irradiances and powers used in this study.

significant difference in the depth distribution of transient and sustained neurons (Fig. 1g), revealing an absence of correlation between neuronal response patterns and potential decreases in stimulus intensity with tissue depth; transient and sustained neurons were recorded within the same cortical layers (L2/3 to L6), suggesting a direct activation of cortical neurons by optogenetic stimulation at the cortical surface. We then assessed the specificity of optogenetic activation, by performing electrophysiological recordings on naive animals. In the animals in which no injection was performed (Fig. S1,  $n = 3$  animals), almost all the recorded neurons ( $n = 187/188$ ) displayed a total absence of response to optogenetic stimulation; the only responsive neuron had a very low response rate (3.89 Hz) relative to its baseline activity (1.71 Hz,  $p = 0.0014$ ). In this experiment, most neurons displayed a visual response when the contralateral eye was stimulated ( $n = 80/118$ ), whereas another group of neurons ( $n = 37/118$ ) did not respond to either visual or optogenetic stimulation. Thus, by recording single-cell activities in transfected areas of V1, we were able to demonstrate that optogenetic light stimulation at the surface of the cortex triggered both an increase in cerebral blood volume, as shown by fUS imaging, and direct neuronal activation. We can therefore conclude that the fUS variations we observed reflected the optogenetic activation of V1 neurons. As in fUS imaging, we found that a larger number of neurons responded to optogenetic stimulation than to visual stimulation (Fig. 1e), consistent with the broader activation of areas in response to optogenetic stimulation than following direct contralateral eye stimulation and fUS imaging.

#### fUS imaging and electrophysiological recordings reveal the dose–response relationship of optogenetic activations to different irradiances.

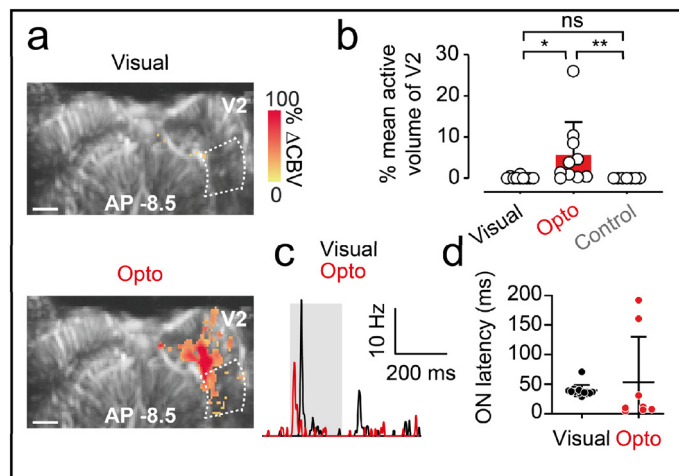
As both single-cell recording and fUS imaging can be used to monitor optogenetic neuronal activation, we compared the responses obtained with these two techniques for different irradiances (for light power equivalences, see Table 1). We first imaged the same single V1 plane (AP  $-7.5$  mm) by fUS while optogenetically stimulating the surface of the ChrimsonR-expressing V1 area with various irradiances (from 1.2 to 106 mW mm<sup>-2</sup>). The size of the active volume within the injected V1 area increased with irradiance, with a major increase between 36 and 70 mW mm<sup>-2</sup> and a slight decrease at 106 mW mm<sup>-2</sup> (Fig. 2a). One also found that the contralateral SC was slightly activated at irradiances above 1.2 mW mm<sup>-2</sup>. For each irradiance, we then calculated the mean CBV variation over all significant pixels in the V1 area and over all trials (Fig. 2b, left panel). For each animal, we normalized these values against those obtained for the highest irradiance (106 mW mm<sup>-2</sup>). Normalized CBV variation peaked 4 s after the start of stimulation. Peak CBV values increased as a function of irradiance. No CBV variation was recorded for the lowest irradiance (1.2 mW mm<sup>-2</sup>). Difference in peak CBV values relative to that for the lowest irradiance tested started to become significant from 6 mW mm<sup>-2</sup> onwards (1.2 mW mm<sup>-2</sup>, mean:  $0 \pm 0$ ; 6 mW mm<sup>-2</sup>, mean:  $0.36 \pm 0.34$ , Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p < 0.05$ ). For each irradiance, we then calculated the percentage normalized activated ipsilateral V1 volume (Fig. 2b, right panel) in all animals ( $n = 9$ ). We again observed an increase in the normalized active volume of V1 with irradiance. Difference with respect the value obtained at the lowest irradiance became significant from 6 mW mm<sup>-2</sup> onwards (1.2 mW mm<sup>-2</sup>, mean:  $0 \pm 0\%$ ; 6 mW mm<sup>-2</sup>, mean:  $22.3 \pm 39.0\%$ , Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p < 0.05$ ). We then investigated whether the variation of CBV responses observed with irradiance was related to the number of neurons recruited. The SDF from an example single-unit was determined for the different irradiances; the amplitude of this single-unit increased with irradiance: over 100 trials, this neuron had an average peak response of 8.2 Hz (SEM  $\pm 3.87$ ) for 6 mW mm<sup>-2</sup> and 36.6 Hz (SEM  $\pm 7.3$ ) for 106 mW mm<sup>-2</sup> (Fig. 2a). We generalized this analysis by plotting the cumulative distribution of the mean maximal firing rates for each irradiance (Fig. 2c, left panel). The cumulative curves reached a plateau for lower maximal firing rates with decreasing irradiance. We noted a significant difference in distribution between 1.2 mW mm<sup>-2</sup> and irradiances of 6 mW mm<sup>-2</sup> and above (1.2 mW mm<sup>-2</sup>, median: 0 Hz; 6 mW mm<sup>-2</sup>, 3.8 Hz, Kolmogorov–Smirnov test,  $p < 0.0001$ ), demonstrating that electrophysiological recordings and fUS imaging had equivalent sensitivities. Finally, in our total population of V1 neurons, the proportion of responsive neurons increased with irradiance (from 28/92 units at 6 mW mm<sup>-2</sup> to 71/92 units at 106 mW mm<sup>-2</sup>, Fig. 2c, right panel). Interestingly, the depth distribution of the activated neurons did not change with increasing irradiance (Fig. 2c, right panel). It was, therefore, possible to activate neurons from deep cortical layers even at very low irradiances.

**Spread of optogenetic activation to downstream and upstream visual areas.** The results described above relate to optogenetic activation in V1 with the optic fiber placed at the surface of the primary visual cortex. We then investigated whether the activity initiated in V1 was functionally relevant and spread to



**Figure 3.** Spread of optogenetic activation to the LGN. **(a)** fUS activation maps obtained during visual stimulation of the contralateral eye (top) and optogenetic stimulation of the ChrimsonR-expressing ipsilateral V1 area (bottom) from a single imaging plane in which the LGN is present (AP -5 mm) from the same animal. White dashed lines delimit the ipsilateral LGN. Scale bar: 2 mm. **(b)** Percentage active volume of the LGN after visual, optogenetic or control stimulation. For both visual and optogenetic stimulations, we show the volumes of the LGN ipsilateral to the injection, whereas, for control stimulations, the volume of the contralateral LGN is shown. Open circles represent mean values over all imaging planes for each animal (visual and optogenetic stimulation,  $n = 11$ , Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p = 0.0068$ ,  $n = 5$  for control, Mann-Whitney test, one-tailed,  $p = 0.0288$ ), bars represent the mean for all animals. **(c)** SDF of a typical LGN single unit responding to visual (black line) and optogenetic (red line) stimulation of the ipsilateral V1 area. **(d)** ON latencies of V1 and LGN single-unit responses to visual (V1,  $n = 33$  units, LGN,  $n = 42$  units) or optogenetic stimulation of V1 (V1,  $n = 29$  units, LGN,  $n = 7$  units. Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ). The irradiance used for optogenetic and control stimulation was  $142 \text{ mW mm}^{-2}$ .

other visual structures up- or downstream. For the downstream pathway, LGN terminals end in V1 at the depth of cortical layer IV, whereas cortical V1 layer VI sends feedback connections to the LGN. We thus hypothesized that injecting AAV9-7m8-CaMKII-ChrimsonR-tdT into V1 would increase ChrimsonR expression in at least one of these two categories of fibers and that the optogenetic activation of V1 would lead to direct activation of the LGN via LGN terminals in V1, or to an indirect activation of the LGN through feedback connections in V1 cortical layer VI. Histological analyses confirmed that some ChrimsonR expression occurred in the LGN, but we were unable to identify any ChrimsonR-expressing cell bodies in the LGN, suggesting that only retrograde fibers originating from cortical V1 layer VI expressed this opsin (Fig. S2). We imaged the planes containing the LGN (AP -3.5 to AP -5.5 mm). Figure 3a shows the fUS imaging planes at AP -5 mm for the direct eye and optogenetic stimulation conditions. We noted a slight activation of the visual cortex following visual stimulation (see Fig. 1b), and a strong activation of the ipsilateral LGN ( $n = 85/225$  active pixels) when the contralateral eye was stimulated with the white LED, suggesting that this kind of stimulation was more appropriate for LGN and SC activations than for the visual cortex. Indeed, in the 11 animals (Fig. 3b), the mean percentage of the LGN volume visually activated was  $20.5 \pm 13.7\%$  which is much greater than the volume activation obtained for V1 (less than 1%). When the injected V1 surface was stimulated with the optic fiber (Fig. 3a), CBV responses increased significantly in the ipsilateral LGN, but with a much smaller number of activated pixels ( $n = 12/225$  pixels) than for visual stimulation. We also performed a control optogenetic stimulation, in which we stimulated the non-injected V1 area. We observed no activation of the ipsilateral LGN, confirming that, on stimulation of the injected hemisphere, ipsilateral LGN activation was due to optogenetic activation of LGN terminals in V1 or feedback from the V1 area (Fig. S2). In the 11 animals tested, the active LGN volumes for visual stimulation were larger than those for optogenetic stimulation (visual, mean:  $20.5 \pm 13.7\%$ ; optogenetic, mean:  $6.5 \pm 12.3\%$ , Wilcoxon signed-rank test,  $p = 0.0068$ ). In addition, for the five animals tested by optogenetic stimulation of the non-transfected V1 area, we detected no significant responsive pixels (Fig. 3b, mean:  $0 \pm 0\%$ ,  $n = 5$  animals). We also performed single-cell recordings in the LGN, to demonstrate that the neurovascular activations imaged by fUS in the LGN coincided with the activation of LGN neurons (Fig. 3c). We recorded a total of 153 neurons in the LGN. Only two units responded to both visual and optogenetic stimulation; seven units were responsive only to optogenetic stimulation, and 40 units were responsive only to visual stimulation ( $n = 7$  animals). The vast majority of LGN neurons were unresponsive to both types of stimulation. The distribution of onset latencies following direct eye stimulation was broader for LGN than for V1 single units (Fig. 3d, mean:  $47.88 \pm 23.55$  ms,  $n = 42$  units, and see Fig. 1f). This may reflect the recording of both cells activated by retinal ganglion cells and cells retrogradely activated by the V1 area, which have higher latencies. Following optogenetic stimulation at the surface of the V1 area, the onset latencies for LGN neurons were shorter than those following visual stimulation (mean:  $9.86 \pm 4.95$  ms,  $n = 7$  units, Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). However, these response latencies were greater than those recorded in V1 ( $n = 42$  units. Mann-Whitney,  $p < 0.0001$ , see Fig. 1f for V1 units). This result suggests that



**Figure 4.** Spread of the optogenetic activation to V2. **(a)** fUS activation maps obtained during visual stimulation of the contralateral eye (top) and optogenetic stimulation of the ChrimsonR-expressing ipsilateral V1 area (bottom) and control stimulation of the uninjected contralateral area from a single imaging plane (AP  $-7.5$  mm) containing the V2 area. White dashed lines delimit the ipsilateral V2 area. Scale bar: 2 mm. **(b)** Percentage active volume of V2 after visual, optogenetic or control stimulation. For both visual and optogenetic stimulation, we show the volumes of V2 ipsilateral to the injection, whereas, for the control, we show the volume of the contralateral V2. Open circles represent mean values over all imaging planes for each animal (visual and optogenetic,  $n = 1$ , Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p = 0.002$ ,  $n = 7$  for control, Mann–Whitney test, one-tailed,  $p = 0.0004$ ), bars represent the mean over all animals. **(c)** SDF of a typical V2 single unit responding to visual (black line) and optogenetic (red line) stimulation of the ipsilateral V1 area. **(d)** ON latencies of V1 and V2 single-unit responses to visual (V1,  $n = 33$  units, V2,  $n = 14$  units) or optogenetic stimulation of V1 (V1,  $n = 76$  units, V2,  $n = 8$  units). The irradiance used for optogenetic and control stimulation was  $140 \text{ mW mm}^{-2}$ .

the optogenetically activated LGN single units recorded here were activated indirectly, by retrograde fibers from V1 cortical layer VI, as suggested by the histological data.

We also investigated whether V1 optogenetic stimulation could spread to the direct upstream visual area toward which V1 projects: the V2 area. We obtained fUS activation maps in different imaging planes (AP  $-6$  to AP  $-8$  mm) in which the entire V2 area was present after either direct stimulation of the contralateral eye or optogenetic stimulation at the surface of the V1 area. We show representative activation maps from single imaging planes (AP  $-8.5$  mm) in Fig. 4a. Visual stimulation of the contralateral eye led to almost no activation of the V2 area on the same side as the injected V1. By contrast, optogenetic stimulation of the transfected V1 area led to a stronger activation of the ipsilateral V2, mostly within the ventral part of V2. As previously reported, within the different imaging planes, we also observed strong activation in the lower parts of V1 and V2 containing the axons. We next quantified the active volume over all imaging planes for the V2 area, for all 10 animals (Fig. 4b). As for the V1 area, visual stimulation resulted in only weak activation of V2 (mean:  $0.2 \pm 0.3\%$  of activated volume). Averaged activation volumes were significantly larger for optogenetic stimulation than for visual stimulation (mean:  $5.6 \pm 8.0\%$  activated volume,  $n = 10$  animals, Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p < 0.05$ ). Control stimulation of the non-injected V1 area confirmed the specificity of the spread of optogenetic activation from V1 to V2, as no activation was observed in the contralateral V2 area (Fig. 4b, Fig. S2).

Electrophysiological recordings within V2 confirmed that the fUS variations we observed in V2 were consistent with direct neuronal activation (Fig. 4c). We recorded V2 single units responding to visual and optogenetic stimulation. As previously described, we characterized the onset latency of these neurons, comparing the values obtained with those for V1 single units (Fig. 4d). Similar visual latencies were recorded for V1 and V2 single units (visual stimulation: V1, mean:  $41.24 \pm 16.61$  ms,  $n = 33$  units (see Fig. 1f); visual stimulation: V2, mean:  $39.43 \pm 9.557$  ms,  $n = 14$  units). Interestingly, optogenetic onset latencies were higher for V2 single units than for V1 (V1, mean:  $1.76 \pm 3.14$  ms,  $n = 76$  units, V2, mean:  $62.78 \pm 77.44$  ms,  $n = 9$  units, Mann–Whitney,  $p < 0.0001$ ), suggesting that these neurons were activated indirectly by ChrimsonR-expressing V1 neurons. Two V2 neurons presented particularly long optogenetic ON latencies, possibly due to a difference in the microcircuits involved. We checked that this variability did not bias the latency delay for V2 and V1 neurons after optogenetic stimulation, by performing the same statistical test on a V2 data set restricted to the remaining seven fast V2 units. The difference in ON latency between V1 neurons and these fast V2 neurons was conserved (fast V2 units, mean:  $12.2 \pm 9.5$  ms,  $n = 7$  units, Mann–Whitney,  $p < 0.0001$ ), suggesting that all V2 neurons were activated indirectly after the onset of stimulation. This conclusion is supported by the lack of ChrimsonR expression in V2 on brain slices from the animals used to record these single units. However, these V2 latencies were shorter than V2 latencies for natural eye stimulation, demonstrating that they were genuinely produced by V1 optogenetic activation.

## Discussion

**Coupling of optogenetics with fUS.** In this study, we demonstrate that optogenetic activation can be detected by fUS imaging. Rungta and colleagues<sup>25</sup> indicated that blue light from the tip of the optic fiber per se could induce neurovascular responses in naïve mice, at light powers higher than 2 mW (irradiance higher than 18 mW mm<sup>-2</sup>). Two other recent studies reported hemodynamic responses following blue light illumination of the retrosplenial cortex in Thy-ChR2 mice or the illumination of specific neuronal subpopulations of the superior colliculus in other transgenic lines<sup>19,26</sup>. We here show that even with AAV-mediated expression of microbial opsins, we can specifically activate neurons by optogenetics but in the red range which provides deeper light penetration and less light scattering. The authors explained that they used a lower light power and irradiance (0.3 mW/1.5 mW mm<sup>-2</sup>) to prevent non-specific activation. By contrast, we used an AAV-mediated strategy to express ChrimsonR in V1 neurons, resulting in a lower density of opsin-expressing cells than in transgenic mice lines<sup>35</sup>. Our results demonstrate the possibility of recording neurovascular optogenetic activation due to a small number of transfected neurons. Moreover, we show here that stimulation of the control non-injected hemisphere does not induce a vascular response, thereby demonstrating the specificity of ChrimsonR-elicited optogenetic activity. Single-cell recordings confirmed the neuronal optogenetic activation correlated with these CBV variations. We also used a higher wavelength (595 nm) for illumination than Rungta and coworkers, but with comparable values of power and irradiance. These results indicate that red light can be used even at high power, in protocols combining the optogenetic activation of red-shifted opsins and fUS imaging. Importantly, electrophysiological recordings from the control animals showed no neuronal activation, suggesting negligible thermal effects with the use of 595 nm light under the parameters used here. Indeed, we included these parameters in the heat propagation model of Stujenske<sup>36</sup>, and recorded a very local (< 1 mm-diameter sphere from the tip of the optic fiber) increase in temperature, by 0.2 °C, which is too small to alter neuronal firing rates. Finally, we characterized the dose–response dependence of our recorded optogenetic activations.

The use of fUS imaging to analyze optogenetic responses has the advantage that it could potentially provide a mesoscopic view of the activated area. Unlike electrophysiological recordings, which extract information very locally<sup>6</sup>, and calcium imaging, which is dependent on both expression of the calcium indicator and the penetration of blue light through the tissue<sup>37</sup>, it can display information at a brain-wide spatial scale. The coupling of fMRI with optogenetics meets these criteria, but with a lower spatial resolution<sup>8,10,11</sup> (of the order of a millimeter per pixel). By contrast, fUS imaging can detect brain activity at a submesoscopic resolution (100 × 100 μm<sup>2</sup>), with less cumbersome equipment than for fMRI.

**Spread of the activity within V1.** We found that optogenetic neurovascular activation was well correlated with ChrimsonR expression in the AP axis. We also noted that optogenetic V1 stimulation spread beyond the borders of V1, as indicated by the activation of both the LGN and V2 on both fUS and electrophysiology. This spread of activity may be due to fibers located at the base of V1, connected to the LGN and expressing ChrimsonR (Fig. S1). These fibers may generate the neurovascular activity detected ventrally to V1 on our activation maps. Furthermore, the mean neuronal transfection rate was 5.5% in the coronal plane displaying the highest fluorescence signal, whereas a larger volume of V1 was activated in this plane. A first explanation for this may be the spread of neuronal activation to other V1 cells, although we recorded a rather homogeneous set of short-onset latencies. Alternatively, neurovascular activations may be broader per se than neuronal responses. Some studies of rat olfactory bulb glomeruli have provided evidence of a close overlap between capillary blood flow and neuronal activity<sup>38</sup>, whereas others have reported a mismatch between the areas of neurovascular and neuronal activation<sup>39,40</sup>. Specifically for V1, a lack of correlation between BOLD signals and spiking activity has been observed in cats<sup>41</sup>, and a lack of correlation between single-vessel hemodynamic responses and calcium imaging signals has been found in cats and rats<sup>42</sup>.

**Cortical visual restoration.** We detected neurovascular and neuronal responses, even at low irradiance (6 mW mm<sup>-2</sup>), with no modification of the depth distribution of the activated neurons. One recent study<sup>43</sup> reported that the stimulation of deep V1 layers (> 1.5 mm) in non-human primates with electrical prostheses elicited behavioral responses. Our ability to activate neurons in deep cortical layers highlights the potential value of red-shifted opsin ChrimsonR for optogenetic cortical vision restoration strategies. Although it would still require a cranial surgery for the implantation of an optic device above the dura, the optogenetic therapy would bypass the need to insert electrodes in the tissue unlike electrical cortical visual restoration. Besides, long-term insertion of electrodes in the cortex leads to signal degradation over time, an issue that an optogenetic strategy can bypass too. A key element of visual restoration is the induction of neuronal responses with characteristics matching those resulting from a natural visual stimulus<sup>44–50</sup>. We show here that the firing rates induced by optogenetic stimulation were similar to those induced by visual stimulation. Optogenetically activated neurons had very short latencies, of the order of 1–2 ms. Theoretically, this is sufficient for the encoding of natural images into optogenetic stimulations at a temporal resolution matching the resolution of the natural visual signal. Moreover, those optogenetic onset latencies were quite homogeneous, despite being obtained for neurons located in different layers. These results demonstrate that we can induce a signal that does not lose its temporal resolution with depth.

Finally, the feasibility of inducing visual percepts by optogenetic cortical vision restoration remains to be demonstrated. In species with a more complex hierarchical organization of cortical visual areas, such as non-human primates, a few studies have shown behavioral effects due to the optogenetic stimulation of higher visual areas. Jazayeri<sup>51</sup> and coworkers reported that saccades following fixation tasks were shifted towards the receptive field of the region of V1 optogenetically activated following the fixation point offset. Ju<sup>52</sup> and coworkers demonstrated the successful detection of optogenetic percepts in a saccade task. However, we used here a single



optic fiber for optogenetic stimulation that led to a global activation of V1. This will hardly allow the encoding of precise spatial stimuli. The use of lower irradiances led to more restricted volumes of activations as shown in Fig. 2, which is more suitable for increasing the spatial resolution of the encoding. Subpopulation or single-cell activation can be achieved using more sophisticated optic techniques such as two-photon microscopy and holographic stimulation. However, coupling these activations techniques with fUS imaging remains challenging due to the hindrance of both an objective and a fUS probe onto a rodent cranial window. Moreover, concerning the optogenetic cortical therapy, the use of multiphoton microscopy will hardly be compatible with the development of easily-implantable prosthetics. Nevertheless, we showed a here a way to appraise the optogenetic activation volumes. Such information will be critical for later development of more complex stimulation system, such as arrays of micro-LEDs that will offer better spatial resolution. This might make it possible to generate percepts more complex than phosphenes and to develop discrimination behavioral tasks to assess their perception.

## Materials and methods

The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

**Animals.** All animal experiments and procedures were approved by the Local Animal Ethics Committee Charles Darwin CEEACD #5 (registration number 2018032911282465) and performed in accordance with European Directive 2010/63/UE. We used wild-type male Long-Evans rats (Janvier Laboratories), nine weeks old at the time of viral injection. Rats were maintained under a reverse 12-h light/12-h dark cycle, with ad libitum access to food and water, except during surgery and electrophysiological recordings.

**AAV production.** The AAV9-7m8-CaMKII-ChrimsonR-tdT vector was packaged as previously described, by the triple transfection method, and purified by iodixanol gradient ultracentrifugation<sup>53</sup>. The AAV9-7m8-CaMKII-ChrimsonR-tdT vector was titered by qPCR with SYBR Green<sup>54</sup> (Thermo Fisher Scientific). The titer used in this study was  $4.39 \times 10^{12}$  vg mL<sup>-1</sup>.

**Immunostaining and confocal imaging.** Following electrophysiological recordings, rats were euthanized, and their brains were extracted and fixed by overnight incubation in 4% paraformaldehyde (100496, Sigma-Aldrich) at 4 °C. Brains were then cryoprotected in 30% sucrose (84097, Sigma-Aldrich) and 50 µm sagittal slices were cut with a microtome (HM450, Microm). The slices with the most intense tdT fluorescence from each brain were selected for further immunohistochemistry and imaging. Cryosections were permeabilized by incubation with 0.5% Triton X-100 in PBS for 1 h at room temperature and were then incubated in blocking buffer (PBS + 1% BSA + 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Samples were incubated overnight at 4 °C with monoclonal anti-NeuN antibody (1:500; Mouse, MAB377, Merck Millipore), in a 50% dilution of blocking buffer + 0.5% Triton X-100. Secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor dyes (1:500; Molecular Probes) and DAPI (1:1000, D9542, Merck Millipore), were incubated with the samples for 1 h at room temperature. An Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope with a 20× or 40× objective (UPLSAPO 20XO, NA: 0.85) was used to acquire images of brain sections.

**Viral injections.** Viral injections were performed in aseptic conditions with a digital small-animal stereotaxic instrument (David Kopf Instruments). Ear bars were covered with xylocaine to ensure that the animals felt no pain. Rats were anesthetized in a sealed box containing gaseous isoflurane (5%), and maintained under anesthesia in the stereotaxic frame (25% ketamine, 10% medetomidine and 65% saline injected intraperitoneally) for the entire surgical procedure, and animal body temperature was maintained at 37 °C with a heating pad. Buprenorphine was injected subcutaneously to reduce inflammation, and Lubrithal was applied to the eyes to prevent them from drying out. Xylocaine, 70% ethanol and Vetedine were applied successively to the scalp before incision, to minimize pain and maintain sterile conditions. Cranial sutures were cleaned to remove connective tissue, by applying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, to facilitate localization of the injection coordinates. We injected a total volume of 1.2 µL of viral suspension unilaterally into rates, via two injection tracks, at a flow rate of 50–75 nL/min, with a 5 or 10 µL microsyringe (Hamilton) equipped with a microinjector (Sutter Instrument) and controller (World Precision Instruments). The coordinates for viral injection were +2.8/ +3.2 mm from midline (M-L axis), -6.5/ -7.5 mm from Bregma (A-P axis) and 1.6–1.35–1.1 mm ventral to the skull surface (D-V axis), based on the 2004 edition of the Paxinos and Franklin rat brain atlas. Viral efflux was prevented by leaving the needle in a 1.8 mm ventral position for two minutes before beginning the injection, with a three-minute interval left between injections before complete withdrawal of the needle from the cortex. After surgery, rats were brought round from anesthesia with a subcutaneous injection of Antisédan (0.15 mL).

**In vivo electrophysiological recordings.** Bilateral craniotomies were performed with a digital small-animal stereotaxic instrument (David Kopf Instruments), at least 30 days after viral injection, to allow time for opsin expression. Ear bars were covered with xylocaine to prevent pain. Rats were anesthetized in a sealed box containing gaseous isoflurane (5%) and maintained under anesthesia in the stereotaxic frame (25% ketamine, 10% medetomidine and 65% saline injected intraperitoneally) for the entire surgical procedure, and electrophysiological recordings were taken with body temperature maintained at 37 °C with a heating pad. Buprenorphine was injected subcutaneously to reduce inflammation, and Lubrithal was applied to the eyes to prevent them from drying out. Cranial sutures were cleaned to remove connective tissue, by applying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, to reveal the injection tracks. Parietal bones were removed by drilling rectangular flaps and gently moving the bone away from the dura mater, exposing the cortex from 3 to 8.5 mm from Bregma (A-P axis), to cover the injection tracks. The dura was



then gently removed. During drilling, the skull was regularly cooled with PBS, and once the cortex was exposed, it was protected from dehydration by the regular application of cortex buffer. After surgery, electrophysiological recordings were performed with 16-channel electrodes (A1 × 16–5 mm–50–703–OA16LP) coupled with a 400 µm-core fiber (Thorlabs M79L005 Fiber Cable, MM, 400 µm 0.39NA, FC/PC to 1.25 mm ferrule, 0.5 m) at various positions close to the injection sites. Electrophysiological data were acquired with MC RACK software. For visual stimulation, a white LED (Thorlabs MNWHL4 Mounted LED, 60 mW/cm<sup>2</sup>) was placed 15 cm in front of the eye on the contralateral side of the cranial window. Electrophysiological recordings were digitized with a 16-channel amplifier (model ME32/16-FAI-µPA, MultiChannel Systems). The sampling rate was 25 kHz.

**Acquisition protocol for electrophysiological recordings.** For optogenetic stimulation, we connected the optic fiber (reference above) to a light source (Thorlabs M595F2 (fiber coupled LED @595 nm), Ø400 µm, 150 µW/cm<sup>2</sup>) delivering light at the ChrimsonR excitation wavelength (595 nm). We targeted the transfected region of V1 by imaging tdT fluorescence with a Micron IV imaging microscope (Phoenix Research Laboratories) before recordings. The fiber was placed on the surface of the cortex while the electrode was inserted in the tissue. Both stimulations consisted of 100 repeats of 200 ms flashes at 1 Hz. The onset of the flashes was aligned with electrophysiological data, with Clampex 9.2 software. We used several different irradiances of light at 595 nm in this study. Power at the fiber tip was measured with a power meter (Thorlabs, PM100D), by placing the fiber tip in contact with the sensor. The irradiance corresponding to each power was calculated as previously described<sup>25</sup>.

**Spike sorting.** Offline spike sorting of the electrophysiological recordings (linear 16-channel electrodes) was performed with the SpyKING CIRCUS package<sup>34</sup>. Raw data were first high-pass filtered (> 300 Hz) and spikes were detected when a filtered voltage trace crossed the threshold. Automatic cluster extraction was performed and candidate clusters were curated. Refractory period violations (< 2 ms, > 1% violation) and noisy spike shapes led to cluster deletion. Spike templates with coordinated refractory periods in the cross-correlogram together with similar waveforms led to the merging of cluster pairs.

**Electrophysiological data analysis.** All electrophysiological data were extracted and analyzed with a custom-made Matlab script. Responsive units were defined as those displaying a significant difference in neuronal activity between the pre-stimulation period (averaged 100 ms before stimulus onset) and the stimulation interval (averaged 200 ms following stimulus onset, Wilcoxon signed-rank test,  $p < 0.01$ ). For each unit, responses are represented as the spike density function (SDF), which was calculated from the mean peristimulus time histogram (PSTH, bin size: 1 ms, 100 trials) smoothed with a Gaussian filter (2 ms SD).

**Calculation of latencies and response durations.** The latency of the units displaying activation was defined as the first time point at which the SDF crossed the value of the baseline plus 2SD and remained higher than this value for at least 10 ms. Conversely, the offset of activation was defined as the first time point after latency that the SDF crossed back below the value of the baseline plus 2SD and remained lower than this value for at least 10 ms. Not all active neurons from a given population met these criteria, accounting for the slight difference between the number of active neurons and the number of latencies presented here.

**Generation of functional ultrasound images.** fUS imaging was performed as previously described<sup>17</sup>, with a linear ultrasound probe (128 elements, 15 MHz, 110 µm pitch and 8 mm elevation focus, Vermon; Tour, France) driven by an ultrafast ultrasound scanner (Aixplorer, Supersonic Imagine; Aix-en-Provence, France).

**Acquisition protocol for fUS imaging.** 3D fUS acquisitions were performed after craniotomy and electrophysiological recordings, as previously described. When optogenetic responses were observed, the position of the optic fiber on the surface of the cortex was kept unchanged until control acquisitions were performed, in which the fiber was moved to the other hemisphere. The cortex buffer on the surface of the cortex dried out, and 1 cm<sup>3</sup> of ultrasound coupling gel was placed between the cortex and the linear ultrasound probe. Acquisition protocols consisted of 20 stimulation blocks, each consisting of 13 s of rest followed by 2 s of stimulation. For visual stimulation, the white LED used for electrophysiological recordings was kept in the same position, and the 2 s stimulation consisted of eight repeats of 125 ms flashes at 4 Hz. For optogenetic stimulation, the 2 s stimulation consisted of 40 repeats of 25 ms flashes at 20 Hz. Acquisitions were performed on coronal planes from 3 to 8.5 mm from Bregma (AP axis), with a 0.5 mm increment corresponding to the thickness of the imaging plane.

**Building activation maps.** For each pixel, we averaged, for each block, the intensity of Doppler power at baseline (2 s before stimulus onset) and during a response window (4 s after stimulus onset). The signals were then compared in one-tailed Wilcoxon signed-rank tests. Only pixels with  $p$ -values  $< 4.03 \times 10^{-6}$  (corresponding to a global  $p$ -value  $< 0.05$  with Bonferroni correction) were considered significant. On the maps, CBV during the response window is presented as a percentage of the baseline value. Region of interest (ROI) as V1, V2, SC and LGN were determined for each imaging plane, based on the Matt Gaidica rat brain atlas.

### Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 12 May 2021; Accepted: 31 May 2021

Published online: 15 June 2021

## References

- Deisseroth, K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat. Neurosci.* **18**, 1213–1225 (2015).
- Carrillo-Reid, L., Yang, W., Bando, Y., Peterka, D. S. & Yuste, R. Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science* **353**, 691–694 (2016).
- Carrillo-Reid, L., Han, S., Yang, W., Akrouh, A. & Yuste, R. Controlling visually guided behavior by holographic recalling of cortical ensembles. *Cell* **178**, 447–457.e5 (2019).
- Gill, J. V. *et al.* Precise holographic manipulation of olfactory circuits reveals coding features determining perceptual detection. *Neuron* **108**, 382–393.e5 (2020).
- Pégar, N. C. *et al.* Three-dimensional scanless holographic optogenetics with temporal focusing (3D-SHOT). *Nat. Commun.* **8**, 1–14 (2017).
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A. & Koch, C. The origin of extracellular fields and currents: EEG, ECoG LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 407–420 (2012).
- Lee, J. H. *et al.* Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature* **465**, 788–792 (2010).
- Chen, X. *et al.* Mapping optogenetically-driven single-vessel fMRI with concurrent neuronal calcium recordings in the rat hippocampus. *Nat. Commun.* **10**, 1–12 (2019).
- Lehhardt, P., von Hohenberg, C. C., Weber-Fahr, W., Kelsch, W. & Sartorius, A. Optogenetic fMRI in the mouse hippocampus: Hemodynamic response to brief glutamatergic stimuli. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 629–638 (2016).
- Liang, Z. *et al.* Mapping the functional network of medial prefrontal cortex by combining optogenetics and fMRI in Awake Rats. *Neuroimage* **117**, 114–123 (2015).
- Gerits, A. *et al.* Optogenetically-induced behavioral and functional network changes in primates. *Curr. Biol. CB* **22**, 1722–1726 (2012).
- Weitz, A. J. & Lee, J. H. Probing neural transplant networks in vivo with optogenetics and optogenetic fMRI. *Stem Cells Int.* **2016**, 8612751 (2016).
- Logothetis, N. K. What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature* **453**, 869–878 (2008).
- Macé, E. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* **8**, 662–664 (2011).
- Boido, D. *et al.* Mesoscopic and microscopic imaging of sensory responses in the same animal. *Nat. Commun.* **10**, 1110 (2019).
- Deffieux, T., Demene, C., Pernot, M. & Tanter, M. Functional ultrasound neuroimaging: a review of the preclinical and clinical state of the art. *Curr. Opin. Neurobiol.* **50**, 128–135 (2018).
- Gesnik, M. *et al.* 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents. *Neuroimage* **149**, 267–274 (2017).
- Macé, É. *et al.* Whole-brain functional ultrasound imaging reveals brain modules for visuomotor integration. *Neuron* **100**, 1241–1251.e7 (2018).
- Brunner, C. *et al.* A platform for brain-wide volumetric functional ultrasound imaging and analysis of circuit dynamics in Awake Mice. *Neuron* **108**, 861–875.e7 (2020).
- Sieu, L.-A. *et al.* EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nat. Methods* **12**, 831–834 (2015).
- Bergel, A., Deffieux, T., Demene, C., Tanter, M. & Cohen, I. Local hippocampal fast gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep. *Nat. Commun.* **9**, 1–12 (2018).
- Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, 1–9 (2019).
- Blaize, K. *et al.* Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 14453–14463 (2020).
- Norman, S. L. *et al.* Single-trial decoding of movement intentions using functional ultrasound neuroimaging. *Neuron* **109**, 1554–1566.e4 (2021).
- Rungta, R. L., Osmanski, B.-F., Boido, D., Tanter, M. & Charpak, S. Light controls cerebral blood flow in naive animals. *Nat. Commun.* **8**, 14191 (2017).
- Sans-Dublanc, A. *et al.* Optogenetic fUSI for brain-wide mapping of neural activity mediating collicular-dependent behaviors. *Neuron* **576**, 266 (2021).
- Klapoetke, N. C. *et al.* Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat. Methods* **11**, 338–346 (2014).
- Mager, T. *et al.* High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted optogenetics. *Nat. Commun.* **9**, 1750 (2018).
- Marshel, J. H. *et al.* Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception. *Science* **365**, eaaw5202 (2019).
- Gauvain, G. *et al.* Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern discrimination compatible with vision restoration in non-human primates. *Commun. Biol.* **4**, 1–15 (2021).
- 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. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03326336> (2020).
- Seabrook, T. A., Burbridge, T. J., Crair, M. C. & Huberman, A. D. Architecture, function, and assembly of the mouse visual system. *Annu. Rev. Neurosci.* **40**, 499–538 (2017).
- Gao, Y.-R. *et al.* Time to wake up: studying neurovascular coupling and brain-wide circuit function in the un-anesthetized animal. *Neuroimage* **153**, 382–398 (2017).
- Yger, P. *et al.* A spike sorting toolbox for up to thousands of electrodes validated with ground truth recordings in vitro and in vivo. *Elife* **7**, e34518 (2018).
- Arenkiel, B. R. *et al.* In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* **54**, 205–218 (2007).
- Stujenske, J. M., Spellman, T. & Gordon, J. A. Modeling the spatiotemporal dynamics of light and heat propagation for in vivo optogenetics. *Cell Rep.* **12**, 525–534 (2015).
- Emiliani, V., Cohen, A. E., Deisseroth, K. & Häusser, M. All-optical interrogation of neural circuits. *J. Neurosci.* **35**, 13917–13926 (2015).
- Chaigneau, E., Oheim, M., Audinat, E. & Charpak, S. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13081–13086 (2003).
- Iadecola, C., Yang, G., Ebner, T. J. & Chen, G. Local and propagated vascular responses evoked by focal synaptic activity in cerebellar cortex. *J. Neurophysiol.* **78**, 651–659 (1997).
- Iadecola, C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron* **96**, 17–42 (2017).
- Kayser, C., Kim, M., Ugurbil, K., Kim, D.-S. & Köhig, P. A comparison of hemodynamic and neural responses in cat visual cortex using complex stimuli. *Cereb. Cortex* **14**, 881–891 (2004).
- O'Herron, P. *et al.* Neural correlates of single-vessel haemodynamic responses in vivo. *Nature* **534**, 378–382 (2016).

43. Chen, X., Wang, F., Fernandez, E. & Roelfsema, P. R. Shape perception via a high-channel-count neuroprosthesis in monkey visual cortex. *Science* **370**, 1191–1196 (2020).
44. Bi, A. *et al.* Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* **50**, 23 (2006).
45. Lagali, P. *et al.* Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat. Neurosci.* **11**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18432197/> (2008).
46. Gaub, B. M. *et al.* Restoration of visual function by expression of a light-gated mammalian ion channel in retinal ganglion cells or ON-bipolar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, E5574–E5583 (2014).
47. Sengupta, A. *et al.* Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol. Med.* **8**, 1248–1264 (2016).
48. Chaffiol, A. *et al.* A new promoter allows optogenetic vision restoration with enhanced sensitivity in Macaque Retina. *Mol. Ther.* **25**, 2546–2560 (2017).
49. Gauvain, G. *et al.* Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern recognition compatible with vision restoration in non-human primates. *bioRxiv* 2020.05.17.100230 (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.05.17.100230>.
50. Khabou, H. *et al.* Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. *JCI Insight* **3**, (2018).
51. Jazayeri, M., Lindbloom-Brown, Z. & Horwitz, G. D. Saccadic eye movements evoked by optogenetic activation of primate V1. *Nat. Neurosci.* **15**, 1368–1370 (2012).
52. Ju, N., Jiang, R., Macknik, S. L., Martinez-Conde, S. & Tang, S. Long-term all-optical interrogation of cortical neurons in awake-behaving nonhuman primates. *PLoS Biol.* **16**, e2005839 (2018).
53. Choi, V. W., Asokan, A., Haberman, R. A. & Samulski, R. J. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **Chapter 12**, Unit 12.9 (2007).
54. Aurnhammer, C. *et al.* Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Human Gene Ther. Methods* **23**, 18–28 (2012).

## Acknowledgements

We thank Pierre Pouget, Frédéric Chavane, Brice Bathellier, Kévin Blaize, Sara Cadoni and Diep Nguyen for their useful discussions about the data. We thank Julie Dégardin for her help with surgery, Baptiste Lefebvre for assistance with spike sorting and Hicham Serroune for technical assistance with fUS imaging. This work was supported by the European Research Council (ERC) Synergy Grant Scheme (ERC Grant Agreement 610110), LabEx LIFESENSES (ANR-10-LABX-65) and IHU FORESIGHT (ANR-18-IAHU-01).

## Author contributions

M.P., S.P., J.-A.S., M.T., G.G., and F.A. designed the study; M.P. and D.D. designed viral vectors; M.P. and W.D. produced viral vectors; M.P., G.L., A.R., R.G. and M.V. performed intracortical injections; M.P., G.L. and C.J. performed electrophysiological recordings and fUS acquisitions; G.L. performed histological experiments; M.P., U.F., A.C., G.G., F.A. and S.P. analyzed data; M.P., G.G. and F.A. constructed the figures; M.P., A.C., G.G., F.A. and S.P. wrote the manuscript.

## Competing interests

M.T. is cofounder and S.P. and M.T. are shareholders of ICONEUS. D.D. and S.P. are consultants for Gensight Biologics. All other authors do not have any competing interest to disclose.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91972-z>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.P.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

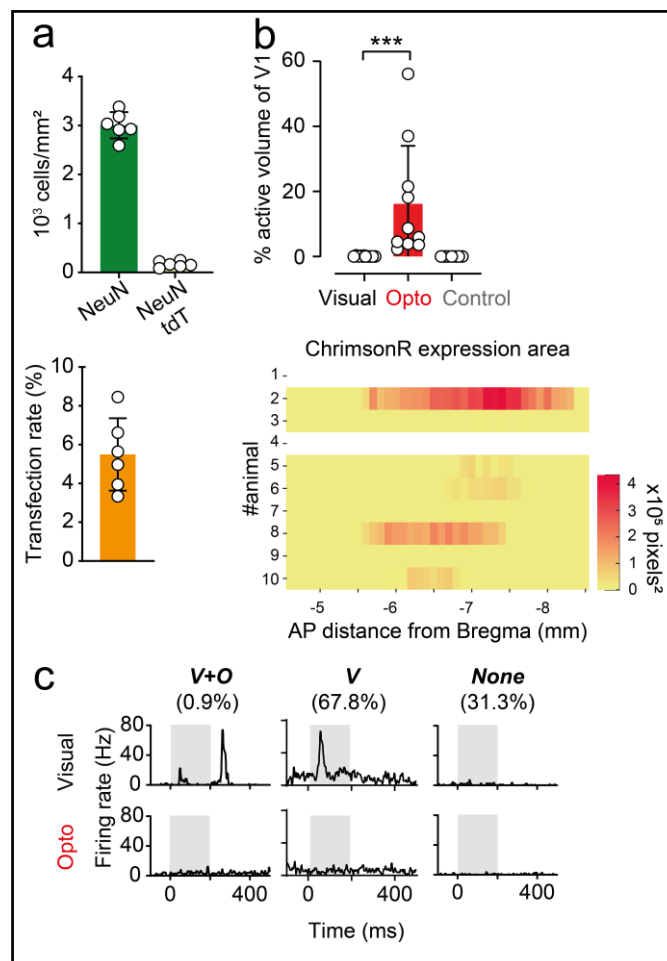
© The Author(s) 2021

# Functional ultrasound imaging of the spreading activity following optogenetic stimulation of the rat visual cortex

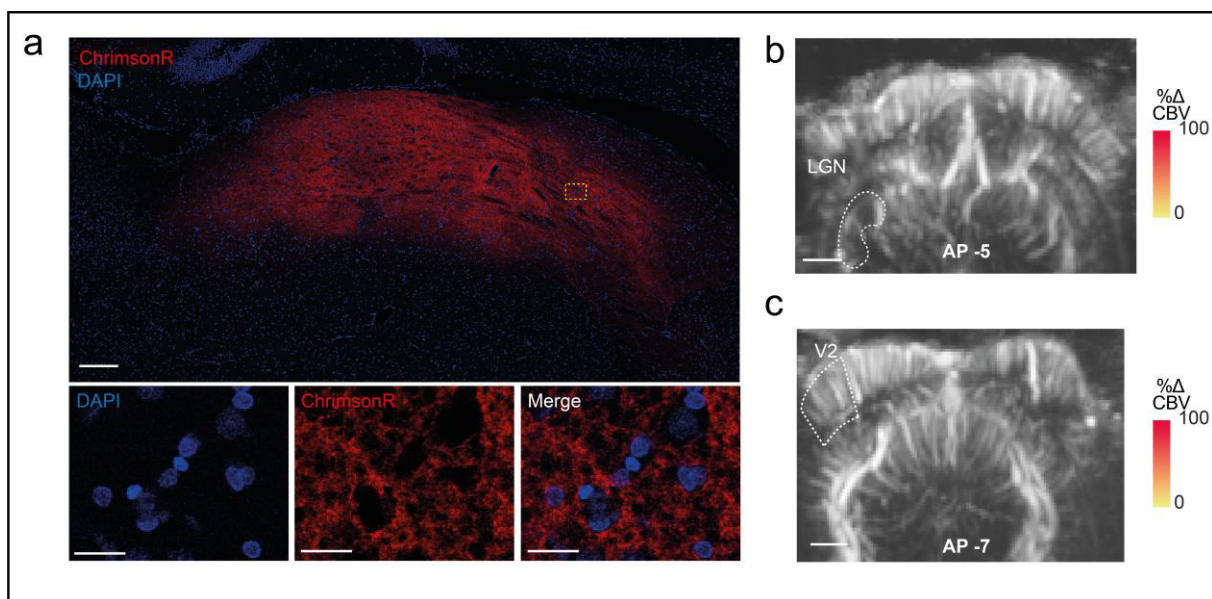
Authors: M. Provansal, G. Labernede, C. Joffrois, A. Rizkallah, R. Goulet, M. Valet, W. Deschamps, U. Ferrari, A. Chaffiol, D. Dalkara, J.A. Sahel, M. Tanter, S. Picaud, G. Gauvain\*, F. Arcizet\*.

- \* Equal contribution

## Supplementary informations



**Figure S1, related to Figure 1.** (a) Top: NeuN-positive and NeuN/tdT double-positive cell densities. Bottom: neuronal transfection rates. Data were obtained from the brain section displaying the highest tdT fluorescence ( $n=6$  animals) (b) Top: percentage active volume of V1 after visual, optogenetic or control stimulation for each animal. For both visual and optogenetic stimulation, we show the volumes of the ipsilateral V1, whereas, for the control, the volume of the contralateral V1 area is shown. Open circles represent values corresponding to single imaging planes, and bars represent the mean ( $n=10$  animals,  $n=7$  for control, Wilcoxon signed-rank test, one-tailed,  $p=0.001$ ). Bottom: distribution of ChrimsonR expression along the AP axis. (c) Spike density function (SDF) of a typical V1 single units ( $n=118$ ) during visual (top row) or optogenetic (bottom row) stimulation, and from non-injected control animals ( $n=3$ ). Single units were classified into the same subpopulations described in Figure 1.



**Figure S2, related to Figures 3-4.** (a) Top: 20x confocal imaging of a brain section showing ChrimsonR (red) expression in the LGN. Blue: DAPI. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ . Bottom: close-up (40x) of the area delimited by the yellow lines in the previous image. ChrimsonR expression could not be superimposed over DAPI staining. ChrimsonR was, therefore, not present in cell bodies, but was restricted to fibers and dendrites. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . (b) fUS activation map obtained during control stimulation of the contralateral V1 area from a single imaging plane containing the LGN (AP -5 mm) from the same animal as shown in Figure 3. White dashed lines delimit the contralateral LGN. Scale bar: 2 mm. (c) fUS activation map obtained during control stimulation of the contralateral V1 area from a single imaging plane containing V2 (AP -7 mm) from the same animal as shown in Figure 4. White dashed lines delimit the contralateral V2 area. Scale bar: 2 mm.



## 2.2. Chapitre 2 : stimulation sonogénétique du cerveau à une résolution spatiotemporelle adaptée à la restauration visuelle

### 2.2.1. Résumé

L'objectif de ce chapitre est d'apporter une preuve de concept que la sonogénétique peut être utilisée chez le rongeur comme une stratégie de restauration visuelle corticale. Plusieurs étapes doivent être validées pour ce faire. Premièrement, il faut démontrer la possibilité d'exprimer un canal mécanosensible dans les neurones ciblés et d'apporter des preuves physiologiques de l'efficacité de la stimulation avec une résolution spatiotemporelle compatible avec la restauration visuelle.

Pour évaluer l'efficacité de différentes protéines décrites pour leurs propriétés mécanosensibles, celles-ci ont été exprimées par thérapie génique dans la rétine de rat. Ainsi, nous avons établi que le canal mécanosensible MscL et son variant MscL-G22S présentant un seuil d'activation plus faible peuvent être exprimés au sein des cellules ganglionnaires rétiniennes de rat. Cette expression est révélée par la fluorescence rouge de la protéine reporthèque tdTomato fusionnée au canal MscL (Figure 2, a-d). Nous avons ensuite enregistré les réponses *ex-vivo* de ces neurones suite à une stimulation ultrasonore à 15 MHz sur des matrices d'électrodes. Deux ensembles de réponses sont observés : un groupe présentant des latences courtes (inférieures à 20 ms) et un groupe présentant des latences longues (supérieures à 20 ms) (Figure 2, g). Seules ces réponses à latences longues demeurent présentes lors de la stimulation de rétines contrôle n'exprimant pas MscL (Figure 2, h-i). De plus, ces réponses à latences longues sont sensibles à des bloqueurs pharmacologiques inhibant la transmission synaptique et sont majoritairement absentes chez des rétines de rat P23H présentant une dégénérescence des photorécepteurs (Figure 2, l). Ces résultats indiquent que seules les réponses à latences courtes sont de nature sonogénétique alors que les réponses à latences longues apparaissent liées à une modulation ultrasonore naturelle des photorécepteurs.

D'autre part, nous avons caractérisé les propriétés fonctionnelles de MscL-G22S au sein des cellules ganglionnaires. Les résultats montrent que la résolution temporelle de ce canal permet aux cellules qui l'expriment de répondre jusqu'à une fréquence de stimulation de 10 Hz (Figure 3, b). De plus, la sensibilité de MscL-G22S permet de répondre à des durées de stimuli de l'ordre de 10 ms (Figure 3, a). Enfin, nous avons démontré une co-

variation entre la surface de rétine activée et la fréquence ultrasonore utilisée pour les stimulations (Figure 3, f-j). En outre, une fréquence de 15 MHz permet de générer une surface activée de quelques centaines de micromètres, qui suit le déplacement du faisceau d'activation.

Notre intérêt se portant sur l'application corticale, nous avons évalué cette approche sonogénétique sur le cortex visuel primaire du rat. Les résultats montrent que le vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdT induit une expression efficace de MscL dans les neurones de V1 comme l'indique à nouveau la fluorescence rouge de tdTomato (Figure 4, a-b). D'autre part, nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques à l'aide d'électrodes pénétrantes ainsi que des électrocorticogrammes (EcoG) à l'aide d'électrodes de surface. Les résultats démontrent des activations neuronales détectées par une augmentation de la fréquence de décharge des neurones isolés avec à nouveau une latence très courte en accord avec une stimulation directe des neurones (Figure 4, o). La mesure par matrice d'électrodes EcoG à la surface du cerveau montre des réponses en potentiels évoqués dès 10ms de stimulation (Figure 4, e). Ces réponses se déplacent lors du déplacement du stimulateur ultrasonore indiquant la possibilité de produire des patterns lumineux (Figure 4, k). Ces activations sont bien spécifiques de l'expression ectopique de MscL puisqu'elles sont absentes chez les animaux contrôles non injectés (Figure 4, e).

Enfin, pour évaluer si un tel stimulus sonogénétique au sein de V1 apparaît comme un phosphène, nous avons entraîné des souris à effectuer une tâche de détection d'un flash lumineux. Au bout de 4 jours, l'animal passe de 23.57 % d'association entre le flash et le comportement de prise d'eau à 76.09 % (Figure 5, b). A l'issue de cet apprentissage, lorsque le stimulus visuel est remplacé par une stimulation sonogénétique au niveau du cortex visuel, les animaux conservent le même comportement mais avec une latence écourtée en accord avec la différence des latences au niveau des neurones corticaux entre stimulation visuelle naturelle et stimulation sonogénétique du cortex (Figure 5, b-c). A nouveau, en absence d'injection corticale d'AAV, la stimulation ultrasonore du cortex visuel n'induit pas le comportement de prise d'eau comme après les stimulations visuelle et sonogénétique (Figure 5, d).

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une publication qui est actuellement en revue au sein du journal *Nature Nanotechnology*. J'y figure en troisième auteur pour avoir contribué à la conception, réalisation et analyse des expériences relatives à la démonstration de l'efficacité de la stimulation sonogénétique corticale chez le rat. La dernière version de l'article au cours du processus en cours de revue est insérée ci-après

## 2.2.2. Article scientifique



1 **Ectopic expression of a mechanosensitive channel confers spatiotemporal resolution to**  
2 **ultrasound stimulations of neuronal circuits**

3

4 Sara Cadoni<sup>1</sup>, Charlie Demené<sup>2</sup>, Ignacio Alcalá<sup>1†</sup>, Matthieu Provansal<sup>1†</sup>, Diep Nguyen<sup>1</sup>, Dasha  
5 Nelidova<sup>3</sup>, Guillaume Labernede<sup>1</sup>, Jules Lubetzki<sup>1</sup>, Ruben Goulet<sup>1</sup>, Emma Burban<sup>1</sup>, Julie  
6 Dégardin<sup>1</sup>, Manuel Simonutti<sup>1</sup>, Gregory Gauvain<sup>1</sup>, Fabrice Arcizet<sup>1</sup>, Olivier Marre<sup>1</sup>, Deniz  
7 Dalkara<sup>1</sup>, Botond Roska<sup>3</sup>, José Alain Sahel<sup>1,4,5,6</sup>, Mickael Tanter<sup>2\*</sup>, Serge Picaud<sup>1\*</sup>

8

9 Affiliation:

10 <sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris,  
11 France;

12 <sup>2</sup>Physics for Medicine Paris, INSERM, CNRS, École Supérieure de Physique et de Chimie  
13 Industrielles (ESPCI Paris), Paris Sciences et Lettes (PSL) Research University, 75012 Paris,  
14 France;

15 <sup>3</sup>Institute of Molecular and Clinical Ophthalmology Basel, Basel, Switzerland;

16 <sup>4</sup>Department of Ophthalmology, The University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh,  
17 PA 15213, United States;

18 <sup>5</sup>Department of Ophthalmology and Vitreo-Retinal Diseases, Fondation Ophtalmologique  
19 Rothschild, F-75019 Paris, France;

20 <sup>6</sup>Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des XV-XX, F-75012 Paris.

21 † These authors contributed equally to this work.

22 \* These authors contributed equally to this work.

23

24 Corresponding author: Serge Picaud (serge.picaud@inserm.fr)

25 <http://www.researcherid.com/rid/H-4012-2014>

26

27

28

29

30 **Abstract**

31 Remote and precisely controlled activation of the brain is a fundamental challenge in the  
32 development of brain-machine interfaces (BMI) for neurological treatments. Low-frequency  
33 ultrasound stimulation can be used to modulate neuronal activity deep in the brain especially  
34 after expressing ultrasound-sensitive proteins. But so far, no study has described an  
35 ultrasound-mediated activation strategy whose spatiotemporal resolution is compatible with  
36 the mandatory needs of BMIs, in particular for visual restoration. Here we combined the  
37 expression of large-conductance mechanosensitive ion channels (MscL) with uncustomary  
38 high-frequency ultrasonic stimulation to activate retinal or cortical neurons over millisecond  
39 durations at a spatiotemporal resolution and acoustic energy deposit compatible with vision  
40 restoration. The *in vivo* sonogenetic activation of the visual cortex generated a behaviour  
41 associated to light perception. Our findings demonstrate that sonogenetics can deliver  
42 millisecond pattern presentations via an approach less invasive than current BMIs for visual  
43 restoration and a wide range of applications in neurological disorders.

44

45

46 It was anticipated that brain-machine interfaces (BMIs) based on multi-electrode  
47 arrays would provide solutions for many neurological disorders or deficits, including  
48 blindness<sup>1,2</sup>. Multi-electrode arrays have met with increasing success in peripheral sensory  
49 system rehabilitation strategies, for restoring hearing in the cochlea or sight in the retina, for  
50 example. The restoration of vision is, perhaps the most demanding challenge for BMIs, as it  
51 ultimately requires the 13Hz rate transmission of complex spatial patterns of stimulation<sup>3</sup>.  
52 Although form perception can be achieved by large surface electrodes with a slow dynamic<sup>4</sup>  
53 or by penetrating electrodes at the expense of invasiveness<sup>5</sup>, the need for non-contact distant  
54 activation of neuronal circuits has emerged. Optogenetic therapy provides an alternative for  
55 the non-invasive stimulation of neurons at higher resolution, as demonstrated on the retina  
56 even at the clinical level<sup>6</sup>. However, despite encouraging preliminary results in studies aiming  
57 to elicit visual perception at the cortical level<sup>7-9</sup>, approaches for optical stimulation of the  
58 cortex are hindered by the dura mater and by the scattering and absorption of light by tissues.  
59 Penetrating light guides have therefore been proposed as a means of maintaining the  
60 resolution of optical stimulation and its intensity within the brain after removal of the dura<sup>10</sup>.

61 Ultrasound (US) waves could potentially overcome these limitations, making it possible  
62 to focus at depth and to achieve the non-contact neuromodulation of cortical and subcortical  
63 areas of the brains<sup>11-17</sup>. However, this neuromodulation would require a craniotomy (Fig 1.a)  
64 and the use of high US frequencies to reach the required spatial resolution. Indeed, achievable  
65 resolution is increased by 30 when switching from 0.5 MHz to 15 MHz, the excited volume  
66 being then reduced by 27000. In the present study, the factor 2 in numerical aperture  
67 between the 0.5 MHz and the 15 MHz transducers reduces these numbers to a factor ~15 in  
68 resolution (Fig. 1c-e) and ~1700 in volume). Unfortunately, most existing US neuromodulation  
69 strategies are restricted to low-frequency transmissions<sup>13</sup>, resulting in poor spatial resolution  
70 (>3 mm) and long-lasting responses. A dual-crossed 5 MHz transducer system was proposed  
71 to improve the spatial resolution<sup>18</sup> while an inhibitory neuromodulation was demonstrated at  
72 a 30 MHz high frequency<sup>19</sup>. In fact, other attempts at high-frequency neuromodulation have  
73 resulted in high levels of acoustic energy<sup>20</sup>, with a risk of thermal heating<sup>21</sup> and US-mediated  
74 tissue damage<sup>17</sup>. This inevitable trade-off between spatial resolution and acoustic intensity  
75 has greatly limited the applicability of US neuromodulation for BMI.

76 Sonogenetic therapy has proposed to generate a neuronal mechano-sensitivity by the  
77 ectopic expression of US-sensitive proteins like the TRP1 ion channel<sup>22</sup>, the mechanosensitive

78 ion channel of large conductance (MscL)<sup>23</sup>, or the auditory-sensing protein prestin<sup>24</sup>. However,  
79 all these *in vivo* studies did not show a spatiotemporal resolution compatible for vision  
80 restoration. A high temporal resolution was shown for the MscL channel under pressure  
81 application but only in primary cultured hippocampal neurons<sup>25</sup>. This channel was also  
82 mutated to enhance its pressure sensitivity<sup>25,26</sup>. The MscL-G22S mutant was then successfully  
83 expressed *in vivo* in the mouse motor cortex and striatum to boost the ultrasound sensitivity  
84 of neurons<sup>23</sup>. For various *in vivo* applications of sonogenetics, AAV gene delivery was also  
85 reported to target the protein expression toward specific cell populations<sup>23,27,28</sup>.

86 In the present study, we have investigated if we can use the MscL channel<sup>29-32</sup> 1) to  
87 boost the neuronal sensitivity to US not only *ex vivo* but also *in vivo*, 2) to target a locally  
88 defined subset of neurons by gene therapy, which is not currently possible with non-specific  
89 US neuromodulation strategies, 3) to induce responses with a temporal precision (millisecond  
90 time delay and recovery) sufficient for visual restoration and 4) to gain more than one order  
91 of magnitude in spatial resolution through the *in vivo* use of high-frequency US, which was  
92 previously considered impossible *in vivo* without considerably increasing acoustic intensities  
93 and potential adverse effects<sup>20</sup>.

94 We first studied sonogenetic therapy in the retina, which serves as an easily accessible  
95 part of the central nervous system. In this natural mammalian neuronal circuit, we targeted  
96 the mechanosensitive ion channel of large conductance (MscL) specifically into rat retinal  
97 ganglion cells (RGCs), with *in vivo* intravitreal delivery by an adeno-associated vector (AAV).  
98 Here, RGCs were simply used as a neuronal model suitable for the *ex vivo* screening of acoustic  
99 parameters for effective sonogenetic stimulation in a realistic neural circuit, avoiding potential  
100 US interference<sup>33,34</sup> with the auditory system *in vivo*<sup>33,34</sup>. Vectors were produced with the MscL  
101 gene from *Escherichia coli* in its wild-type (WT) form and with a mutation, G22S<sup>26</sup>, which  
102 increased the sensitivity of cultured neurons to mechanical and ultrasonic stimulation<sup>25,26</sup>. An  
103 AAV2.7m8<sup>35</sup> serotype vector was used to encode the MscL channels fused to the red  
104 fluorescent protein tdTomato, under control of the SNCG promoter to target the RGC  
105 population specifically among the retinal neurons<sup>36</sup>. Following AAV injections, tdTomato  
106 expression was detected *in vivo*, on the eye fundus (Fig. 2a). Examination of the flat-mounted  
107 retina showed that tdTomato expression was restricted to the ganglion cell layer and the optic  
108 fiber bundles (Fig. E1b). We further demonstrated that expression was limited to RGCs, by  
109 labeling these cells with a specific antibody, RPBMS (Fig. 2b). Expression of the MscL gene

110 seemed to be concentrated at the cell membrane on the soma and axon (Fig. 2c). The staining  
111 indicated that, in the transfected area, 24% and 46% of RPBMS-positive cells expressed  
112 tdTomato, for the MscL-WT and MscL-G22S proteins, respectively (Fig. 2d).

113 We then evaluated RGC sensitivity to US, by performing *ex vivo* recordings of the retina  
114 on a multi-electrode array (Fig. 2e). In a retina expressing the MscL channel, RGCs displayed  
115 strong and sustained ON responses to focused 15 MHz US stimulation (Fig. 2f- left). These  
116 responses were different from that recorded in a non-transfected (NT) retina, in which RGCs  
117 presented an increase in spiking activity after the start of the stimulus (Fig. 2f-right) with  
118 relatively long latencies,  $50.4 \pm 4.2$  ms (Fig. 2g). By contrast, many RGCs of transfected retinas  
119 presented responses with a very short latency,  $12.2 \pm 2.5$  ms, (Fig. 2f- left), whereas others  
120 continued to respond with longer latencies (Fig. 2g). RGCs were classified into SL and LL (short  
121 and long latency cells) in terms of their response, with SL corresponding to a latency of less  
122 than 45 ms. Even if some RGCs of MscL-expressing retinas continued to respond with longer  
123 latencies, they presented a significantly shorter overall geometric mean latency, 24.35 ms  
124 (GSD: 6.06) than non-transfected RGCs, 46.62 ms (GSD: 1.42) ( $p < .0001$ , unpaired *t*-test on log-  
125 transformed values) (Fig E2c-d). The generation of SL ON US responses was not related to a  
126 specific RGC type (Fig. E2a), as they were measured both in cells with ON responses to light,  
127 and those with OFF responses to light (Fig. 2f-left). MscL expression decreased latency and  
128 increased the mean number of cells per retina responding to US (Fig. 2h). SL responding cells  
129 expressing MscL were sensitive at much lower US pressures than non-transfected cells and  
130 their number increased with increasing US pressures (Fig. 2i). SL US responses also involved  
131 higher firing rates and were more sustained than LL US responses (Fig. 2j). Moreover, we  
132 observed that the G22S mutation further enhanced the sensitivity of SL RGCs to lower US  
133 pressures (Fig. 2k).

134 We further investigated the origin of the sonogenetic responses, by adding a mixture  
135 of synaptic blockers (CNQX-LAP4-CPP) to the bath perfusing the retina. These synaptic  
136 blockers were found to abolish US responses in non-transfected retinas but not in MscL-  
137 transfected retinas, in which they did not suppress the SL US responses and only decreased  
138 the number of LL US responses (Fig. 2l, Fig E2c-d). This observation suggests that the MscL-  
139 mediated SL US responses are initiated by MscL-transfected RGCs, whereas most LL US  
140 responses in the transfected and non-transfected retina originate upstream from RGCs.  
141 However, LL US responses generated directly in RGCs could be related to low levels of MscL

142 expression. These conclusions were supported by data recorded with the retinas of blind P23H  
143 rats. No US responses were recorded for the non-transfected P23H retina (Fig. 2I),  
144 demonstrating that the LL US responses required synaptic transmission, as previously  
145 reported<sup>41</sup>, and suggesting a possible origin in photoreceptors. The US mechanosensitivity in  
146 photoreceptors of the non-transfected retina is highly reminiscent of the mechano-electrical  
147 transduction in auditory cells of the cochlea. The two sensory cells also express the Usher  
148 proteins known to play a role in the hearing mechanical transduction and likely involved in the  
149 phototropism of photoreceptors suspected in the Stiles Crawford effect<sup>37</sup>. This very high  
150 natural US sensitivity appears specific to sensory cells and therefore limited to sensory  
151 systems as indicated by the absence of such a natural ultrasound mechanosensitivity in the  
152 visual cortex (see below).

153 MscL-transfected P23H retinas displayed many SL US responses and few LL US  
154 responses, further demonstrating that MscL expression generates the SL responses in RGCs  
155 (Fig. 2I, Fig E2c-d). The residual LL responses for P23H and for blocker-bathed retinas may  
156 originate from RGCs with a lower level of MscL expression or from US wave reverberations in  
157 the recording chamber. The geometric mean latencies in all the MscL-tested groups were  
158 already very different from those for the non-transfected retina (Fig. E2c), but the cumulative  
159 distribution of latencies further highlighted these differences between the non-transfected  
160 retina and the other tested conditions in terms of latency distribution (Fig. E2d). We  
161 subsequently restricted our analyses to SL US responses. We investigated the temporal  
162 kinetics of US responses under various durations of US stimulation (Fig. 3a) and at various  
163 repetition rates (Fig. 3b). Neurons responded to even very short stimulation durations (10 ms),  
164 with responses showing a fast return to the control level of activity (Fig. 3a). For longer stimuli  
165 (100 ms or longer), habituation began to occur, with a reduction of the maximum firing rate  
166 (Fig. 3c). US response durations were correlated with stimulus duration (Fig. 3d). Using a  
167 different repetition rate of a 15 MHz US stimulus, RGCs were able to follow the rhythm up to  
168 a stimulus repetition frequency of 10 Hz (Fig. 3b-e). The Fano factor in the previous  
169 experiments indicated that the response had a low variability in spike count and possibly high  
170 information content (Fig. 3c-e).

171 We then investigated whether different US frequencies (0.5, 2.25 and 15 MHz) affected  
172 the spatial resolution of the response, in accordance with the measured US pressure fields,  
173 which became smaller at higher US frequencies (Fig. E3). Transducers were designed with a

174 similar focal distance ( $F = 31.7$  mm for the lower frequency and  $F = 25.4$  mm for the two higher  
175 frequencies) and numerical apertures (diameter  $\varnothing = 25.4$  mm for the lower frequency and  $\varnothing =$   
176  $12.7$  mm for the 2 higher frequencies, corresponding respectively to an aperture number  $F/\varnothing =$   
177  $1.25$  and  $2$  respectively), for the transmission of focused beams over different frequency  
178 ranges ( $f = 0.5$  MHz,  $f = 2.25$  MHz and  $f = 15$  MHz, corresponding to wavelengths of  $3.0$ ,  $0.7$   
179 and  $0.1$  mm, respectively) (Fig. 1c-e). Increasing the frequency of ultrasound stimulation from  
180  $0.5$  MHz (typical of neuromodulation) (Fig. 1c) to  $15$  MHz (Fig. 1e) has a major impact on the  
181 resolution that can be achieved: in our case the volume of the focal spot and therefore of the  
182 stimulated locus is diminished by a factor  $\sim 4100$  when replacing the  $0.5$  MHz transducer by  
183 the  $15$  MHz transducer. The features of the responses evoked by the different US frequencies  
184 were found to be similar (Fig. E2e-f). Figure 3f illustrates the distribution of responding cells  
185 on the recording chip under different US stimulation frequencies with the expected FWHM  
186 (full width at half maximum) distribution of the US pressure field (colored rings). Cells  
187 responding to US were widespread over the recorded area for  $0.5$  and  $2.25$  MHz, but appeared  
188 to be more confined for  $15$  MHz (Fig. 3f). The acoustic parameters used for this comparison  
189 were highly similar for the  $2.25$  MHz and  $15$  MHz beams (respectively  $100$  ms/ $1.1$  MPa and  
190  $100$  ms/ $1.3$  MPa). The acoustic pressure at  $0.5$  MHz was lower ( $0.5$  MPa) due to electric power  
191 limitation of our electronics at low transmit frequency but it already resulted in a very large  
192 spatial extent of activated cells. For each stimulated retina, we then calculated the spatial  
193 dispersion of activated cells; this value decreased significantly from  $1.48 \pm 0.12$  mm and  
194  $1.30 \pm 0.18$  mm at  $0.5$  MHz and  $2.25$  MHz, respectively, to  $0.59 \pm 0.03$  mm at  $15$  MHz (Fig. 3g).  
195 These distances were consistent with the size of the measured ultrasound pressure fields (Fig.  
196 1c-e); for the  $0.5$  MHz transducer, the focal spot of which was much larger than the MEA chip.  
197 This distance is close to the mean distance between randomly selected pairs of electrodes on  
198 the MEA chip ( $1.73$  mm). The density of activated cells increased significantly with increasing  
199 US frequency and activated cells were more widely dispersed on the larger stimulated area at  
200 lower frequencies (Fig. 3h). US stimulation is more effective at higher frequencies, because  
201 lower acoustic power values are required to activate an equivalent number of cells. Indeed,  
202 even if the acoustic intensities at  $2.25$  and  $15$  MHz were quite similar, the acoustic power  
203 delivered was almost two orders of magnitude lower at  $15$  MHz ( $0.03$  W) than at  $2.25$  MHz  
204 ( $0.82$  W). Interestingly, at  $15$  MHz, the stimulated area was small enough for the focal spot of  
205 the US probe to be moved above the isolated retina, triggering a shift in the responding cells

206 (Fig. 3i). This shift followed the probe's focal spot over the retina, in the same direction and  
207 with a consistent displacement amplitude. The center of the response was found to move in  
208 accordance with the displacement of the US transducer (Fig. 3j). These results demonstrate  
209 that our sonogenetic therapy approach can efficiently activate neurons with a millisecond and  
210 sub-millimetric precision.

211         Following this *ex vivo* demonstration on the retina, we then investigated whether the  
212 approach could also be applied to the brain *in vivo*, paving the way for a sonogenetic BMI using  
213 high frequency ultrasonic arrays implanted on a cranial window (Fig. 1A). As the G22S  
214 mutation enhanced the US sensitivity of RGCs *ex vivo*, we expressed this channel in the cortical  
215 neurons of the primary visual cortex (V1) in rats. We injected a AAV9.7m8 vector encoding the  
216 MscL-G22S channel fused to tdTomato under the control of the neuron-specific CamKII  
217 promoter into V1. TdTomato fluorescence was detected in the brain (Fig. 4a) and in cortical  
218 slices (Fig. 4b). V1 neurons expressed tdTomato, particularly in layer 4 (Fig. 4b). Staining with  
219 an anti-NeuN antibody showed that 33.4% of cortical neurons in the transfected area  
220 expressed tdTomato (Fig. 4c).

221         For investigation of the ability of a 15 MHz US stimulus to activate cortical neurons, we  
222 placed a micro-EcoG ( $\mu$ EcoG) electrode array on the cortical surface of V1 (Fig. 4d). In non-  
223 transfected (NT) animals, no US-evoked signal was recorded (Fig. 4e-right,  $n=3$  rats), whereas,  
224 in V1 expressing MscL-G22S, US stimulation of the cortical surface elicited large negative  
225  $\mu$ EcoG potentials (Fig. 4e-middle,  $n=6$  rats). These US-evoked negative deflections were  
226 different from the recorded visual-evoked potentials, which presented typical P0, N1 and P1  
227 positive and negative deflections (Fig. 4e-left). The US-evoked response was less complex due  
228 to the synchronous firing of all MscL-expressing neurons. The duration of the US responses  
229 was clearly related to the duration of the US stimulation (Fig. 4f). The amplitude of US-evoked  
230 potentials increased with both increasing US pressure (Fig. 4g) and increasing US stimulus  
231 duration (Fig. 4h). V1 cortical responses were again able to follow a repetition rate of up to 13  
232 Hz (Fig. 4i) even if peak amplitude decreased slightly for increasing stimulation frequencies.

233         We then investigated the spatial distribution of US-evoked neural activity. The peak  
234 depolarization of each channel was measured and linearly interpolated to build pseudocolor  
235 activation maps (Fig. 4j). The size of the US-responding cortical area was dependent on the US  
236 pressure (Fig. 4j-k), and ranged from  $0.58 \pm 0.17 \text{ mm}^2$  ( $n=6$  rats) to  $1.41 \pm 0.23 \text{ mm}^2$  ( $n=5$  rats)  
237 for US pressures of 0.26 and 1.27 MPa, respectively (Fig. 4l). We investigated the possibility of



238 achieving patterned US stimulations, by moving the US transducer in 0.4 mm steps over the  
239 recorded area. When the ultrasound probe was moved laterally, the source of the generated  
240 neuronal activity moved in a similar direction (Fig. 4k). The spatial location of the evoked  
241 potentials moved, on average, by  $0.29 \pm 0.09$  mm ( $n=6$  rats) from the previous location (Fig.  
242 4m), even though we moved the US transducer in 0.4 mm steps. This discrepancy between  
243 the displacement of the activated area and movement of the transducer was certainly related  
244 to the 300  $\mu$ m discrete spatial pitch distribution of the electrodes and the lateral spread of  
245 activity in the circuit. These results suggest that our approach to sonogenetic therapy could  
246 yield a spatial resolution of within 400  $\mu$ m for stimulations at 15 MHz, the focal spot of our 15  
247 MHz transducer being 276  $\mu$ m wide (Fig. 1d). This opens up the possibility of targeting small  
248 areas (down to 0.58 mm<sup>2</sup> for 0.26 MPa), depending on the pressure level. These very localized  
249 US-evoked responses and their dependence on the position of the US probe confirmed that  
250 they were due to the activation of MscL-G22S-expressing neurons and not to an indirect  
251 response related to auditory activation, as previously suggested by others<sup>33,34</sup>.

252 The possibility of using US stimulation to activate neurons at different depths was then  
253 explored. V1 neurons were recorded with a 16-site penetrating multi-electrode array (Fig. 4d).  
254 In V1 neurons expressing MscL-G22S, US stimulation at 15 MHz generated sustained  
255 responses even to 10 ms-long US stimuli (Fig. 4n). The latency of these responses was short  
256 ( $5.10 \pm 0.62$  ms  $n=27$  cells and  $7.51 \pm 1.00$  ms  $n=58$  cells, for 10 ms and 50 ms stimuli  
257 respectively, Fig. 4o), consistent with direct US activation of the recorded cortical neurons.  
258 Responding neurons were recorded at various cortical depths, ranging from 100  $\mu$ m to 1 mm  
259 (Fig. 4p), the focal spot diameter of the US probe being 3.75 mm in the xz plane. Deep neurons  
260 responded reliably to stimuli of decreasing duration, from 50 ms to 10 ms, with similar firing  
261 rates to stimuli of different durations, whereas longer stimuli induced responses in a broader  
262 population of neurons (Fig. 4q-r). To investigate if an US pattern could be applied for visual  
263 restoration at a refreshing rate of up to 13 Hz, we increased progressively the sequence of  
264 stimuli. Cortical neurons were able to generate distinct responses to each US stimulus up to a  
265 13 Hz repetition rate (Fig. 4s), but the number of responding cells decreased with increasing  
266 stimulus frequency (Fig. 4t).

267 To define if the US-elicited synchronous activation of MscL-expressing excitatory  
268 cortical neurons, can induce light perception, we assessed mouse behaviour during an  
269 associative learning test including 15 MHz US stimulation of V1 in MscL G22S-transfected

270 ( $n=14$ ) and non-transfected ( $n=9$ ) animals (Fig. 5 and E5). Mice subjected to water deprivation  
271 were trained to associate the visible-light stimulation of one eye with a water reward, as  
272 previously described<sup>38</sup> (Fig. 5a). This task was learned within four days, as indicated by the  
273 increasing success rate during this period, from  $30.9 \pm 17.9\%$  (SD) to  $86.2 \pm 14.1\%$  (SD) for  
274 MscL-G22S-transfected mice (Fig. 5b) and from  $30.5 \pm 28.2\%$  (SD) to  $91.7 \pm 10.3\%$  (SD) for  
275 non-transfected mice (Fig. E5c). The success rate was determined by assessing the occurrence  
276 of an anticipatory lick between the light being switched on and the release of the water reward  
277 500 ms later (Fig. 5a). Only mice reaching a 60% success rate on the 4<sup>th</sup> day were retained for  
278 this analysis and sessions showing a compulsive licking rate were excluded. Following this  
279 associative learning phase, the mice were subjected to US stimulation of V1 on day 5 (Fig. b).  
280 Following US stimulation at the highest pressure, MscL-G22S-transfected mice achieved a  
281 success rate  $69.3 \pm 25.4\%$  (SD), the difference of which showed no statistical difference with  
282 the success rate following light stimulation on day 4 (86.2%) (Fig. 5b). After a pause during the  
283 weekend (day 6-7), the animals retained the task, their success rates showing no statistically  
284 significant differences with the one following light stimulation (Fig. 5b). By contrast, in non-  
285 transfected animals, the success rate following the US stimulation of their visual cortex  
286 dropped to  $38.1 \pm 18.5\%$  (SD), the difference with the success rate following light stimulation  
287 on the 4<sup>th</sup> day was highly significant ( $p<0.0001$ ). In the AAV-injected mice, we found that the  
288 latency of the first anticipatory lick was shorter for sonogenetic stimulation ( $187.1 \pm 37.3$  ms;  
289  $n=14$ , SD) than for stimulation with a light flash ( $265.9 \pm 46.5$  ms;  $n=23$ , SD) (Fig. 5c). This  
290 shorter latency for the US response is consistent with the faster activation of cortical neurons  
291 for sonogenetic stimulation than for light stimulation of the eye (Fig. 4e), suggesting a shorter  
292 delay in the transfer of visual information from the eye to V1. Non-transfected animals were  
293 unable to associate the US-stimulation of their cortex to a light stimulation (Figs 5d, E5c),  
294 demonstrating that the sonogenetic activation of cortical neurons was truly the triggering  
295 factor, as opposed to the auditory perception of US, as previously reported for low-frequency  
296 US stimulation<sup>33,34</sup>. We applied different US pressures to the visual cortex in transfected mice  
297 and found that success rates increased with pressure (Fig. 5d), suggesting a brighter and/or a  
298 larger US-elicited percept with a greater US pressure as described with increasing currents in  
299 human patients<sup>5</sup>. Interestingly, the licking frequency during the 500 ms before delivery of the  
300 water reward also increased with US pressure (Fig. 5e). These results indicate that the

301 sonogenetic stimulation of the visual cortex generates a perception in mice that is likely  
302 associated to a visual perception.

303         The development of remotely controlled cortical and subcortical deep neuronal  
304 stimulation techniques is of considerable interest for the treatment of diverse neurological  
305 diseases and sensory handicaps. Optogenetics has been developed for this purpose in non-  
306 human primates<sup>39</sup>, but its potential for transfer into clinical practice is limited by the low level  
307 of light penetration and scattering into the brain tissue unless using an invasive optrode  
308 array<sup>10</sup>. A recent study with the very sensitive opsin, ChRmine, has however shown the  
309 possibility to stimulate deep into the rodent brain even from above the skull but without  
310 investigating the spatial resolution of the stimulations<sup>40</sup>. US stimulation can overcome these  
311 scattering and penetration limitations<sup>11, 13, 41, 42</sup>, but the optimal conditions for sonogenetic  
312 approaches, in terms of both genetic constructions and acoustic parameters, are far from  
313 clear. Most previous sonogenetic studies focused on the use of low-frequency US<sup>22-24</sup> as, in  
314 particular, in the recent demonstration of MscL-based sonogenetic activation in mice brain  
315 with long bursts of low-frequency US<sup>23</sup>. However, such low-frequency US waves lead to limited  
316 centimetric spatial resolutions (typically around 5x5x45 mm<sup>3</sup>) and an uncontrolled spatial  
317 beam distribution, due to the formation of standing waves<sup>43</sup>. In the rodent brain, this  
318 phenomenon generates reverberations throughout the entire braincase<sup>44</sup>, with the probable  
319 activation of non-target structures, such as the auditory pathway<sup>33,34</sup>. An alternative approach  
320 to spatially containing the US stimulation involves the use of higher US frequencies, but this  
321 was thought to demand higher energy levels, exceeding safety limits and favoring tissue  
322 damage<sup>20</sup>. The bacterial MscL channel has been reported to sensitize neurons to US<sup>23,25,26</sup> and  
323 to lower the pressure for neuronal activation, but its use for high-spatiotemporal resolution  
324 sonogenetic stimulation has yet to be shown to be effective *in vivo*. We first demonstrated  
325 the expression of MscL *in vivo* in the neurons of the retina. We then determined the most  
326 appropriate conditions for activating the MscL-transfected retinal neurons with high-  
327 frequency US providing thereby the combined temporal and spatial precisions.

328         The temporal precision of sonogenetics is lower than that achieved with optogenetic  
329 (> 40Hz) by the fastest opsins<sup>45</sup> and ChrimsonR<sup>46</sup>, which is successfully restoring vision at the  
330 retinal level in patients<sup>6</sup>. MscL only follows a 13 HZ frequency *in vivo*, which is in the same  
331 range as the 5-20 Hz achieved *in vivo* by the very sensitive opsin, ChRmine<sup>40</sup>, a frequency range  
332 likely sufficient for vision<sup>3</sup>. As for all gene therapies in non-dividing cells, the protein

333 expression is expected to be life long lasting as indicated by expression for nearly a decade in  
334 a previous dog study<sup>47</sup> although the corresponding treatment did not stop the ongoing  
335 degeneration of photoreceptors in patients<sup>48-50</sup>.

336 Working towards our goal of cortical visual restoration, we then showed that MscL-  
337 G22S was effectively expressed in cortical neurons. The activation of these MscL-expressing  
338 neurons resulted in responses with millisecond latencies and a spatial resolution of at least  
339 400  $\mu\text{m}$  in the *xy* plane, consistent with neuronal responses throughout the depth of the  
340 cortex (Fig. 4m-p). Moreover, MscL G22s expression in the visual cortex led to a behavioral  
341 response upon US stimulation, suggesting light perception following sonogenetic activation of  
342 the visual cortex. These sonogenetic responses were genuinely related to MscL expression, as  
343 they were not observed in non-transfected animals. Following previous demonstrations that  
344 the MscL channel is a suitable sonogenetic actuator<sup>23,25,26</sup>, we provide evidence that the MscL  
345 channel has appropriate kinetics for the activation of neurons at a precise spatiotemporal  
346 resolution *in situ* and *in vivo*. To preserve this spatiotemporal resolution, the ultrasound  
347 stimulator will require to be placed directly above the dura matter or above an ultrasound  
348 transparent artificial skull<sup>51</sup>.

349 Considering the safety issues, the sonogenetic approach presented here greatly  
350 decreased the US pressure required for the activation of RGCs and V1 cortical neurons by high-  
351 frequency US with stimulation sequences remaining below FDA safety limits (510k, Track 3)  
352 for US imaging (e.g. for a 10 ms US stimulus of 0.6 MPa, the non-derated  $I_{\text{sptp}}$  is 12  $\text{W}/\text{cm}^2$   
353 and the non derated  $I_{\text{spta}}$  value is 0.12  $\text{W}/\text{cm}^2$ ). These very low acoustic pressures and  
354 acoustic intensities prevent tissue damage, as they are similar to those that have been widely  
355 used in clinical diagnostic imaging for decades<sup>52-54</sup>. Moreover, simulations of US-induced  
356 heating in brain tissue revealed that typical US parameters (i.e. 20 ms, 1.27 MPa) (Fig. 4e-h)  
357 increased the local temperature by an estimated 0.12  $^{\circ}\text{C}$  (see methods), with even high  
358 repetition rates (up to 13 Hz) leading to a moderate temperature increase ( $<0.3$   $^{\circ}\text{C}$ ) (Fig. E4c-  
359 f). These low-temperature fluctuations (corresponding to “worst-case” scenarios as we used  
360 non derated US parameters) and stimulation sequences compliant with FDA limits suggest  
361 that our approach had no toxic side effects and that US-elicited responses were not  
362 temperature-driven and were therefore probably mediated by mechanical activation of the  
363 MscL channel by US. The clinical translation of this sonogenetic visual restoration will require  
364 further careful attention to the impact of hours-long exposure to ultrasonic waves on brain

365 tissues. Nevertheless, the fact that acoustics intensities and pressure used here remained far  
366 below the FDA requirements for conventional ultrasonic imaging in clinics<sup>55</sup> combined with  
367 very low temperature increase even for high activation repetition rate (13 Hz) in comparison  
368 with thermal damaging effects<sup>56</sup> raises high hopes for a smooth clinical translation. Moreover,  
369 a very recent safety study by Cheng et al<sup>19</sup> demonstrated an absence of brain tissue damages  
370 using high frequency activation at ten times higher acoustic intensities (continuous  
371 insonication at 11.8 W/cm<sup>2</sup> compared to our “worst case” Ispta 1.56 W/cm<sup>2</sup> for repeated  
372 stimulations at 13 Hz rate). To further reduce the ultrasound load on the visual cortex, visual  
373 restoration can take advantage of event-based camera, heat-sensitive camera or depth  
374 filtering imaging to limit visual information thus reducing the pixel number in an image<sup>57-60</sup>.

375 Restoration of form vision at cortical level was previously achieved with 0.5 to 1 mm  
376 surface electrodes spaced more than 1 mm apart<sup>4, 61, 62</sup> or with 1.5-mm-long penetrating  
377 electrodes spaced 400 $\mu$ m apart<sup>5</sup>. The spatial resolution of the proposed sonogenetic therapy  
378 therefore appears to be compatible with the cortical restoration of form vision but with a  
379 remote non-contact device. To preserve this spatiotemporal resolution, the ultrasound  
380 stimulator will require to be placed directly above the dura mater or above an ultrasound  
381 transparent artificial skull<sup>51</sup>. At 15 MHz, the typical penetration depth with negligible heating  
382 is typically 20 mm as extensively shown in neurofunctional ultrasound imaging in rodents<sup>63</sup>  
383 and primates<sup>64</sup>. Moreover, the resolution of the approach could be increased by using gene  
384 therapy to drive expression in specific cell populations and cell compartments<sup>36, 65</sup>. By  
385 contrast, the PRIMA retinal prosthesis has a better resolution at the retinal level with 100 $\mu$ m  
386 individual units<sup>66, 67</sup> whereas our sonogenetic strategy approaches the spatial distribution of  
387 activated cells by Argus-2 electrodes (200 $\mu$ m) on the isolated retina<sup>68</sup>. Further studies are  
388 required to generate an interface for coding visual information into US patterns transmitted  
389 by an ultrasonic matrix array onto the visual cortex at a video rate. Computer algorithms will  
390 probably be required in the pattern US encoder to model complex visual features, such as  
391 flicker fusion. However, our approach provides great hope for the development of high-  
392 resolution visual restoration at the cortical level, through its unique combination of a rapid  
393 response, high spatial resolution, and some cell selectivity with promoters, all features  
394 essential for video-rate brain-wide pattern stimulation. Even if this approach requires  
395 craniotomy, as for other existing visual prostheses, it provides a less invasive approach based  
396 on deep and distant cortical activation from above the dura mater following AAV cortical

397 injections. The reported long-term expression of genes following AAV gene therapy<sup>69</sup> suggests  
398 that this strategy could provide stable sight restoration. More generally, it paves the way for  
399 a new type of genetic-based brain-machine interface capable of compensating for disabilities  
400 and suitable for use in the treatment of neurological disorders.

## 401 **Methods**

### 402 **Animals**

403 All experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide  
404 for the Care and Use of Laboratory Animals. The experimental protocols were approved by  
405 the Local Animal Ethics Committee (Committee Charles Darwin no. 5, registration number  
406 9529 and 26889) and conducted in agreement with Directive 2010/63/EU of the European  
407 Parliament. All rats included in this study were Long Evans rats from Janvier Laboratories or  
408 P23H (line 1) transgenic rats. Wild-type mice (C57BL/6J) were obtained from Janvier  
409 Laboratories. Before being included in experimental procedures, at least 5 days of adaptation  
410 to the local animal facility were allowed to animals in which they were enclosed in a controlled  
411 environment with a half-day dark/light cycle with nutrition *ad libitum* with enrichment.

### 413 **Plasmid cloning & AAV production**

414 Plasmids containing the *Escherichia coli* *MscL* sequence in the WT form and with the G22S  
415 mutation were obtained from Francesco Difato (Addgene plasmids #107454 and #107455)<sup>26</sup>.  
416 For the targeting of retinal ganglion cells, the SNCG promoter<sup>36</sup> was inserted into an AAV  
417 backbone plasmid containing the *MscL* sequence fused to the tdTomato gene and the Kir2.1  
418 ER export signal, to drive expression at the plasma membrane. An AAV2.7m8 vector was used  
419 for intra-vitreous delivery. For the targeting of neurons in the cortical layers of V1, the SNCG  
420 promoter was replaced by the CamKII promoter and an AAV9.7m8 vector was chosen. All the  
421 recombinant AAVs used in this study were produced by the plasmid cotransfection method,  
422 and the resulting lysates were purified by iodixanol purification as previously described, to  
423 yield high titer recombinant AAV virus<sup>70</sup>.

### 425 **US stimulus**

426 Three focused ultrasound transducers with different central frequencies were used, to obtain  
427 focal spots of different sizes: a low-frequency transducer at 0.5 MHz (diameter  $\varnothing$  = 1 inch =

428 25.4mm, focal distance  $f = 1.25$  inch = 31.7 mm) (V301-SU, Olympus), a transducer at an  
429 intermediate frequency of 2.25 MHz ( $\varnothing = 0.5$  inch = 12.7 mm,  $f = 1$  inch = 25.4 mm) (V306-SU,  
430 Olympus) and a high-frequency transducer at 15 MHz ( $\varnothing = 0.5$  inch = 12.7 mm,  $f = 1$  inch =  
431 25.4 mm) (V319-SU, Olympus). In order to rely on comparable geometries for the focal spots  
432 at these different US frequencies (0.5 MHz, 2 MHz and 15 MHz), it was more relevant to use  
433 single focused elements creating conventional Bessel beams rather than linear arrays.  
434 Acoustic fields radiated by those three focused transducers are presented in Figure 1  
435 (simulations) and extended figure E3 (experimental measurements). A TiePie Handyscope  
436 (HS5, TiePie Engineering) was used to produce the stimulus waveform, which was then passed  
437 through an 80 dB RF power amplifier (VBA 230-80, Vectawave) connected to the transducer.  
438 Transducer pressure outputs (pressure at focus, 3D pressure maps) were measured in a  
439 degassed water tank with a Royer-Dieulesaint heterodyne interferometer<sup>71</sup>. The US stimuli  
440 used for *ex vivo* and *in vivo* stimulation had the following characteristics: 1 kHz pulse repetition  
441 frequency with a 50% duty cycle, sonication duration between 10 and 200 ms and inter-  
442 stimulus interval between 0.01 and 2 s. Peak acoustic pressures were ranging from 0.11-0.88  
443 MPa, 0.3-1.6 MPa, 0.2-1.27 MPa, for the 0.5, 2.25 and 15 MHz transducers, respectively. The  
444 corresponding estimated Isppa values were 0.39-25.14 W/cm<sup>2</sup>, 2.92-83.12 W/cm<sup>2</sup> and 1.30-  
445 52.37 W/cm<sup>2</sup>.

446

#### 447 ***Ex vivo***

#### 448 **Intra-vitreous gene delivery and retinal imaging**

449 Rats were anesthetized with isoflurane (5% for induction, 3% for maintenance) and 2  $\mu$ l of  
450 AAV suspension, containing between 8 and 14  $\times 10^{10}$  viral particles, was injected into the  
451 center of the vitreous cavity with direct observation of the tip of the needle. One month after  
452 injection, fluorescence imaging was performed on the injected eyes, with a Micron IV retinal  
453 imaging microscope (Phoenix Research Laboratories) used to observe MscL expression via the  
454 fluorescent tdTomato tag. Electrophysiological recordings were performed at least one month  
455 after injection.

456

#### 457 **MEA recordings**

458 Retinas were isolated under dim red light, in Ames' medium (A1420, Sigma-Aldrich) bubbled  
459 with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at room temperature. Pieces of the retina were flattened on a filter

460 membrane (Whatman, GE Healthcare Life Sciences) and placed on a poly-L-lysine (0.1%,  
461 Sigma) coated multi-electrode array (electrode diameter 30  $\mu\text{m}$ , spacing 200  $\mu\text{m}$ , MEA256  
462 200/30 iR-ITO, MultiChannel Systems) with retinal ganglion cells facing the electrodes. The  
463 retina was continuously perfused with bubbled Ames medium at 34 °C, at a rate of 2 ml/min,  
464 during experiments.

465 TdTomato fluorescence was checked before recordings, by using a stereo microscope (SMZ25,  
466 Nikon) to observe transgene expression in the recorded area. For some experiments the  
467 AMPA/kainate glutamate receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX,  
468 25  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich), the NMDA glutamate receptor antagonist [3H]3-(2-carboxypiperazin-  
469 4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP, 10  $\mu\text{M}$ , Sigma- Aldrich) and a selective group III  
470 metabotropic glutamate receptor agonist, L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4, 50  
471  $\mu\text{M}$ , Tocris Bioscience), were freshly diluted and bath-applied through the perfusion line 10  
472 minutes before recording. Full-field light stimuli were delivered with a digital micro-mirror  
473 display (DMD, Vialux, resolution 1024x768) coupled to a white light LED light source  
474 (MNWHL4, Thorlabs) focused on the photoreceptor plane. An irradiance of 1  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  was  
475 used. The US transducers were coupled with a custom-made coupling cone filled with  
476 degassed water, mounted on a motorized stage (PT3/M-Z8, Thorlabs) and placed orthogonally  
477 in the recording chamber above the retina. For positioning of the US transducer over the  
478 retina, the reflected signal of the MEA chip and the retina was detected with an US-key device  
479 (Lecoeur Electronique). The distance between the retina and the transducer was equal to the  
480 focal length of the transducer; this was verified with the flight time of the reflected signal. RGC  
481 recordings were digitized with a 252-channel preamplifier (MultiChannel Systems). Spikes  
482 from individual neurons were sorted with SpykingCircus software<sup>72</sup>. RGC responses were then  
483 analyzed with custom scripts written in Matlab (MathWorks). They were classified as ON, ON-  
484 OFF or OFF, with the response dominance index<sup>73</sup>. The latency of each cell relative to the start  
485 or end of the stimulus was calculated as the time between the start of the stimulus and the  
486 maximum of the derivative of spike density function. For cells responding to US stimulation,  
487 two classes were identified on the basis of latency — short and long latency — by fixing a  
488 threshold equal to the minimum of the latency distribution of the responses of non-  
489 transfected cells to US (45 ms). We determined the peak value A of spike density function for  
490 the calculation of response duration, which was defined as the time interval between the two  
491 time points for which the SDF was equal to  $A/e$  ( $e$ : Euler's number). The percentage of cells



492 responding to US stimulation of increasing US pressure was calculated as the ratio of the  
493 number of activated cells to the maximum number of responding cells for all the US pressures  
494 considered. The Fano factor, quantifying spike-count variability, was calculated as the ratio of  
495 the variance of the spike-count to the mean. Values close to 1 indicate that information can  
496 be transmitted. The Euclidean distance between two activated cells was weighted according  
497 to the maximum firing rate of the cells. The ratio of the number of activated cells to the size  
498 of the area stimulated on the MEA chip was calculated considering the size of the US focal  
499 spot for 2.25 and 15 MHz and the size of the MEA for 0.5 MHz, because the focal spot was  
500 larger than the MEA for this frequency. The center of the response was estimated by weighting  
501 the maximum firing rate of each cell by its distance from other responding cells, and the  
502 displacement of the response was calculated as the Euclidean distance between two center-  
503 of-response positions.

504

505 ***In vivo***

#### 506 **Intracranial injections**

507 Rats or mice were anesthetized with a ketamine/medetomidine mixture (40 mg/kg / 0.14  
508 mg/kg) or ketamine/xylazine (80 mg/kg / 8 mg/kg) respectively, and injected subcutaneously  
509 with Buprenorphine (0.05 mg/kg - Buprecare, Axience) before surgery. The surgical site was  
510 shaved, cleaned with antiseptic solution and a midline incision was made to expose the skull  
511 bone after local injection of Lidocaine (4 mg/kg) (Laocaine, Centravet). During all procedure,  
512 body temperature was maintained at 37°C by a thermostatically regulated heating pad, and  
513 eyes were covered with black tissue. The animal was placed in a stereotactic frame and holes  
514 were drilled at the injection sites. AAV suspensions were injected into the right hemisphere at  
515 two different locations in rats (2.6 mm ML, 6.8 mm AP and 3.1 mm ML, 7.2 mm AP from  
516 bregma) or at one location in mice (2.5 mm ML, 3.5 mm AP from bregma). In rats, for each  
517 injection site, 200 nl of viral vector (containing  $0.2-8 \times 10^{15}$  viral particles) was injected at three  
518 different depths (1100, 1350 and 1500  $\mu\text{m}$  DV) with a micro-syringe pump controller (Micro4,  
519 World Precision Instruments) operating at a rate of 50 nl/min and a 10  $\mu\text{l}$  Hamilton syringe. In  
520 mice, 1  $\mu\text{l}$  of viral vector (containing  $0.2-8 \times 10^{15}$  viral particles) was injected at -400  $\mu\text{m}$  DV at  
521 a rate of 100 nL/min. At the end of surgery, animals were awakened with subcutaneous  
522 injection of Atipamazole (0.9 mg/kg) (Antidorm, Axience)

523 All animals were injected subcutaneously with Buprenorphine (0.05 mg/kg) one day after the  
524 intracranial injections (Buprecare, Axience). Electrophysiological recordings or craniotomy  
525 surgery for behavioral training in mice were performed at least one month after injections.

526

### 527 ***In vivo* extracellular recordings**

528 Rats were anesthetized with a mixture of ketamine and medetomidine (40 mg/kg / 0.14  
529 mg/kg). Pupils were dilated with tropicamide (Mydriaticum, Dispersa). A small craniotomy  
530 (5x5 mm square) was drilled above V1 in the right hemisphere. Before recording, tdTomato  
531 fluorescence was checked with a Micron IV retinal imaging microscope (Phoenix Research  
532 Laboratories). A 32-site  $\mu$ Ecog electrode array (30  $\mu$ m electrode diameter, 300  $\mu$ m electrode  
533 spacing, FlexMEA36, MultiChannel Systems) was positioned over the transfected brain region  
534 for rats expressing MscL G22S or in a similar zone for control rats. After  $\mu$ Ecog recordings,  
535 multi-electrode (MEA) recordings were performed with a 16-site silicon microprobe (electrode  
536 diameter 30  $\mu$ m, spacing 50  $\mu$ m, A1x16-5mm-50-703, NeuroNexus Technologies). The MEA  
537 probe was advanced 1100  $\mu$ m into the cortex with a three-axis micromanipulator (Sutter  
538 Instruments, Novato, CA). The US transducer was coupled to the brain with a custom-made  
539 coupling cone filled with degassed water and US gel, and was positioned over the region of  
540 interest with a motorized stage. The probe and the US transducer were perpendicular for  
541  $\mu$ Ecog recordings and tilted at 45° for intracortical recording. The distance between the target  
542 in the cortex and the transducer was equal to the focal length of the transducer, as defined by  
543 custom-made US transducer coupling cones. Visual stimuli were generated by a white light-  
544 collimated LED (MNWHL4, Thorlabs) placed 15 cm away from the eye. Light irradiance at the  
545 level of the cornea was 4.5 mW/cm<sup>2</sup>. The  $\mu$ Ecog and extracellular signals were digitized with  
546 a 32-channel amplifier and a 16-channel amplifier, respectively (model ME32/16-FAI- $\mu$ PA,  
547 MultiChannel Systems).  $\mu$ Ecog recordings were further analyzed with custom-developed  
548 Matlab scripts. MEA recordings were further analyzed with SpykingCircus software, and  
549 single-cell events were analyzed with custom-developed Matlab scripts. For  $\mu$ Ecog recordings,  
550 response duration was calculated as the interval between the two time points at which the  
551 cortical evoked potential was equal to  $A/e$  (where  $A$  is peak depolarization and  $e$  is Euler's  
552 number). The peak depolarization of each channel was linearly interpolated to build  
553 pseudocolor activation maps. The activated area was defined as the area of the pseudocolor  
554 activation map over which peak depolarization exceeded the background noise level

555 calculated as 2 times the standard deviation of the signal. The center of the response was  
556 estimated by weighting the peak depolarization of each electrode by its distance from other  
557 electrodes. For intracortical recordings, cell latency was estimated as the time between the  
558 stimulus onset and the maximum of the derivative of spike density function.

559

### 560 **Surgery for *in vivo* behavioral testing**

561 Before surgery, mice were injected subcutaneously with Buprenorphine (0,05 mg/kg mouse)  
562 (Buprécare, Axience), and Dexamethasone (0,7 mg/kg) (Dexazone, Virbac). Animals were  
563 anesthetized with Isoflurane (5% induction, 2% maintenance, in air/oxygen mixture) and the  
564 head was shaved and cleaned with antiseptic solution. Next, animals were head-fixed on a  
565 stereotactic frame with an Isoflurane delivering system, eye ointment was applied and a black  
566 tissue was placed over the eyes. During all procedures when mice were under anesthesia,  
567 body temperature was maintained at 37°C by a thermostatically regulated heating pad. After  
568 a local injection of Lidocaine (4 mg/kg) (Laocaïne, Centravet), an incision of the skin was made.  
569 Two screws were fixed in the skull, after a small craniotomy (approximately 5 mm x 5 mm)  
570 was drilled above V1 in the right hemisphere (0.5 mm steel drill) and cortex buffer was applied.  
571 The cortex was covered with a TPX plastic sheet (125 µm thick) and sealed with dental acrylic  
572 cement (Tetric Evoflow). For behavioral experiments, a metallic headbar (Phenosys) for head  
573 fixation was then glued to the skull on the left hemisphere with dental cement (FUJUCEM II).  
574 At the end of the surgery, animals were placed in a recovery chamber, with subcutaneous  
575 injection of physiological serum and ointment on the eyes (Ophtalon, Centravet).  
576 Buprenorphine was injected during post-surgery monitoring. Behavioral training in mice was  
577 performed at least 10 days after the surgical procedure.

578

### 579 **Mouse behavioral tests**

580 C57BL6J mice were placed on a water restriction schedule, in which they received ~ 0.5-1 mL  
581 of water per day until they reached approximately 80-85% of their weight with water supplied  
582 *ad libitum*. Mice were progressively habituated to drinking from a syringe, and head fixation  
583 and enclosure in a cylindrical body tube for the first five days. They were then trained to  
584 respond to a light stimulus by performing a voluntary detection task: licking a waterspout  
585 (blunt 18G needle, approximately 5 mm from mouth) in response to white light full-field  
586 stimulation (200 and 50 ms long) of the left eye (dilated with tropicamide, Mydriaticum

587 Dispersa). Water (~4  $\mu$ L) was automatically dispensed 500 ms after the light was switched on,  
588 through a calibrated water system. The behavioral protocol and lick detection were controlled  
589 by a custom-made system, as previously described<sup>43</sup>. Visible light training lasted four days,  
590 with a typical training session lasting approximately 30 minutes and including 75-100 trials.  
591 After light stimulation training, four days (the first and second days were separated by a two-  
592 day break during the weekend) of US stimulation of the right hemisphere V1 were performed.  
593 During these four days, US stimulation was delivered for 50 ms at three different pressure  
594 values (0.2, 0.7 and 1.2 MPa). These pressure values were delivered each day but in a different  
595 order. Inter-trial intervals during the sessions varied randomly and ranged between 10 and 30  
596 s. The 15 MHz US transducer was coupled to the brain with a custom-made coupling cone  
597 filled with water and US gel, positioned over the region of interest with a motorized stage. We  
598 investigated the impact of light and US stimulation on mouse behavior, by assessing the  
599 success rate by counting the number of trials in which mice performed anticipatory licks  
600 (between the start of the stimulus and the opening of the water valve). The session  
601 anticipatory lick rate shown in Fig. 5e was calculated by subtraction from the anticipatory lick  
602 rate of a trial, the spontaneous lick rate (calculated on all the 1 s time windows before each  
603 individual stimulus onset (see figure 5a) for all trials) and multiplication by the success rate.  
604 Lick latency was calculated by determining the time to the first anticipatory lick after stimulus  
605 onset. All mice retained for the analysis presented a success rate superior or equal to 60% on  
606 the 4<sup>th</sup> day following light stimulation (LS). Then, Light or US sessions showing a compulsive  
607 licking behaviour were excluded based on the outlier identification made using ROUT method  
608 (Q = 1%) on the session spontaneous lick rate averaging the measurements on all the trials of  
609 the session in the 1s time window before the stimulus onset of the trial (see Fig. 5e).

610

611

### 612 **Immunohistochemistry and confocal imaging**

613 Transduced retinas and brains were fixed by incubation in 4% paraformaldehyde (100496,  
614 Sigma-Aldrich) for 30 minutes for retinas, and overnight for brains. Brains were cryoprotected  
615 in 30% sucrose (84097, Sigma-Aldrich), and 50  $\mu$ m thick sagittal slices were cut with a  
616 microtome (HM450, Microm). The slices displaying the highest levels of tdTomato  
617 fluorescence from each brain were selected for further immunohistochemistry and imaging.  
618 Retinas and sagittal brain cryosections were permeabilized by incubation in 0.5% Triton X-100

619 in PBS for 1 h at room temperature and then incubated in blocking buffer (PBS + 1% BSA +  
620 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Samples were incubated overnight at 4 °C with  
621 a monoclonal anti-RBPMS antibody (1:500, Rabbit, ABN1362, Merck Millipore) for the retina,  
622 with a monoclonal anti-NeuN antibody (1:500; Mouse, MAB377, Merck Millipore) for brain  
623 sections in 0.5x blocking buffer supplemented with 0.5% Triton X-100. The sections were then  
624 incubated with secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor (1:500; Molecular Probes)  
625 and DAPI (1:1000, D9542, Merck Millipore) for 1 h at room temperature. An Olympus FV1000  
626 laser scanning confocal microscope with 20x objective (UPLSAPO 20XO, NA: 0.85) was used to  
627 acquire images of flat-mounted retinas and brain sections.

628 For the assessment of transduction efficiency, confocal images were processed with FIJI  
629 (ImageJ). RBPMS- and NeuN-positive cells were counted automatically with the *Analyze*  
630 *particles* FIJI plugin. MscL-tdTomato- and MscL-tdTomato-RBPMS/NeuN-positive cells were  
631 counted manually by two different users, with the CellCounter FIJI plugin. For the retina,  
632 quantification was performed by identifying the transfected area in each retina and acquiring  
633 confocal stacks in at least four randomly chosen regions of 0.4 mm<sup>2</sup> per retina (Fig. E1). For V1  
634 neurons, the sagittal brain slice with the largest *MscL*-expressing zone was selected for each  
635 animal. In some slices, tdTomato also diffused outside V1. A ROI in V1 was, therefore, manually  
636 defined and quantifications were performed in at least six randomly chosen regions of 0.4  
637 mm<sup>2</sup>.

638

### 639 **US-induced tissue-heating simulations**

640 When considering cell stimulation at higher US frequencies (15 MHz) than usually described  
641 in the US neuromodulation literature, it is essential to estimate thermal effects as they can  
642 become important. A three-fold process was used for this estimation: 1) simulation of the  
643 acoustic fields generated by the three transducers used, with realistic acoustic parameters, 2)  
644 verification that non-linear acoustics did not play an important role in heat transfer and 3)  
645 realistic simulations of the heat transfer and temperature rise induced at the focus by US in a  
646 linear regime for the parameters used in this study.

647 For non-linear simulations we used Matlab's toolbox *kWave*, by defining the geometry of the  
648 transducer in 3D, and using the following parameters for the propagation medium (water):  
649 sound speed = 1500 m s<sup>-1</sup>, volumetric mass = 1000 kg m<sup>-3</sup>, non-linearity coefficient B/A =  
650 5, attenuation coefficient = 2.2 10<sup>-3</sup> dB cm<sup>-1</sup> MHz<sup>-y</sup>, and frequency power law of the

651 attenuation coefficient  $\gamma = 2^{-74}$ . We simulated quasi-monochromatic 3D wave-fields using long  
652 bursts of 50 cycles; this gave us both the maximum pressure field in 3D and the waveform at  
653 the focus. Simulations were calibrated by adjusting the input pressure (excitation of the  
654 simulated transducer) to reach the pressure at the focus measured in the water tank with the  
655 real transducers. The FWHM focal spot diameter in the  $xy$  plane was 4.36, 1.61 and 0.276 mm,  
656 and the major axis in the  $xz$  plane was 32.3, 20.6 and 3.75 mm long for the 0.5, 2.25 and 15  
657 MHz transducers, respectively (Fig. 1b-d). Non-linear effects were evaluated by estimating the  
658 relative harmonic content of the waveform at the focus. In the 15 MHz focus transducer  
659 example in figure 1d, the experimental and simulated signals at the focal spot were compared  
660 and found to be highly concordant (Fig. E4a). Furthermore, the amplitude of the second  
661 harmonic is 19.8 dB below the fundamental (20.9 dB in the simulated case), meaning that if  
662 the fundamental energy is  $E$ , the second harmonic has energy  $E/95$  (Fig. E4b). Therefore, we  
663 can reasonably neglect the non-linear effects in the calculations of the thermal effects, as they  
664 account for  $\sim 1\%$  of the energy involved. The same conclusions were drawn at 0.5 MHz and 15  
665 MHz. The use of linear wave propagation approximations considerably decreased the  
666 computing cost of the simulations. Linear propagation simulations were conducted with the  
667 *Field II* toolbox in Matlab<sup>75,76</sup>, in monochromatic mode, with the same medium properties as  
668 *kWave* (water), to obtain the 3D maximum pressure fields. These maximum pressure fields  
669 were used to build a heating source term  $S = \frac{2}{\rho c^3} \alpha |p|^2$ , where  $\alpha$  is the absorption  
670 coefficient of the brain at the considered frequency ( $59.04 \text{ Np m}^{-1}$  at 15 MHz, calculated from  
671  $\alpha = 0.21 \text{ dB cm}^{-1} \text{ MHz}^{-\gamma}$  and  $\gamma = 1.18$ ), the brain volumetric mass  $\rho = 1046 \text{ kg m}^{-3}$ , the  
672 brain sound speed  $c = 1546 \text{ m s}^{-1}$ <sup>61,64</sup>, and  $p$  is the 3D maximum pressure field. This  
673 source term was then used in the resolution of a Pennes' bioheat equation  $\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) - \rho_b c_b (T - T_a) + S$   
674  $(\rho, c) - (\rho_b, c_b) + k$  in *kWave*, where  $\rho_b$  is the blood specific  
675 heat capacity ( $3630 \text{ J.kg}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $k$  the brain thermal conductivity ( $0.51 \text{ W.m}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $\rho_b$  the  
676 blood density  $1050 \text{ kg m}^{-3}$ ,  $c_b$  the blood specific heat capacity ( $3617 \text{ J.kg}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $T_a$  the  
677 blood perfusion coefficient ( $9.7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ),  $T_a$  the arterial temperature ( $37^\circ\text{C}$ ), and  $S = \frac{2}{\rho c^3} \alpha |p|^2$   
678 with  $S$  the heat generation of the brain tissue ( $11.37 \text{ W.kg}^{-1}$ )<sup>77,78</sup>. The initial  
679 condition for brain temperature was set to  $T_0 = 37^\circ\text{C}$ .

680

681 This simulation corresponds to the worst-case scenario regarding the temperature rise given:  
682 1) that the acoustic propagation is simulated in water only (non derated value), with a lower  
683 attenuation coefficient ( $2.2 \cdot 10^{-3} \text{ dB cm MHz}^{-2}$ ) than the brain ( $0.59 \text{ dB cm MHz}^{-1.27}$ ), even if a  
684 part of the propagation occurs within the brain. maps are, therefore, overestimated. 2)  
685 thermal absorption is simulated in brain tissue only, with a higher absorption coefficient ( $0.21$   
686  $\text{ dB cm MHz}^{-1.18}$ ) than water, even if a part of the maximum pressure field is actually located  
687 within the water of the acoustic coupling cone. is, therefore, slightly overestimated. We  
688 mapped the temperature in three spatial dimensions and time, and looked for the point of  
689 maximal temperature rise (Fig. E4 c-f).

690

### 691 **Statistical analysis**

692 Statistical analysis was carried out with Prism software (Prism 7, GraphPad). All values are  
693 expressed and represented as means  $\pm$  the standard error of the mean (SEM) on figures and  
694 in the text unless specified. Standard deviations (SD) are provided in figure legends. Data were  
695 analyzed in unpaired Welch's *t*-tests (two-tailed) or an unpaired multiple *t*-tests with Sidak-  
696 Bonferroni correction for multiple comparisons. The statistical tests performed are detailed in  
697 the figure legends.

698

### 699 **Data availability**

700 The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author  
701 upon reasonable request.

702

### 703 **Code availability**

704 The custom Matlab codes are available from the corresponding author upon reasonable  
705 request.

706

### 707 **Acknowledgements**

708 The authors would like to thank C. Joffrois, M. Valet, Q. Cesar, M. Desrosiers, S. Fouquet, P.  
709 Annic, M. Celik, Z. Raics for technical help and scientific advice. This work was supported by  
710 the European Research Council (ERC) Synergy Grant Scheme (holistic evaluation of light and  
711 multiwave applications to high-resolution imaging in ophthalmic translational research

712 revisiting the Helmholtzian synergies, ERC Grant Agreement #610110), by the European  
713 Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No.  
714 785219 (Graphene Flagship Core 2) No. 881603 (Graphene flagship Core3), by the Foundation  
715 Fighting Blindness, La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM EQUIPE  
716 EQU202106012159), l'UNIM, la Fédération des Aveugles de France, Optic 2000, the city of  
717 Paris, Région ile de France, the Agence Nationale de la Recherche (ANR BrainOptoSight), and  
718 French state funds managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) within  
719 Programme Investissements d'Avenir, Laboratoire d'Excellence (LABEX) LIFESENSES (ANR-10-  
720 LABX-0065) and Institut Hospitalo-Universitaire FOrESIGHT (ANR-18-IAHU-0001), by NIH  
721 CORE Grant P30 EY08098 to the Department of Ophthalmology, the Eye and Ear Foundation  
722 of Pittsburgh, and from an unrestricted grant from Research to Prevent Blindness, New York,  
723 NY.

724

#### 725 **Author Contributions**

726 S.C, C.D. designed the experiments, S.C., M.P., G.L., I.A., J.L, R.G., E.B., J.D. carried out the  
727 experiments and analyzed the data, M.P., D.N., G.G., F.A., O.M., D.D., M.S., B.R. provided  
728 support for experiments, study design and data analysis, S.P., M.T. , J.S. conceived the idea for  
729 this project and supervised the analysis of the data obtained. S.C., S.P., M.T., C.D, wrote the  
730 manuscript. All authors provided critical feedback on the research and the manuscript.

#### 731 **Competing interest declaration**

732 The authors have filed for a patent for devices and methods for sonogenetic stimulation.

#### 733 **Materials & Correspondence**

734 Correspondence and requests for materials should be addressed to serge.picaud@inserm.fr.

735

#### 736 **References**

- 737 1. Lebedev, M.A. & Nicolelis, M.A. Brain-Machine Interfaces: From Basic Science to  
738 Neuroprostheses and Neurorehabilitation. *Physiol Rev* **97**, 767-837 (2017).
- 739 2. Lewis, P.M., Ackland, H.M., Lowery, A.J. & Rosenfeld, J.V. Restoration of vision in  
740 blind individuals using bionic devices: a review with a focus on cortical visual  
741 prostheses. *Brain Res* **1595**, 51-73 (2015).
- 742 3. VanRullen, R. Perceptual Cycles. *Trends Cogn Sci* **20**, 723-735 (2016).

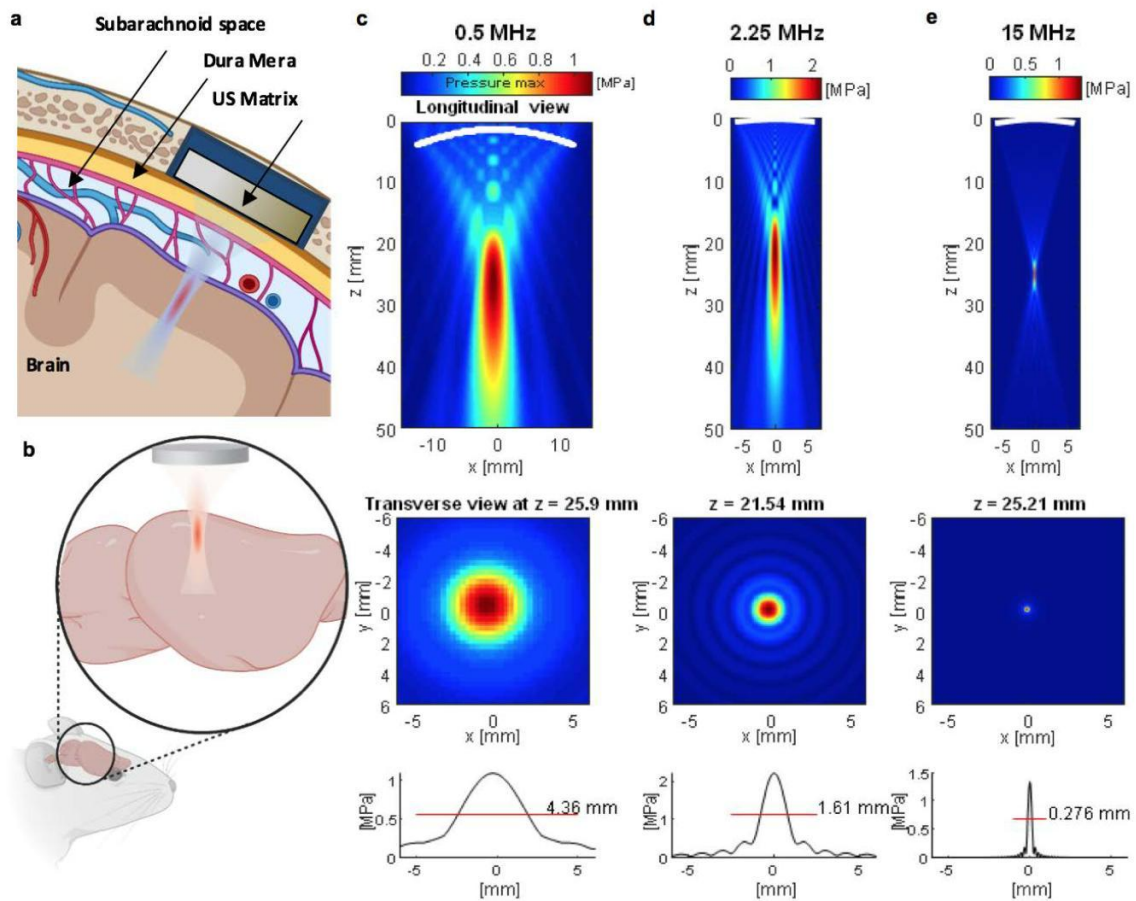


- 743 4. Beauchamp, M.S. et al. Dynamic Stimulation of Visual Cortex Produces Form Vision in  
744 Sighted and Blind Humans. *Cell* **181**, 774-783 e775 (2020).
- 745 5. Fernandez, E. et al. Visual percepts evoked with an intracortical 96-channel  
746 microelectrode array inserted in human occipital cortex. *J Clin Invest* **131** (2021).
- 747 6. Sahel, J.A. et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic  
748 therapy. *Nat Med* (2021).
- 749 7. Jazayeri, M., Lindbloom-Brown, Z. & Horwitz, G.D. Saccadic eye movements evoked  
750 by optogenetic activation of primate V1. *Nat Neurosci* **15**, 1368-1370 (2012).
- 751 8. Ju, N., Jiang, R., Macknik, S.L., Martinez-Conde, S. & Tang, S. Long-term all-optical  
752 interrogation of cortical neurons in awake-behaving nonhuman primates. *PLoS Biol*  
753 **16**, e2005839 (2018).
- 754 9. Chernov, M.M., Friedman, R.M., Chen, G., Stoner, G.R. & Roe, A.W. Functionally  
755 specific optogenetic modulation in primate visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
756 **115**, 10505-10510 (2018).
- 757 10. McAlinden, N. et al. Multisite microLED optrode array for neural interfacing.  
758 *Neurophotonics* **6**, 035010 (2019).
- 759 11. Legon, W. et al. Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary  
760 somatosensory cortex in humans. *Nat Neurosci* **17**, 322-329 (2014).
- 761 12. Legon, W., Bansal, P., Tyshynsky, R., Ai, L. & Mueller, J.K. Transcranial focused  
762 ultrasound neuromodulation of the human primary motor cortex. *Sci Rep* **8**, 10007  
763 (2018).
- 764 13. Tufail, Y., Yoshihiro, A., Pati, S., Li, M.M. & Tyler, W.J. Ultrasonic neuromodulation by  
765 brain stimulation with transcranial ultrasound. *Nat Protoc* **6**, 1453-1470 (2011).
- 766 14. Tufail, Y. et al. Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits. *Neuron*  
767 **66**, 681-694 (2010).
- 768 15. Deffieux, T. et al. Low-intensity focused ultrasound modulates monkey visuomotor  
769 behavior. *Curr Biol* **23**, 2430-2433 (2013).
- 770 16. Mehic, E. et al. Increased anatomical specificity of neuromodulation via modulated  
771 focused ultrasound. *PLoS One* **9**, e86939 (2014).
- 772 17. Lee, W. et al. Image-Guided Focused Ultrasound-Mediated Regional Brain  
773 Stimulation in Sheep. *Ultrasound Med Biol* **42**, 459-470 (2016).
- 774 18. Kim, S. et al. Transcranial focused ultrasound stimulation with high spatial resolution.  
775 *Brain Stimul* **14**, 290-300 (2021).
- 776 19. Cheng, Z. et al. High resolution ultrasonic neural modulation observed via in vivo two-  
777 photon calcium imaging. *Brain Stimul* **15**, 190-196 (2022).
- 778 20. Ye, P.P., Brown, J.R. & Pauly, K.B. Frequency Dependence of Ultrasound  
779 Neurostimulation in the Mouse Brain. *Ultrasound Med Biol* **42**, 1512-1530 (2016).
- 780 21. Constans, C., Mateo, P., Tanter, M. & Aubry, J.F. Potential impact of thermal effects  
781 during ultrasonic neurostimulation: retrospective numerical estimation of  
782 temperature elevation in seven rodent setups. *Phys Med Biol* **63**, 025003 (2018).
- 783 22. Yang, Y. et al. Sonogenetics for noninvasive and cellular-level neuromodulation in  
784 rodent brain. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.01.28.919910> (2020).
- 785 23. Qiu, Z. et al. Targeted Neurostimulation in Mouse Brains with Non-invasive  
786 Ultrasound. *Cell Rep* **32**, 108033 (2020).
- 787 24. Huang, Y.S. et al. Sonogenetic Modulation of Cellular Activities Using an Engineered  
788 Auditory-Sensing Protein. *Nano Lett* **20**, 1089-1100 (2020).

- 789 25. Ye, J. et al. Ultrasonic Control of Neural Activity through Activation of the  
790 Mechanosensitive Channel MscL. *Nano Lett* **18**, 4148-4155 (2018).
- 791 26. Soloperto, A. et al. Mechano-sensitization of mammalian neuronal networks through  
792 expression of the bacterial large-conductance mechanosensitive ion channel. *J Cell*  
793 *Sci* **131** (2018).
- 794 27. Wu, X. et al. Sono-optogenetics facilitated by a circulation-delivered rechargeable  
795 light source for minimally invasive optogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019).
- 796 28. Yang, Y. et al. Sonothermogenetics for noninvasive and cell-type specific deep brain  
797 neuromodulation. *Brain Stimul* **14**, 790-800 (2021).
- 798 29. Sukharev, S., Betanzos, M., Chiang, C.S. & Guy, H.R. The gating mechanism of the  
799 large mechanosensitive channel MscL. *Nature* **409**, 720-724 (2001).
- 800 30. Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F.R. & Kung, C. A large-conductance  
801 mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by mscL alone. *Nature* **368**, 265-268  
802 (1994).
- 803 31. Hamill, O.P. & Martinac, B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells.  
804 *Physiol Rev* **81**, 685-740 (2001).
- 805 32. Perozo, E. Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**,  
806 109-119 (2006).
- 807 33. Sato, T., Shapiro, M.G. & Tsao, D.Y. Ultrasonic Neuromodulation Causes Widespread  
808 Cortical Activation via an Indirect Auditory Mechanism. *Neuron* **98**, 1031-1041 e1035  
809 (2018).
- 810 34. Guo, H. et al. Ultrasound Produces Extensive Brain Activation via a Cochlear Pathway.  
811 *Neuron* **98**, 1020-1030 e1024 (2018).
- 812 35. Dalkara, D. et al. In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for  
813 therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* **5**, 189ra176  
814 (2013).
- 815 36. Chaffiol, A. et al. A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with  
816 Enhanced Sensitivity in Macaque Retina. *Mol Ther* **25**, 2546-2560 (2017).
- 817 37. Verschueren, A. et al. Planar polarity in primate cone photoreceptors: a potential role  
818 in Stiles Crawford effect phototropism. *Commun Biol* **5**, 89 (2022).
- 819 38. Nelidova, D. et al. Restoring light sensitivity using tunable near-infrared sensors.  
820 *Science* **368**, 1108-1113 (2020).
- 821 39. El-Shamayleh, Y. & Horwitz, G.D. Primate optogenetics: Progress and prognosis. *Proc*  
822 *Natl Acad Sci U S A* (2019).
- 823 40. Chen, R. et al. Deep brain optogenetics without intracranial surgery. *Nat Biotechnol*  
824 **39**, 161-164 (2021).
- 825 41. Lee, W. et al. Transcranial focused ultrasound stimulation of human primary visual  
826 cortex. *Sci Rep* **6**, 34026 (2016).
- 827 42. Folloni, D. et al. Manipulation of Subcortical and Deep Cortical Activity in the Primate  
828 Brain Using Transcranial Focused Ultrasound Stimulation. *Neuron* **101**, 1109-1116  
829 e1105 (2019).
- 830 43. Baron, C., Aubry, J.F., Tanter, M., Meairs, S. & Fink, M. Simulation of intracranial  
831 acoustic fields in clinical trials of sonothrombolysis. *Ultrasound Med Biol* **35**, 1148-  
832 1158 (2009).
- 833 44. Younan, Y. et al. Influence of the pressure field distribution in transcranial ultrasonic  
834 neurostimulation. *Med Phys* **40**, 082902 (2013).

- 835 45. Aravanis, A.M. et al. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor  
836 cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J Neural Eng* **4**, S143-  
837 156 (2007).
- 838 46. Klapoetke, N.C. et al. Independent optical excitation of distinct neural populations.  
839 *Nat Methods* **11**, 338-346 (2014).
- 840 47. Cideciyan, A.V. et al. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis  
841 shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc*  
842 *Natl Acad Sci U S A* **110**, E517-525 (2013).
- 843 48. Daich Varela, M., Cabral de Guimaraes, T.A., Georgiou, M. & Michaelides, M. Leber  
844 congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: current management and  
845 clinical trials. *Br J Ophthalmol* **106**, 445-451 (2022).
- 846 49. Bainbridge, J.W. et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital  
847 amaurosis. *N Engl J Med* **372**, 1887-1897 (2015).
- 848 50. Jacobson, S.G. et al. Improvement in vision: a new goal for treatment of hereditary  
849 retinal degenerations. *Expert Opin Orphan Drugs* **3**, 563-575 (2015).
- 850 51. Flores, A.R. et al. Safety, Feasibility, and Patient-Rated Outcome of Sonolucent  
851 Cranioplasty in Extracranial-Intracranial Bypass Surgery to Allow for Transcranioplasty  
852 Ultrasound Assessment. *World Neurosurg* **144**, e277-e284 (2020).
- 853 52. Sapareto, S.A. Thermal isoeffect dose: addressing the problem of thermotolerance.  
854 *Int J Hyperthermia* **3**, 297-305 (1987).
- 855 53. Barnett, S.B. et al. International recommendations and guidelines for the safe use of  
856 diagnostic ultrasound in medicine. *Ultrasound Med Biol* **26**, 355-366 (2000).
- 857 54. ter Haar, G. Ultrasound bioeffects and safety. *Proc Inst Mech Eng H* **224**, 363-373  
858 (2010).
- 859 55. Marketing Clearance of Diagnostic Ultrasound Systems and Transducers  
860 *Food and Drug Administration* <https://www.fda.gov/media/71100/download> (2019).
- 861 56. Sapareto, S.A. & Dewey, W.C. Thermal dose determination in cancer therapy. *Int J*  
862 *Radiat Oncol Biol Phys* **10**, 787-800 (1984).
- 863 57. Lorach, H. et al. Artificial retina : The multichannel processing of the mammalian  
864 retina achieved with a neuromorphic asynchronous light acquisition device. *J Neural*  
865 *Eng* **9**, 066004 (2012).
- 866 58. Kartha, A. et al. Prosthetic Visual Performance Using a Disparity-Based Distance-  
867 Filtering System. *Transl Vis Sci Technol* **9**, 27 (2020).
- 868 59. Sadeghi, R. et al. Glow in the dark: Using a heat-sensitive camera for blind individuals  
869 with prosthetic vision. *Vision Res* **184**, 23-29 (2021).
- 870 60. Montezuma, S.R. et al. Improved localisation and discrimination of heat emitting  
871 household objects with the artificial vision therapy system by integration with  
872 thermal sensor. *Br J Ophthalmol* **104**, 1730-1734 (2020).
- 873 61. Brindley, G.S. & Lewin, W.S. The sensations produced by electrical stimulation of the  
874 visual cortex. *J Physiol* **196**, 479-493 (1968).
- 875 62. Dobbie, W.H. Artificial vision for the blind by connecting a television camera to the  
876 visual cortex. *Asaio J* **46**, 3-9 (2000).
- 877 63. Mace, E. et al. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods* **8**, 662-664  
878 (2011).
- 879 64. Dizeux, A. et al. Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of  
880 task-related brain activity in behaving primates. *Nat Commun* **10**, 1400 (2019).

- 881 65. Greenberg, K.P., Pham, A. & Werblin, F.S. Differential targeting of optical  
882 neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of  
883 center-surround antagonism. *Neuron* **69**, 713-720 (2011).
- 884 66. Prevot, P.H. et al. Behavioural responses to a photovoltaic subretinal prosthesis  
885 implanted in non-human primates. *Nat Biomed Eng* **4**, 172-180 (2020).
- 886 67. Palanker, D., Le Mer, Y., Mohand-Said, S., Muqit, M. & Sahel, J.A. Photovoltaic  
887 Restoration of Central Vision in Atrophic Age-Related Macular Degeneration.  
888 *Ophthalmology* **127**, 1097-1104 (2020).
- 889 68. Weitz, A.C. et al. Improving the spatial resolution of epiretinal implants by increasing  
890 stimulus pulse duration. *Sci Transl Med* **7**, 318ra203 (2015).
- 891 69. Acland, G.M. et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-  
892 mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol*  
893 *Ther* **12**, 1072-1082 (2005).
- 894 70. Choi, V.W., Asokan, A., Haberman, R.A. & Samulski, R.J. Production of recombinant  
895 adeno-associated viral vectors for in vitro and in vivo use. *Curr Protoc Mol Biol*  
896 **Chapter 16**, Unit 16 25 (2007).
- 897 71. Royer, D. & Dieulesaint, E. Optical probing of the mechanical impulse response of a  
898 transducer. . *Applied Physics Letters* **49**, 1056–1058 (1986).
- 899 72. Yger, P. et al. A spike sorting toolbox for up to thousands of electrodes validated with  
900 ground truth recordings in vitro and in vivo. *Elife* **7** (2018).
- 901 73. Akerman, C.J., Smyth, D. & Thompson, I.D. Visual experience before eye-opening and  
902 the development of the retinogeniculate pathway. *Neuron* **36**, 869-879 (2002).
- 903 74. Duck, F.A. A. Physical Properties of Tissues: A Comprehensive Reference Network. ,  
904 (Academic Press, ). *Ultrasound in Medicine & Biology* **36**, (Academic Press) (1990).
- 905 75. Jensen, J.A. & Svendsen, N.B. Calculation of pressure fields from arbitrarily shaped,  
906 apodized, and excited ultrasound transducers. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq*  
907 *Control* **39**, 262-267 (1992).
- 908 76. Jensen, J.A. A Program for Simulating Ultrasound Systems. *Medical & Biological*  
909 *Engineering & Computing* **34**, 351-353 (1996).
- 910 77. DATABASE., I.F. Available at: [https://itis.swiss/virtual-population/tissue-](https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database)  
911 [properties/database](https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database). (Accessed: 17th August 2020).
- 912 78. McIntosh, R.L. & Anderson, V.A. A comprehensive tissue properties database  
913 provided for the thermal assessment of a human at rest. *Biophysical Reviews and*  
914 *Letters* **5**, 129–151 (2010).
- 915
- 916
- 917



919

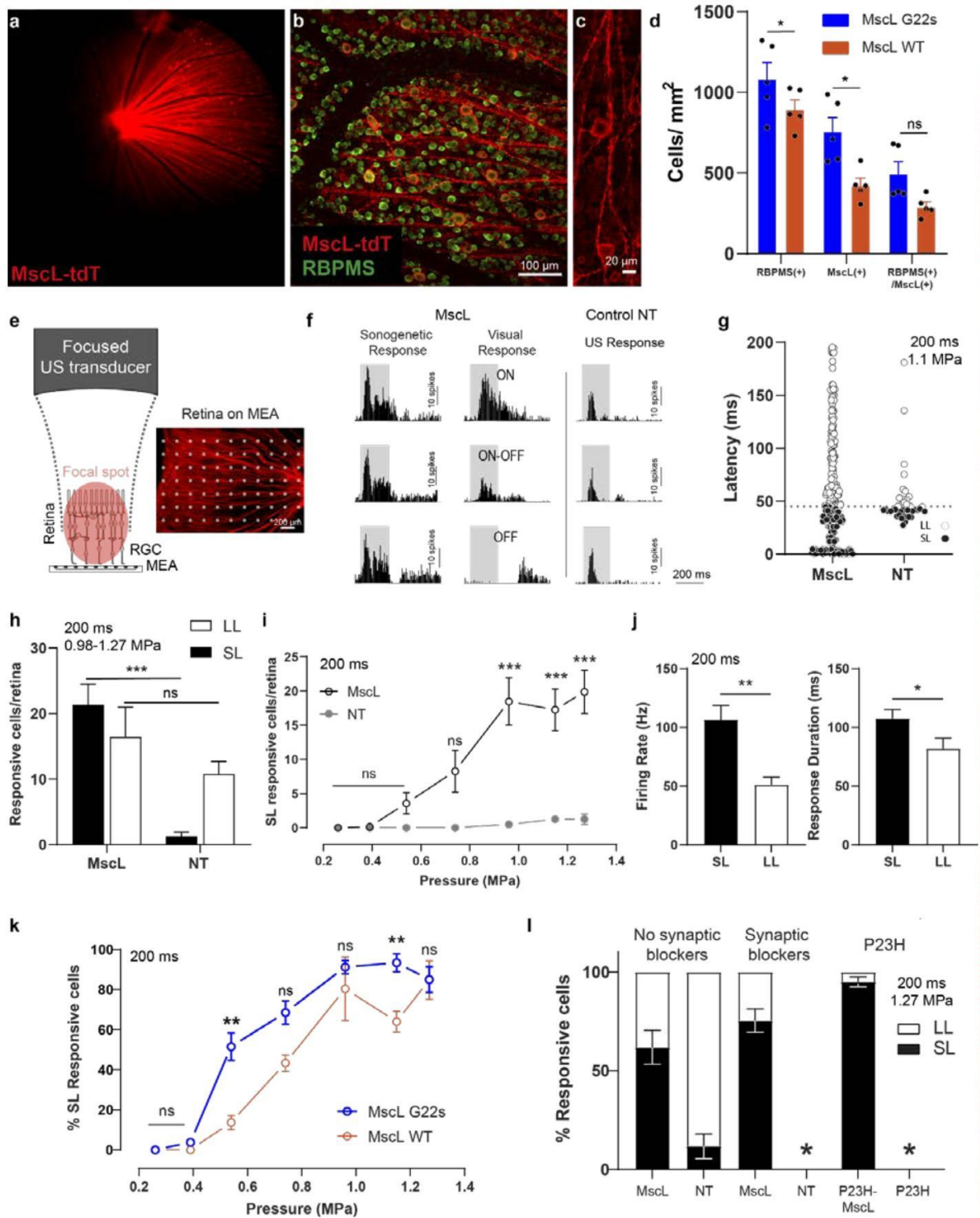
920

921 **Fig. 1 Sonogenetics using focused ultrasound beams for visual restoration through the intact dura**  
 922 **mater: impact of ultrasonic transmission frequency.** (a) Concept of visual restoration with US matrix  
 923 arrays implanted in a cranial window for localized US neuromodulation of the primary visual cortex in  
 924 humans. The US beam can be adaptively focused at different locations in the V1 cortex while passing  
 925 through the intact dura mater, subdural and subarachnoid spaces. (b) Proof-of-concept setup used in  
 926 this study for V1 sonogenetic activation in rodents, using a high-frequency focused transducer on a  
 927 craniotomized mouse. (c) Characterization of the radiated field for the 0.5 MHz transducer used in this  
 928 study. (top) Longitudinal view of the maximal pressure for a monochromatic acoustic field radiated at  
 929 0.5 MHz by the 25.4 mm  $\varnothing$ , 31.75 mm focus transducer. Pressure maximum is reached at 25.9 mm,  
 930 slightly closer to the transducer than the geometric focal point, which is a documented effect <sup>66</sup>.  
 931 (middle) Transverse section of the maximal pressure field at depth  $z = 25.9$  mm. (bottom) One-  
 932 dimensional profile of this transverse section giving the FWHM of the focal spot (4.36 mm at 0.5 MHz).  
 933 (d) Same characterization for the 2.25 MHz 12.7mm  $\varnothing$  25.4 mm focus transducer. (e) Same  
 934 characterization for the 15 MHz 12.7mm  $\varnothing$  25.4 mm focus transducer. Note that the maximum

935 pressure is reached very close to the geometric focus (25.21 mm versus 25.4 mm for the geometric  
936 focus) for this configuration. The FWHM of the focal spot is 0.276 mm.

937





938

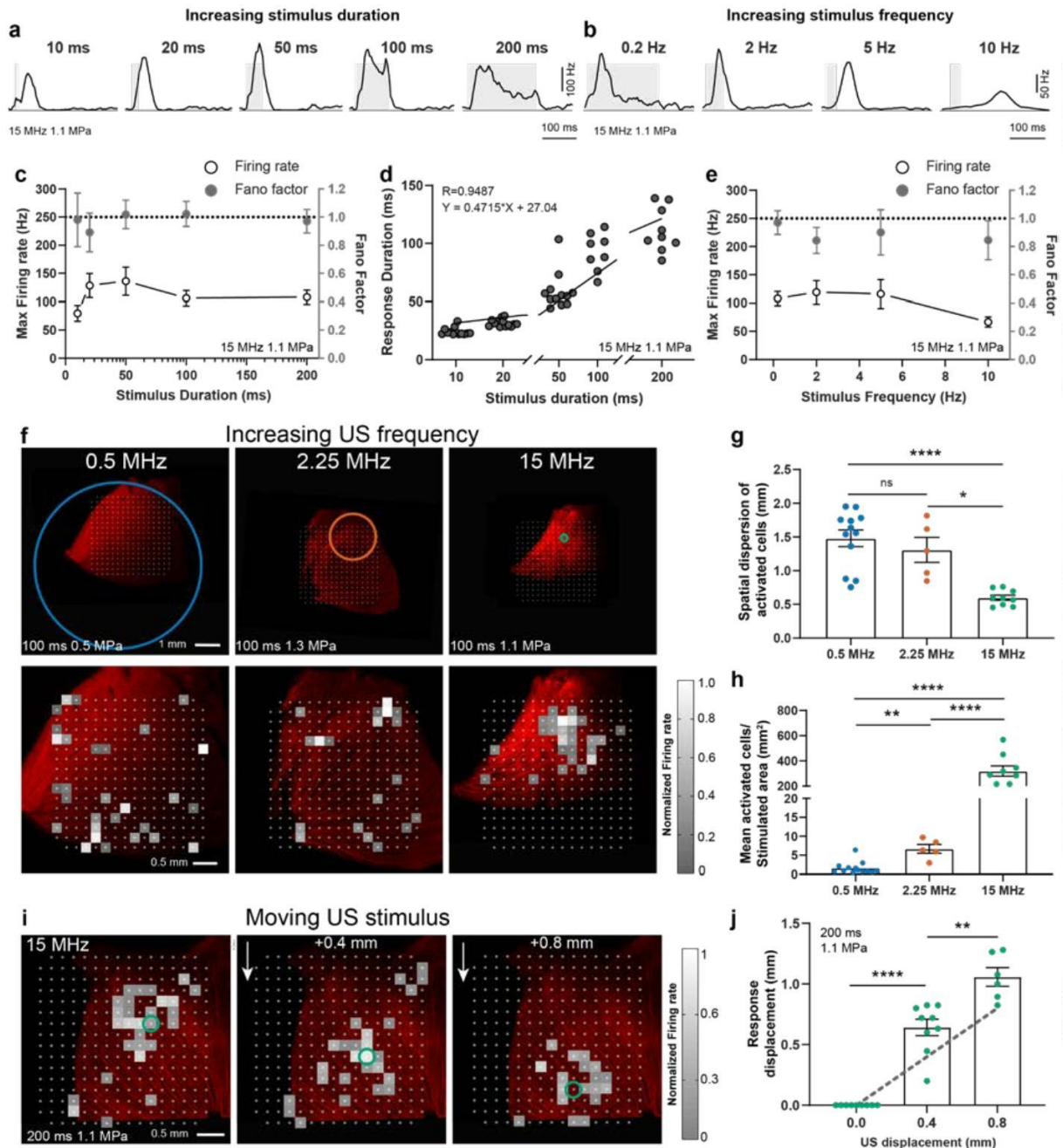
939

940 **Fig. 2 Sonogenetic therapy in retinal ganglion cells.** (a) Retinal fundus image showing MscL-tdTomato  
 941 expression in the *in vivo* rat retina. (b) Representative confocal stack projection across the RGC layer  
 942 of a flat-mounted retina expressing MscL-tdTomato (red) and labeled with anti-RBPMS antibody  
 943 (green). (c) Magnification of a few RGCs expressing MscL-tdTomato, showing its expression at the soma  
 944 and axonal levels of the membrane. (d) Density of RBPMS-positive, MscL-positive and double-labeled

945 cells for 5 MscL G22S and 5 MscL WT retinas. (\*,  $p=0.0140$ , SD: 224.5, 123.8 for RBPMS(+); \*,  $p=0.0465$ ,  
946 SD: 164.0, 62.7 for RBPMS(+)/MscL(+);ns, SD: 192.9, 98.0 for MscL(+); for MscL G22s and WT  
947 respectively, unpaired  $t$  test). (e) (Left) Schematic diagram of the experimental setup for focused US  
948 stimulation of the isolated retina on a multielectrode array (MEA). (Right) Retina expressing MscL-  
949 tdTomato on a MEA chip. White dots represent electrodes. (f) Representative peristimulus time  
950 histograms (PSTH) for RGCs, for different stimuli. (Left) PSTH of three RGCs expressing MscL, showing  
951 a short latency and a sustained response after the start of a 15 MHz US stimulus (1.27 MPa). (Middle)  
952 Corresponding PSTH of the same RGCs in response to a visual stimulus, showing typical ON, ON-OFF  
953 and OFF responses. (Right) PSTH of two RGCs from a non-transfected (NT) retina in response to a 15  
954 MHz US stimulus (1.27 MPa), showing a response to the start and end of the stimulus. (g) RGC latencies  
955 in response to a 15 MHz US stimulus for MscL ( $n=300$  cells, 9 retinas) and NT ( $n=41$  cells, 4 retinas)  
956 retinas at 1.1MPa. The dotted line represents the 45 ms threshold that divides cells into short latencies  
957 (SL: black dots) and long latencies (LL: white dots) cells. (h) Mean number of cells per retina responding  
958 to 15 MHz US stimuli (0.98-1.27 MPa) for MscL ( $n=9$ , SD: 9.5, 13.5 for SL and LL respectively) and NT  
959 ( $n=4$ , SD: 1.2, 3.8 for SL and LL respectively) retinas and for LL and SL cells (\*,  $p=.0002$ , unpaired  $t$  test).  
960 (i) Mean number of SL-responding RGCs per retina following stimulation with US stimuli of increasing  
961 pressure for MscL ( $n=9$ ) and NT ( $n=4$ ) retinas. \*\*\*,  $p=.00008$ , \*\*\*,  $p=0.0010$ , \*\*\*,  $p=0.0008$ , multiple  
962 unpaired  $t$  test. (SD: 0, 0.3, 4.1, 8.1, 10.4, 8.5, 8.3 for MscL; 0,0,0,0.5, 0.9, 1.4 for NT at increasing  
963 pressure levels) (j) Mean maximum firing rate (SD: 36.5, 19.1 Hz for SL and LL respectively) and mean  
964 response duration (SD: 22.1, 27.0 ms for SL and LL respectively) of SL and LL RGCs from MscL retinas in  
965 response to 15 MHz stimuli of increasing pressure (0.2-1.27 MPa) ( $n=9$ , \*\*,  $p=0.0017$ , \*,  $p=0.0418$ ,  
966 unpaired  $t$  test). (k) Percentage of SL RGC cells (normalized against the maximum number of responsive  
967 cells in the experiment) responding to US stimuli of increasing pressure for MscL WT ( $n=3$ , SD: 0, 0, 6,  
968 7, 27, 8, 16 % for increasing pressure values) and MscL G22S ( $n=6$ , SD: 0, 3, 13, 11, 8, 10, 12 % for  
969 increasing pressure values) retinas. \*\*,  $p=0.0065$ , \*\*,  $p=0.0083$ , multiple unpaired  $t$  test. (l) Percentage  
970 of RGCs responding to US stimulation, for retinas in normal conditions ( $n=9$  retinas for MscL and 4 for  
971 NT, SD: 25 and 12 % respectively), and following the application of a cocktail of synaptic blockers  
972 (CNQX-CPP-LAP4) ( $n=3$  retinas each for MscL and NT, SD: 10 and 0 % respectively), and for P23H retinas  
973 with ( $n=3$  retinas) and without ( $n=3$  retinas) MscL expression (SD: 4 and 0 % respectively). The ratio of  
974 SL to LL is shown for each set of conditions.

975

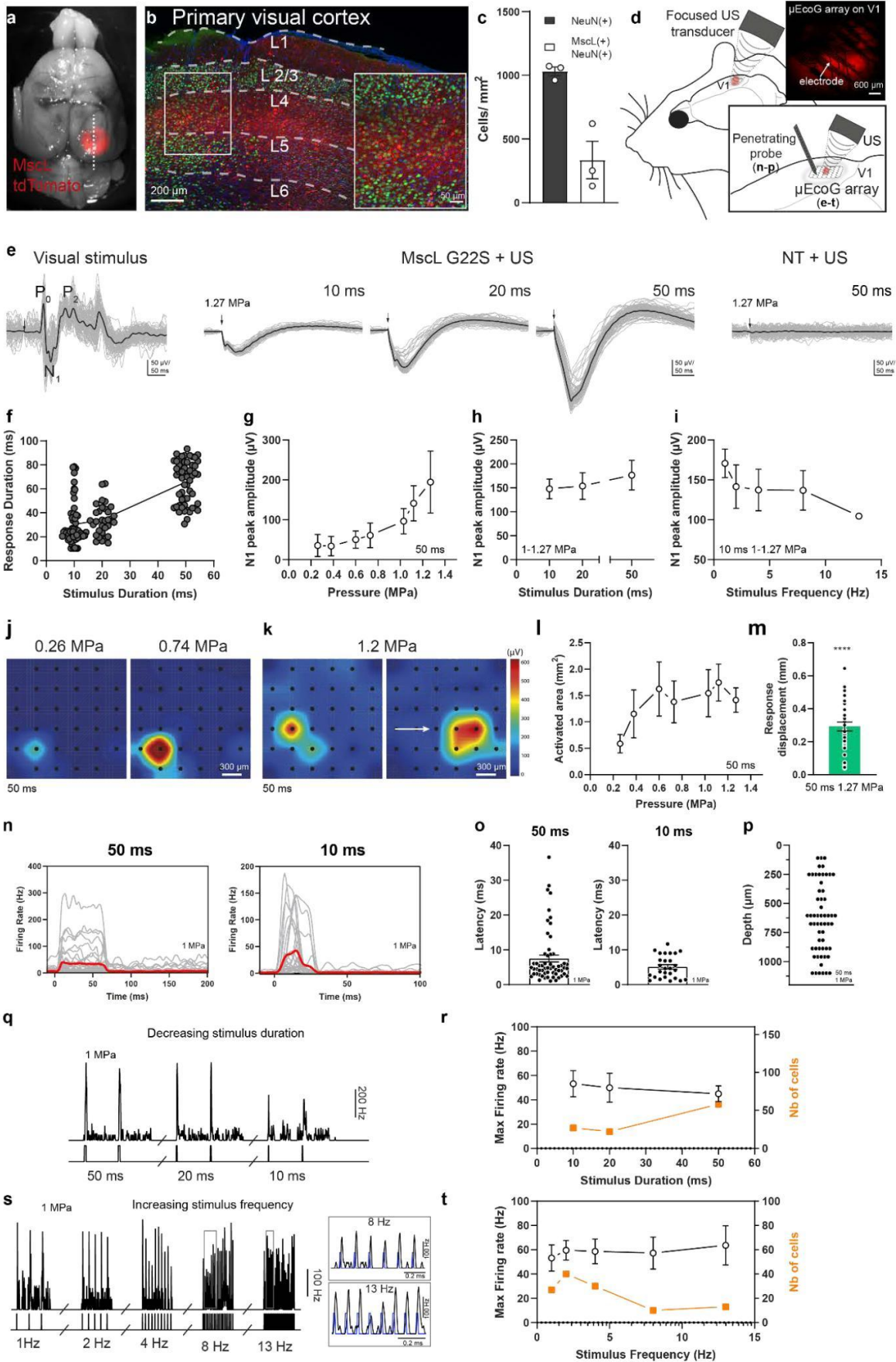




977

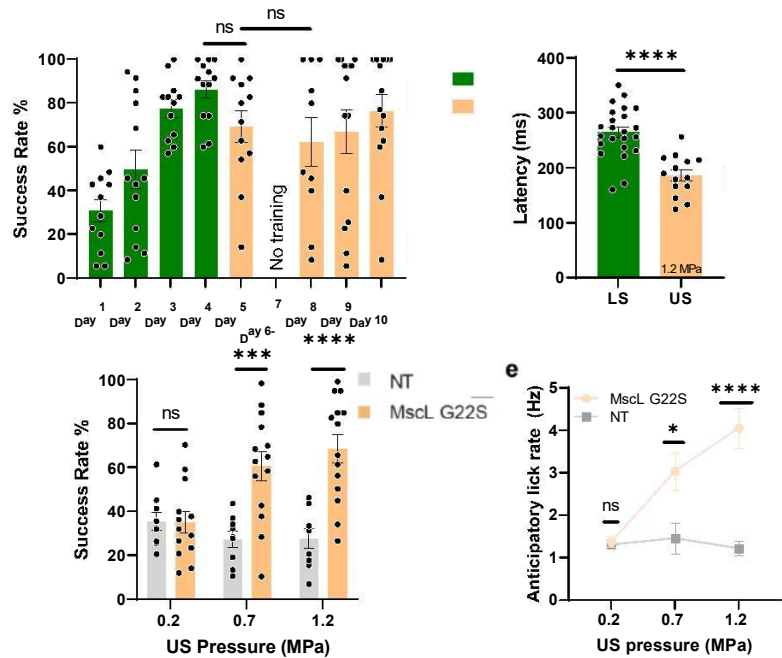
978 **Fig. 3 Spatiotemporal properties of sonogenetic retinal responses.** (a-b) Spike density functions of  
 979 two representative RGCs from a *MscL*-expressing retina for various 15 MHz stimulus durations (a, 0.5  
 980 Hz stimulus repetition rate) and stimulus repetition frequencies (b, stimulus durations: 10, 20, 50, 200  
 981 ms) . (c) Mean maximum firing rates (SD: 39.4, 60.0, 74.5, 40.6, 37.5 Hz) for different 15 MHz stimulus  
 982 durations and mean Fano factor values (SD: 0.54, 0.39, 0.30, 0.26, 0.25) for all cells ( $n=9$  retinas, except  
 983 for stimulus durations of 10 and 20 ms  $n=8$ ). (d) Correlation between response duration and stimulus  
 984 duration, confirmed by the linear regression line ( $n=9$  retinas). (e) Mean maximum firing rates (SD:  
 985 37.5, 62.2, 72.4, 25.4 Hz) for different stimulus repetition frequencies and mean Fano factor values  
 986 (SD: 0.25, 0.28, 0.45, 0.39) for all cells ( $n=9$  retinas, except for stimulus frequencies of 5 and 10 Hz  $n=8$ ).

987 (f) (Top) Retinas on a MEA chip and corresponding size of the incident US pressure beam (circles  
988 represent the FWHM and are centered on the estimated center of response), for 0.5, 2.25 and 15 MHz.  
989 (Bottom) Corresponding activation maps following US stimulation. Each square box represents an  
990 electrode with at least one US-activated cell. Color map representing the normalized firing rates of the  
991 cells. (g) Spatial dispersion of activated cells calculated as the mean Euclidean distance between  
992 activated cells weighted according to maximum firing rate (SD: 0.42, 0.41, 0.11 mm for 0.5, 2.25 and  
993 15 MHz respectively) and (h) ratio of the number of activated cells to the area stimulated on the MEA  
994 chip for the three US frequencies (SD: 1.66, 2.58, 123.2 mm<sup>2</sup> for 0.5, 2.25 and 15 MHz respectively).  
995 \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ , \*\*,  $p = 0.0008$ , \*,  $p = 0.0169$ , unpaired  $t$  test.  $n = 12$  retinas for 0.5 MHz (0.29-0.68 MPa),  
996  $n = 5$  retinas for 2.25 MHz (1.11-1.62 MPa),  $n = 9$  retinas for 15 MHz (1.12-1.27 MPa). (i) Heatmaps  
997 showing the activated cells of a *MscL*-transfected retina following a relative displacement (0, +0.4 and  
998 +0.8 mm) of the 15 MHz US transducer. Each colored box represents an activated cell; the color map  
999 shows the maximum firing rate. Circles represent the estimated center of the response. (j) Relative  
1000 displacement of the center of the response following displacement of the 15 MHz US transducer. \*\*\*\*,  
1001  $p < 0.0001$ , \*\*,  $p = 0.0018$ , unpaired  $t$  test.  $n = 9, 9$ , and 6 positions for 4, 4 and 2 retinas for displacements  
1002 of  $0, 0.4 \pm 0.20$  and  $0.8 \pm 0.18$  mm (SD), respectively. The dotted gray line represents the theoretical  
1003 displacement.



1005 **Fig. 4 *In vivo* sonogenetic therapy in V1 cortical neurons.** (a) Image of a rat brain expressing MscL-  
1006 G22S-tdTomato (red) in V1. The dotted line illustrates the location of a sagittal slice. (b) Representative  
1007 confocal stack projection of a sagittal brain slice expressing MscL G22s-tdTomato (red) and labeled  
1008 with anti-NeuN antibody (green) and DAPI (blue). The layers of V1 are delineated by dashed white  
1009 lines. (Lower right) Magnification of layer 4 of V1. (c) Density of NeuN-positive, MscL-positive and  
1010 double-labeled cells for 3 brain slices (SD: 60.4, 254.4 cells/mm<sup>2</sup> for NeuN(+) and MscL (+)  
1011 respectively). (d) Schematic diagram of the setup used for *in vivo* electrophysiological recordings and  
1012 US stimulation; (Top right)  $\mu$ EcoG electrode array placed on V1 of a *MscL*-transfected rat. (e) (Left)  
1013 Representative visual-evoked cortical potentials in response to a 100 ms flash. (Middle) Representative  
1014 sonogenetic evoked potentials for 15 MHz US stimuli of various durations. (Right) Representative  
1015 responses of a non-transfected (NT) rat to a 15 MHz US stimulus. Black traces represent the mean  
1016 evoked potential over 100 trials. Each gray trace represents one trial. The black arrow indicates the  
1017 start of the stimulus. (f) Duration of sonogenetic  $\mu$ EcoG responses for stimuli of different durations (10  
1018 ms  $n=58$ , 20 ms  $n=32$  and, 50 ms  $n=56$  trials on 6 animals). (g) N1 peak amplitude for increasing US  
1019 pressure (SD: 62.1, 53.9, 42.9, 69.4, 85.0, 116.2, 173.7  $\mu$ V), (h) increasing duration (SD: 50.6, 68.3, 75.9  
1020  $\mu$ V) and (i) frequency (SD: 43.6, 66.9, 63.8, 60.6, 66.4  $\mu$ V;  $n=6$  rats). (j) Pseudocolor activation maps for  
1021 stimuli of increasing US pressure and (k) for a horizontal displacement of the US transducer by 0.8 mm  
1022 (the arrow indicates the direction of the displacement). Each black dot represents an electrode of the  
1023 electrode array. The color bar represents N1 peak amplitude in  $\mu$ V. (l) Area activated for various US  
1024 pressure values (SD: 0.4, 1.1, 1.1, 0.8, 1.1, 0.9, 0.5 mm<sup>2</sup>;  $n=6$  animals). (m) Displacement of the  
1025 activation center relative to the previous position following movement of the US transducer by 0.4  
1026 mm.  $p<0.0001$ , one-sample  $t$  test,  $n=37$  positions on 6 animals (Mean:  $0.29 \pm 0.16$  mm, SD). (n) Spike  
1027 density functions (SDF) of 58 and 27 neurons following US stimulation for 50 and 10 ms, respectively,  
1028 for MscL rats. (o) Response latencies following 50 and 10 ms US stimuli (50 ms  $n=58$  cells, mean:  $7.5 \pm$   
1029  $7.6$  ms (SD), 7 rats; 10 ms,  $n=27$  cells, mean:  $5.1 \pm 3.2$  ms (SD), 5 rats). (p) Depth of US-responding cells  
1030 ( $n=58$ ) in *MscL*-expressing rats ( $n=7$ ). (q) Instantaneous SDF of responses to US stimuli of different  
1031 durations (1 Hz stimulus repetition frequency). (r) Maximum firing rates and numbers of activated  
1032 neurons upon US stimulations of different durations (US pressure: 1 MPa). (s) Instantaneous SDF of  
1033 responses to US stimuli of different repetition frequencies (10 ms stimulus duration). (t) Maximum  
1034 firing rate and number of activated neurons upon US stimulation at different stimulus repetition  
1035 frequencies (10 ms, 1MPa, SD: 55.8, 50.8, 55.7, 41.5, 58.2 Hz).

1036  
1037



1038  
1039

**Fig. 5 Behavioural response induced by sonogenetic activation of the V1 cortex in mice following**

1040

**associative visual training.** (a) Schematic diagram of the behavioral task performed by mice. Water-

1041

restricted animals trained in an associative learning paradigm for light stimulation with a water reward

1042

are subjected to either a visual stimulation (day 1-4) or a US stimulation of V1 at 15 MHz (day 5 and 8-

1043

10). A trial is considered successful if the animal performs at least one anticipatory lick within the 500

1044

ms time lag between stimulus onset and water reward. The spontaneous lick rate of the session is

1045

calculated by measuring the lick rate in a 1s time window prior to the Light or US stimulations (b) Mean

1046

rates of successful trials for 4 days of training during learning of the association between light

1047

stimulation (50 ms) and water reward (LS green) followed by the US stimulation (US orange) for MscL-

1048

G22S transfected mice (Between Day 4 LS and Day 5 US : 50 ms 1.2 MPa, ns,  $p=0.0570$ , unpaired  $t$  test.

1049

Between Day 5 US and Day 8 US : 50 ms 1.2 MPa, ns,  $p=0.6079$ . SD: 17.9, 31.2, 13.9, 14.1, 25.4, 35.4,

1050

37.1, 27.7%) (c) Time to first lick after light (50 ms) and US stimulation (50 ms, 1.2 MPa) (\*\*\*\*,  $p<.0001$ ,

1051

unpaired  $t$  test (\*\*\*\*,  $p<0.0001$ , unpaired  $t$  test, SD: 46.5, 37.3 ms for LS and US respectively).

1052

(d) Mean rate of successful trials over 4 days of US stimulation for non-transfected (NT) and MscL-G22S

1053

transfected mice, following 50 ms of US stimulation at increasing US pressure (ns  $p=0.9452$ , \*\*\*

1054

$p=0.0003$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ , unpaired  $t$  test, for 0.2, 0.7 and 1.2 MPa, respectively, SD: 17.5, 24.4, 23.6%

1055

for MscL G22s; 12.4, 11.0, 13.2% for NT).

1056

(e) Session anticipatory lick rates for NT and MscL-G22S transfected mice at increasing US pressures (ns,  $p=0.6934$ , \*

1057

$p=0.0119$ , \*\*\*\*,  $p<0.0001$ , unpaired  $t$  test, for 0.2, 0.7 and 1.2 MPa, respectively, SD: 0.4, 1.7, 1.8 Hz for MscL G22S and 0.3, 1.1, 0.5 Hz for

1058

NT).



1059 Extended data figures:

1060



1061

1062 **Fig. E1 Retinal expression of MscL.** (a) Whole-mount retina expressing MscL WT (red) and labeled with

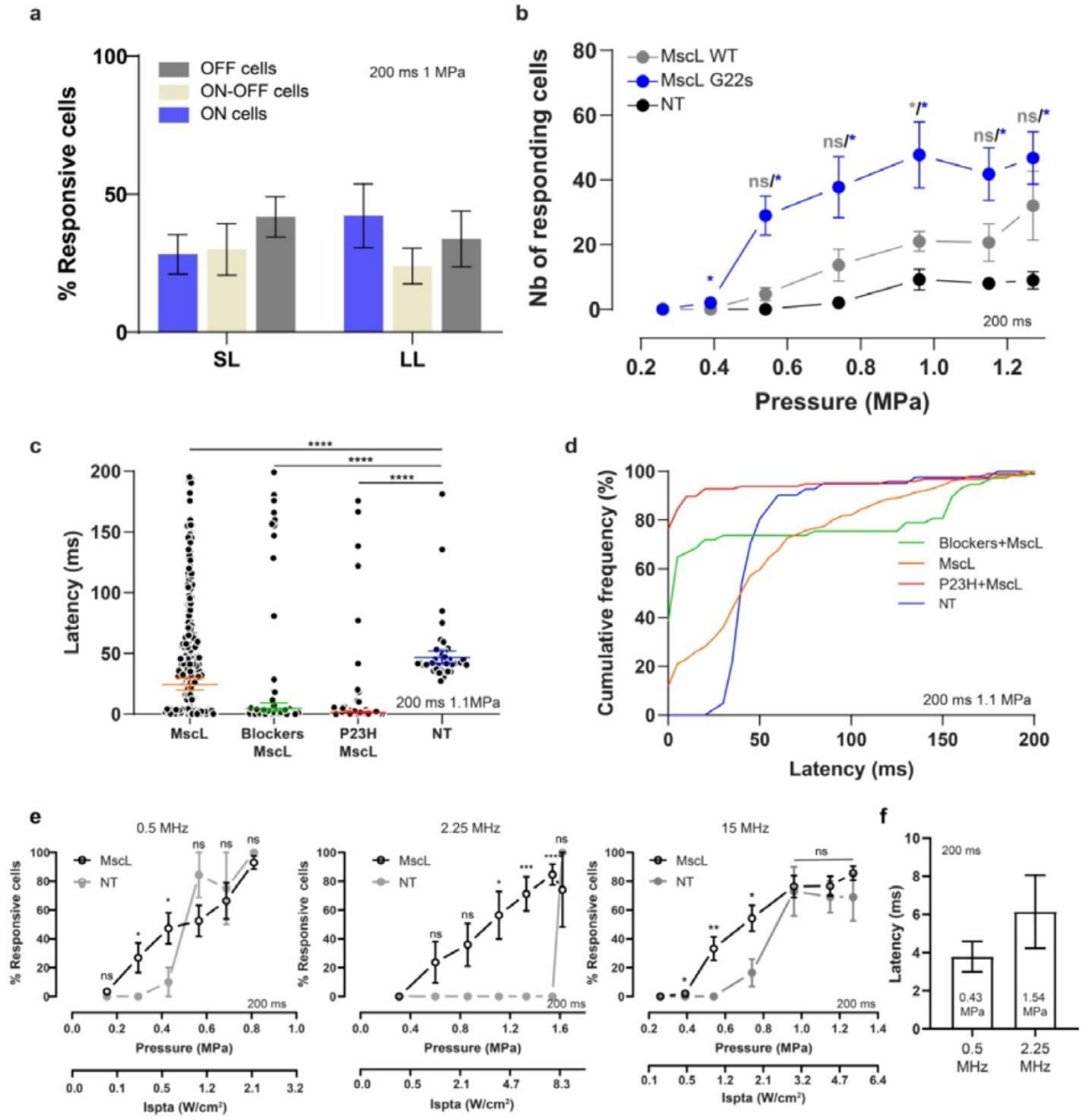
1063 the RGC-specific anti-RBPMS antibody (green), with DAPI staining of the nucleus (white). Yellow boxes

1064 represent the 8 zones selected for the counting of MscL- and RBPMS-positive cells. (b) Optical section

1065 of a confocal stack showing MscL expression limited to the ganglion cell layer. The scale bars represent  
1066 1 mm in (a), 50  $\mu\text{m}$  in (b).

1067

1068  
1069



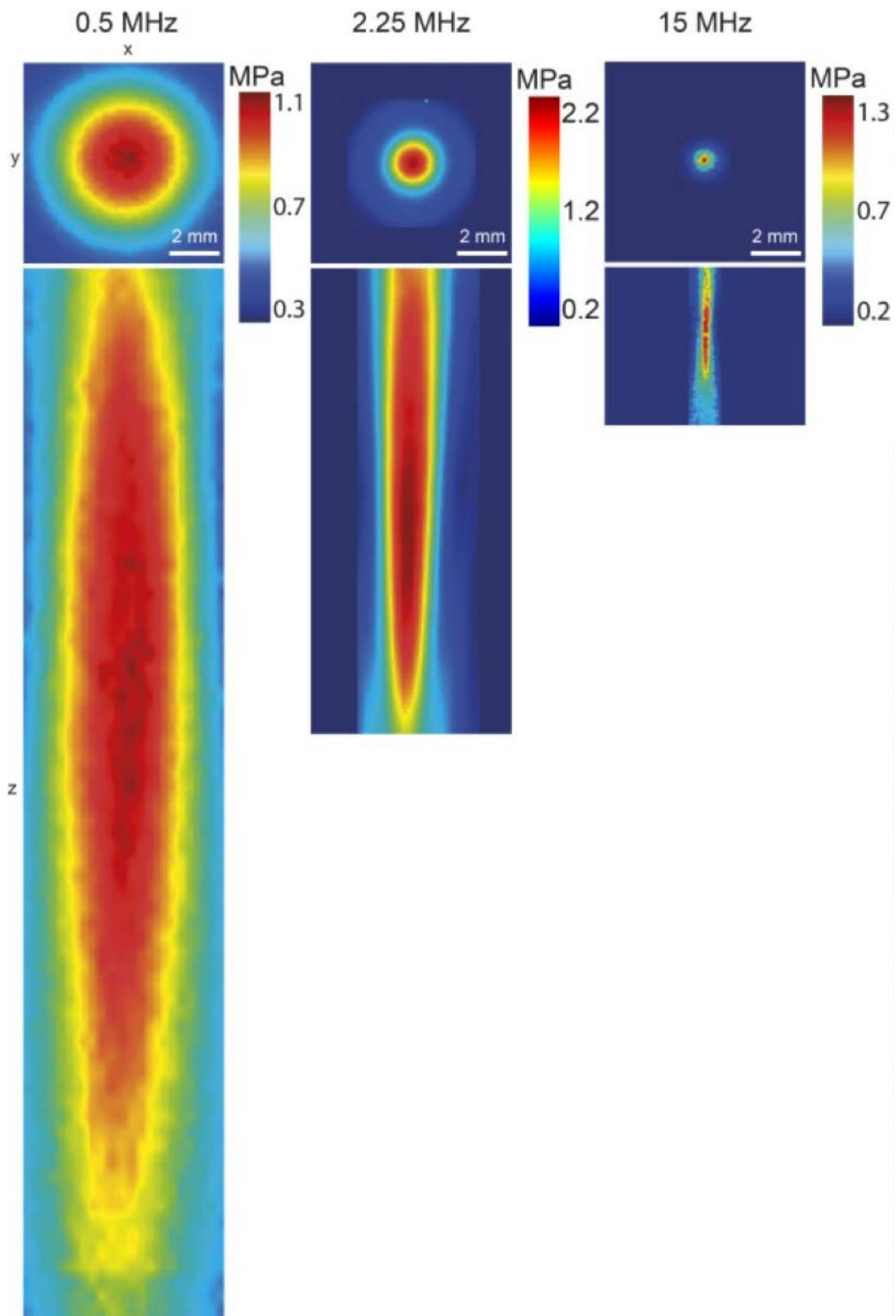
1070  
1071



1072  
1073 **Fig.E2 Retinal sonogenetic response characteristics for US stimuli of different frequencies.** (a)  
1074 Distribution of the different RGC cell types (ON, OFF, ON-OFF) among short (SL) and long latency (LL)  
1075 responses in retinas ( $n=9$ ) expressing MscL (WT and G22s form) following a 15 MHz US stimulus (SD:  
1076 21.6, 28.0, 21.8 % for SL, 34.7, 19.4, 30.3 % for LL cells, for ON, ON-OFF and OFF cells respectively). (b)  
1077 Numbers of RGCs responding to a 15 MHz stimulus of increasing acoustic pressure for MscL WT ( $n=3$ ),  
1078 MscL G22s ( $n=5$ ) and NT ( $n=4$ ) retinas (0.39 MPa: \*  $p=0.0163$ ; 0.54 MPa: ns  $p=0.1480$ , \*  $p=0.0168$ ; 0.74  
1079 MPa: ns  $p=0.1334$ , \*  $p=0.0312$ ; 0.96 MPa: \*  $p=0.0462$ , \*  $p=0.0279$ ; 1.15 MPa: ns  $p=0.1617$ , \*  $p=0.0145$ ;  
1080 1.27 MPa: ns  $p=0.1580$ , \*  $p=0.0144$ ; unpaired  $t$  test between MscL WT and NT in gray and MscL-G22s  
1081 and NT in blue, SD: 0, 0, 3.5, 8.5, 5.2, 10.1, 18.5 cells for MscL WT, 0, 0.8, 11.9, 18.8, 20.5, 18.3, 16.2  
1082 cells for MscL G22s, 0, 0, 0, 2.4, 6.3, 0.8, 4.5 cells for NT). (c) Scatter plots and geometric means of RGC  
1083 latencies in response to a 15 MHz US stimulus for MscL ( $n=300$  cells SD: 48.8), Blockers+MscL ( $n=57$   
1084 cells, SD: 68.0), P23H+MscL ( $n=97$  cells, SD: 37.5), and NT ( $n=41$  cells, SD: 27.4) retinas (\*\*\*\*,  $p<.0001$ ,  
1085 unpaired  $t$ -test on log-transformed values). (d) Cumulative frequency distribution of RGC latencies for  
1086 MscL, Blockers+MscL, P23H+MscL, and NT retinas. (e) Percentage of cells responding to US stimuli  
1087 (normalized against the maximum number of responsive cells in the experiment) of increasing acoustic  
1088 pressure for 0.5 MHz (ns  $p=0.1661$ ; \*  $p=0.0292$ ; \*  $p=0.0260$ ; ns  $p=0.8628$ ; ns  $p=0.1316$ ; ns  $p=0.7731$ ;  
1089 unpaired  $t$  test, SD: 7.8, 32.8, 34.0, 37.4, 37.7, 12 % for MscL; 0, 0, 22.4, 34.9, 50, 0% for NT), 2.25 MHz  
1090 (ns  $p=0.1474$ ; ns  $p=0.0522$ ; \*  $p=0.0140$ ; \*\*\*  $p=0.0005$ ; \*\*\*\*  $p<0.0001$ ; ns  $p=0.5000$ ; unpaired  $t$  test,  
1091 SD: 0, 37.8, 39.4, 43.6, 33.6, 19.2, 36.6 % for MscL; 0 % for all for 2.25 for NT) and 15 MHz US (\*  
1092  $p=0.0382$ ; \*\*  $p=0.0065$ ; \*  $p=0.0218$ ; ns  $p=0.8628$ ; ns  $p=0.5859$ ; ns  $p=0.4223$ ; unpaired  $t$  test, SD: 0, 2.0,  
1093 21.6, 23.8, 20.1, 19.3, 13.2 % for MscL; 0, 0, 0, 19.2, 34.1, 22.1, 28.5 % for NT) US. The lower x axis  
1094 represents the corresponding acoustic intensity ( $I_{spta}$ ). (f) Mean response latencies of SL cells for 0.5  
1095 and 2.25 MHz ( $n=9$  and 8 retinas, SD: 2.4, 5.4 ms for 0.5 MHz and 2.25 MHz respectively).

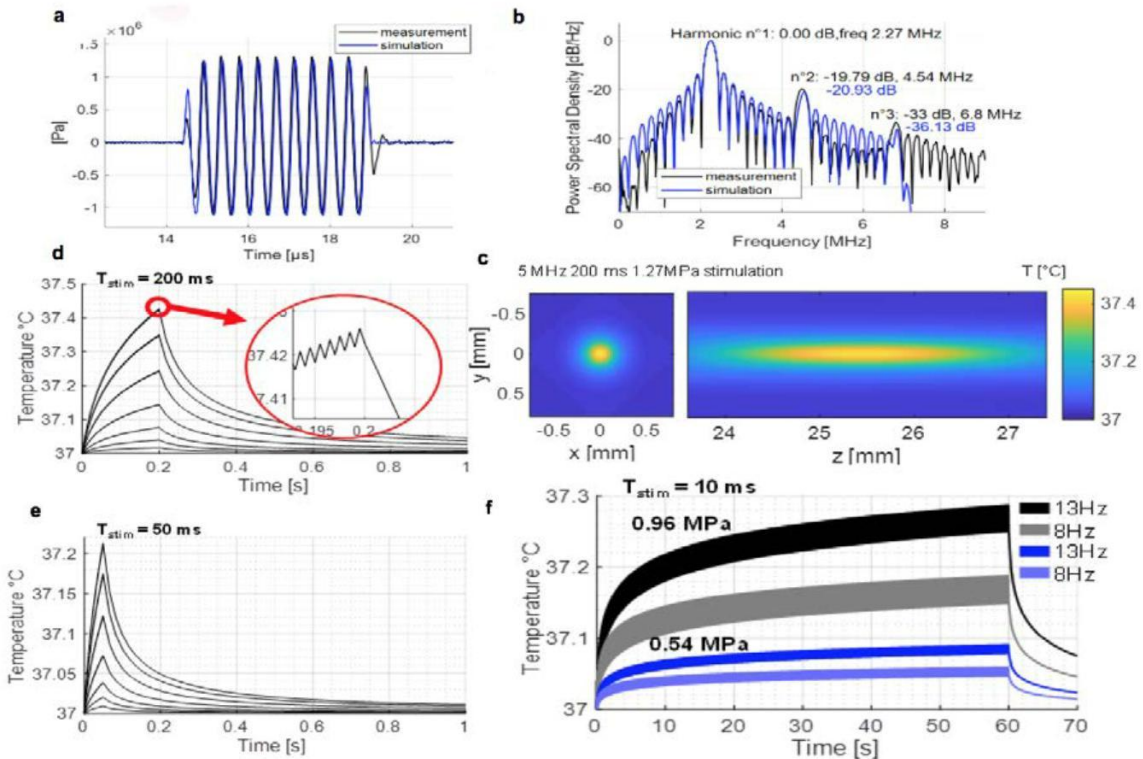
1096

1097

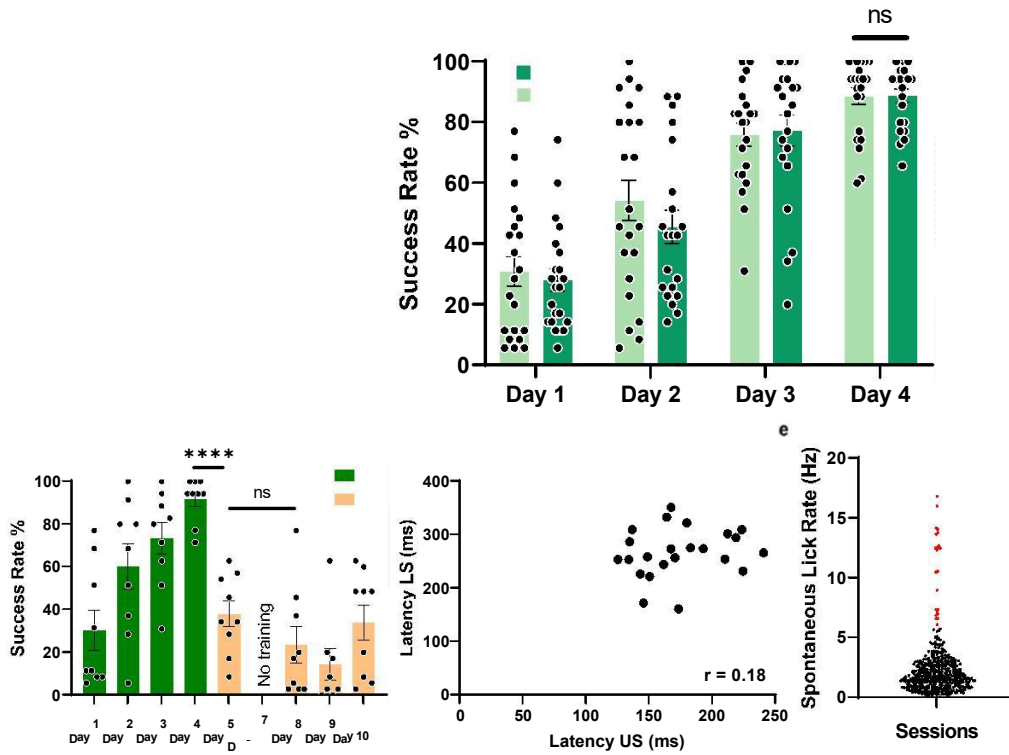


1098

1099 **Fig. E3 Experimentally measured US pressure fields.** US pressure fields near the focus for 0.5, 2.25  
1100 and 15 MHz focused transducers, measured in water. Color-coded pressure maps in the *xy* and *xz*  
1101 planes, for 0.5, 2.25 and 15 MHz.  
1102



1104 **Fig. E4 Simulated acoustic fields and temperature increases.** (a) Comparison between a water tank  
 1105 measurement at the focus with a calibrated hydrophone (black) obtained with the 2.25 MHz  
 1106 transducer and reaching -1.11 MPa peak negative pressure, and a simulated waveform at the focus  
 1107 (blue) reaching the same negative pressure. The two waveforms match very well (0.42% error)  
 1108 ensuring a good match between our simulation setup and physical parameters. (b) Power spectral  
 1109 density of the measured (black) and simulated (blue) waveforms, showing that simulations can be used  
 1110 to estimate the importance of non-linear propagation. A second harmonic 20 dB below the  
 1111 fundamental indicates a factor of 100 in terms of energy, meaning that absorption can be calculated  
 1112 in a linear approximation. (c-f) Thermal simulations are performed in a two-fold process corresponding  
 1113 to a worst-case scenario (see methods): propagation in a water medium, and thermal absorption in a  
 1114 brain-mimicking medium. (h) 3D temperature map at the end of a 200 ms stimulation (at 15 MHz and  
 1115 1.27 MPa). (d) Temperature rise at the focus for a 15 MHz 200 ms stimulation with the 7 pressures  
 1116 used in Fig. 1I (0.26, 0.39, 0.54, 0.74, 0.96, 1.15, 1.27 MPa). A zoom on the increasing curve reveals the  
 1117 fluctuations due to the 1 kHz on-off cycles. (e) Temperature rise at the focus for a 15 MHz 50 ms  
 1118 stimulation with the same 7 pressures. (f) Temperature rise at the focus for 15 MHz 10ms stimulations  
 1119 (1 kHz modulation) at a repetition rate of 8 Hz and 13 Hz (used in figure 3o), for focus pressures of 0.96  
 1120 MPa and 0.54 MPa.



1125 **Fig. E5: MscL G22S expression with the US and light-associative training in mice.** (a) Representative  
 1126 confocal stack projection of a sagittal brain slice expressing MscL G22s-tdTomato (red) and labeled  
 1127 with DAPI (blue). (b) Head-fixed and water-restricted mice were trained for four days to respond to a  
 1128 full-field stimulation of one eye (200 and 50 ms long) that preceded a water reward. Mice respond by  
 1129 licking before (anticipation — successful trial) or after the delivery of water. The success rate increased  
 1130 progressively and mice had learnt the task (upon 50 ms and 200 ms light stimulation) after four days  
 1131 of training (ns  $p=0.9387$ , SD: 17.4, 24.8, 23.6, 10.4% for 200ms, 22.2, 31.0, 17.5, 12.8% for 50ms). (c)  
 1132 Mean rates of successful trials in non-transfected (NT) mice for 4 days of training with light stimulation  
 1133 (50 ms, LS green) and for 4 days of US stimulation (US orange) (Between Day 4 LS and Day 5 US : 50 ms  
 1134 1.2 MPa, \*\*\*\*  $p<0.0001$ , unpaired  $t$  test. Between Day 5 US and Day 8 US : 50 ms 1.2 MPa, ns  $p=0.1850$ .  
 1135 SD: 28.2, 31.6, 22.1, 10.3, 18.5, 25.5, 21.1, 24.4 %). (d) Pearson correlation scatter plot for time to first  
 1136 lick after either light (LS) or US stimulation. (e) Identification and exclusion of outlier sessions (in red)  
 1137 based on the ROUT method, (Q = 1%) for the session spontaneous lick rate measured on a 1s time  
 1138 window prior to all trials of the session e  $Q_1 = 0.9$  Hz, Median = 1.7 Hz,  $Q_3 = 2.8$  Hz, Mean = 2.3 Hz, SD =  
 1139 2.3 Hz.

## 2.3. Chapitre 3 : co-variations du CBV et de la décharge de potentiels d'action de neurones isolés chez le primate non-humain

### 2.3.1. Résumé

Dans la perspective d'évaluer les thérapies optogénétique et/ou sonogénétique sur le cortex visuel du primate non-humain, nous avons amorcé la caractérisation des aires visuelles sous la chambre d'enregistrement physiologique de primates. Cette caractérisation était menée en parallèle par imagerie fonctionnelle ultrasonore et par électrophysiologie par électrodes pénétrantes. Cette double caractérisation nous a amené à poser la question du corrélat fonctionnel entre ces deux technologies. Dans ce chapitre, nous avons donc cherché à identifier la contribution de la décharge de neurones isolés (activités unitaires) au sein de la réponse neurovasculaire chez le primate non-humain. Préalablement, cette relation avait principalement été étudiée au cours d'expériences combinant IRM fonctionnelle et enregistrements électrophysiologiques. Cependant, ces publications ont produit une disparité de résultats qui ne permettent pas encore d'identifier précisément le lien entre ces deux signaux. Il peut être intéressant de combiner les enregistrements électrophysiologiques avec l'imagerie fUS pour trancher ce débat car cette technique possède une résolution spatiale plus élevée que l'IRM fonctionnelle. De plus, peu de résultats existent quant au lien entre activités unitaires et les variations de CBV révélées par l'imagerie fUS. Nous avons donc réalisé des co-enregistrements chez deux animaux au sein des cortex visuel primaire et fronto-médians lors de tâches comportementales (tâche de fixation passive et tâche d'exécution de saccades, respectivement).

Le premier défi auquel nous avons répondu était de développer un adaptateur permettant de réaliser simultanément de l'imagerie fUS et des enregistrements électrophysiologiques de neurones situés dans ou proche du plan d'imagerie chez le primate non-humain. Ce dispositif innovant nous a également permis de visualiser en temps réel la position d'une électrode au sein lors de sa descente dans le cerveau (Figure 1).

Pour quantifier l'activité neurovasculaire globale et l'activité neurovasculaire liée aux activités unitaires, nous avons mis en place des analyses de modèles linéaires généralisés (GLM) des données fUS. Les résultats montrent que la composante de la réponse neurovasculaire due aux activités unitaires est inférieure à  $1 \text{ mm}^3$  ce qui est plus localisée que l'activité neurovasculaire globale (Figures 2-3). Cette conclusion expliquerait

l'impossibilité de faire la corrélation à l'IRM fonctionnelle puisqu'elle se situerait en-dessous de sa résolution spatiale. De plus, nos résultats montrent également que les activités unitaires et les variations de CBV ne sont statistiquement pas corrélées pendant les périodes d'activité spontanées mais le deviennent lors des tâches comportementales (Figure 4, c et f). Inversement, pendant l'activité spontanée, les activités CBV dans les zones cérébrales connectées sont corrélées mais cette corrélation diminue lors des tâches (Figure 4, d et g). En conclusion, ces résultats sur l'interprétation des données neurovasculaires jettent une nouvelle lumière pour leur analyse et la compréhension du fonctionnement du cerveau tant pour l'examen des cerveaux primates et plus précisément humains. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Pierre Pouget à l'Institut du Cerveau ainsi qu'avec l'équipe de Mickaël Tanter à l'Institut Langevin. Ils font l'objet d'une publication en cours de revue au sein de *Cell reports*.

### **2.3.2. Article scientifique.**

1 **Covariations of cerebral blood volume and single neurons discharge during**  
2 **resting state and behavioral visual cognitive tasks in non-human primates**

3

4

5 Julien Claron<sup>1,\*</sup>, Matthieu Provansal<sup>2,\*</sup>, Quentin Salardaine<sup>3</sup>, Pierre Tissier<sup>3</sup>, Alexandre Dizeux<sup>4</sup>,  
6 Thomas Deffieux<sup>4</sup>, Serge Picaud<sup>2</sup>, Mickael Tanter<sup>4</sup> ‡, Fabrice Arcizet<sup>2</sup> ‡ and Pierre Pouget<sup>3</sup> ‡

7

8 1. Stem cell and Brain Research Institute, INSERM U1208, Bron, France

9 2. Institut de la Vision, CNRS, INSERM, Sorbonne Université, Paris, France

10 3. Paris Brain Institute, Institut du Cerveau, INSERM 1127, CNRS 7225 Sorbonne Université, Paris,  
11 France

12 4. Physics for Medicine, ESPCI, INSERM, CNRS, PSL Research University, Paris, France

13

14

15 \* These authors contributed equally to this work

16 ‡ These authors jointly supervised this work

17

18 Short title: Single neurons and CBV in non-human primates



19 **ABSTRACT**

20 To better understand how the brain allows primates to perform various set of tasks, the ability  
21 to simultaneously record the activity of the brain at multiple temporal and spatial scales is  
22 challenging but necessary. In non-human primates, combined fMRI and electrophysiological  
23 recordings have not disentangled the contributions of spiking activity to the neurovascular  
24 response. Here, we combined functional ultrasound imaging (fUS) of cerebral blood volume  
25 (CBV) and recording of single-unit activities (SUA) in visual and fronto-medial cortices of  
26 behaving macaques. We computed task-induced and SUA-induced CBV activation maps. We  
27 demonstrate that SUA provides a significant estimate of the neurovascular response below the  
28 typical fMRI voxel spatial resolution of  $2\text{mm}^3$ . Furthermore, our results also show that single  
29 unit and CBV activities are statistically uncorrelated during the resting states but correlate  
30 during behaving tasks. Conversely, during the resting states, CBV activities across known  
31 connected brain areas are correlated but decorrelate at the onset of the tasks as expected if  
32 participating in the default mode network (DMN). These results have important implications for  
33 interpreting functional imaging findings collected with fMRI or fUS while one constructs  
34 inferences of spiking activities during resting-state or while primates perform tasks.

35

36

37

38

39

40 Awe-inspiring progress was enabled by novel technologies for imaging the entire brain  
41 at microscopic scale and a very high temporal resolution to study neural functions in flies, fishes  
42 or even rodents<sup>1-3</sup>. In large animals, the pioneering studies from Logothetis and colleagues  
43 showed that the impulse response of the neurovascular system correlates better with LFPs  
44 compared to multi-unit activity, suggesting that the BOLD signal predominantly reflects the  
45 input and intra-areal processing<sup>4</sup>. Similarly, other studies found that BOLD fluctuations loosely  
46 relate to action potential frequencies but are rather coupled to LFP oscillations in cats<sup>5,6</sup> and in  
47 non-human primates<sup>7,8</sup>. However, other studies have shown that the BOLD signal provided a  
48 reliable measure of firing rates in cats<sup>9</sup>, non-human primates<sup>10,11</sup> and humans<sup>12</sup>. For example, a  
49 recent study showed that BOLD-derived population receptive fields (pRF) were more like pRFs  
50 based on multi-unit activity compared to LFPs<sup>13</sup>. Others demonstrated that visual stimuli-  
51 induced early variations of oxygen are reliable estimates of spiking activity. Moreover,  
52 hemodynamic activity is also dependent on other non-neural fluctuations<sup>14</sup>. Finally, optogenetic  
53 driving of neuronal activity generates BOLD signals that correlate with firing rate in rodents<sup>15,16</sup>.  
54 This disparity of results can be resolved using an imaging technique with higher spatial  
55 resolution than fMRI to investigate the contribution of single unit spiking to the neurovascular  
56 system.

57 Functional ultrasound imaging (fUS) is an innovative imaging technique which can  
58 provide whole-brain maps of neurovascular activity changes<sup>17</sup> even in deeper regions (up to 1.5  
59 cm) with an approximately 5 to 10-fold better spatiotemporal resolution and sensitivity than  
60 fMRI (100  $\mu$ m, 1Hz, even if uniplanar fMRI sequences allow the same temporal resolution, the  
61 spatial resolution is unachieved with typical fMRI sequences). Like fMRI, fUS technique relies on  
62 the neurovascular coupling of brain activity but unlike BOLD signals, fUS measures changes in  
63 the Cerebral Blood Volume (CBV) within microvessels using ultrafast doppler<sup>18</sup> combined with  
64 spatiotemporal clutter filtering<sup>19</sup>. fUS technique requires no large magnetic machinery and so  
65 has been applied in freely moving small animals using miniature, head-mountable  
66 transducers<sup>20</sup>. Several studies used fUS to investigate sensory processing in rodents<sup>21-25</sup> and in  
67 behaving primates<sup>26-28</sup>. Besides, an increasing number of studies have demonstrated that fUS  
68 can monitor brain activity in humans during surgeries<sup>29</sup>, but also through the skull bone in  
69 neonates<sup>25,30,31</sup>, or even adult patients<sup>32</sup>. Further knowledge of the contribution of neuronal  
70 activity to the CBV variations in humans and close species is therefore important for future  
71 interpretations of such basic and preclinical studies. To our knowledge, fUS and recording of  
72 nearby spiking activity has been achieved in rodents only<sup>33,34</sup>. However, the rodent model does  
73 not allow complex behavioral studies and brain architecture is quite far from that of humans,  
74 and therefore, NHP model might allow to transpose the ins and outs more easily to the human  
75 brain. One recent publication concomitantly performed neural activity recordings and fUS for  
76 the first time in mice<sup>35</sup>. Their results show that CBV variations match the smoothed firing rates

77 of nearby neurons, especially inhibitory, in the visual cortex and the hippocampus. A direct  
78 comparison between fUS imaging signals and spiking activity has not been achieved in behaving  
79 primates. Furthermore, such comparison permits to characterize a bit more the nature of  
80 resting state in primates, which has been extensively studied in humans<sup>36,37</sup> but rarely to a  
81 coupled neuronal/vascular point of view. Consequently, new protocols are needed to achieve  
82 simultaneous recordings of CBV and neural spiking in behaving primates. Most fUS studies have  
83 assessed the significance of CBV variations<sup>17,21,27</sup> sometimes in comparison with spiking  
84 activity<sup>33</sup>, using covariate statistical analysis. To go a step further, we implemented from the  
85 fUS signal a Generalized Linear Model methods (GLM) estimate allowing us to separate  
86 stimulus-induced, neural spiking and noise signals. This approach facilitates direct comparison  
87 of our results with those from fMRI studies.

88 Using a new protocol including ultrafast and high-resolution ultrasound imaging techniques  
89 (fUS) combined with commonly used electrophysiological systems in awake non-human  
90 primates. We recorded both fUS and single unit activities in visual cortex and SEF for Monkey L  
91 and Monkey S respectively while animals performed passive fixation and saccade tasks. We  
92 chose to focus on two different cortical areas to generalize the relationship between neural  
93 spiking and CBV variations. Our method permits online micro-electrodes position tracking and  
94 the recording of electrophysiological and CBV signals in awake behaving animals. We computed  
95 stimuli-induced and spiking-induced activation maps using a GLM. Our results demonstrate that  
96 individual unit activities provide a significant estimate of the neurovascular system response.

97  
98

99 Our first main result is that we could use our imaging method to perform precise online  
100 tracking and guidance of micro-electrodes. The chambers were located above the  
101 Supplementary Eye Field (SEF) and the visual cortex V1 for Monkeys S and L, respectively (Fig.  
102 1.a and Fig. 1.b). The adaptor was designed and 3D printed to allow the technical challenge of  
103 co-recording nearby spiking signal and CBV variations of the imaging plane. By slowly inserting  
104 the microelectrode into the brain, we detected on the image a precisely localized high rise in  
105 the Power Doppler in the region of interest at  $z=5\text{mm}$  (Fig. 1c), indicating that the tip of the  
106 electrode reached the imaging plane. When we inserted the electrode further, the high-Power  
107 Doppler signal extended vertically downward, allowing us to detect the electrode progression  
108 through the thickness of the imaging plane from  $z=5\text{mm}$  to  $z=12\text{mm}$  (Fig 1.c). Indeed, we  
109 noticed a higher power doppler signal localized at the position of the tip of the electrode (Fig  
110 1.c) characterizing its motion during the insertion. Thus, our method permits precise online  
111 tracking of micro-electrodes in the brain in awake behaving primates.

112

113            Having established a method to place micro-electrodes accurately in or near the fUS  
114 plane, we concomitantly recorded CBV and single unit activity while the animals performed  
115 behavioral tasks. Monkey S performed a visual stimuli-guided pro-saccade or anti-saccade task  
116 with equal proportion for both conditions (Fig 2.a., see Methods). Monkey L performed a  
117 passive fixation task during which a peripheral visual stimulus was presented (Fig. 2.b.). We  
118 used a repertoire of different visual stimuli (see Methods) to generate different activation maps  
119 of the visual cortex. For most sessions, a single stimulus was presented. For others, hemi-  
120 concentric bands of varying eccentricities or squared-shape gratings with varying spatial  
121 frequencies were used (Fig. Supp. 2). For Monkey S, we recorded a total of  $n=18$  fUS imaging  
122 sessions and for Monkey L,  $n=79$  fUS imaging sessions (53 in which we also co-recorded single-  
123 units). For V1, we assessed that there were no significant differences of maxima, minima and  
124 their respective timings between the mean CBV responses of each stimulus type (Kruskal-  
125 Wallis,  $p>0.05$ , Fig S1). Therefore, we generated a single hemodynamic response function (HRF)  
126 by averaging the mean CBV response over sessions and computing the gamma inverse function  
127 that fit best. Hence, we computed the activation map induced by all stimuli presentations  
128 (independently from their nature) using the GLM approach. We did not focus on the spatial  
129 regionalization of the activation among stimuli, but see the works of Blaize and colleagues for  
130 detailed retinotopic maps in the visual cortex<sup>27</sup>. For further analyses about the dynamic of  
131 activation between pro- and anti-saccade, see previous works of Claron and colleagues<sup>38</sup>. In our  
132 model, we took as input the spatiotemporal Doppler images and took a stimuli-induced  
133 regressor (Fig 2.c. and Fig 2.d). Briefly, for each pixel, all visual stimulus presentation timings  
134 were convoluted with the fUS-determined HRF of the investigated cortical area to obtain a CBV  
135 signal prediction. From the fit between these signal predictions and the real CBV variations Z-  
136 score and p-value map were obtained (Fig. 2.e for SEF and Fig 2.g for V1).

137  
138            The activation maps show the Z-score of all pixels in the images with a p-value  $< 0.001$   
139 (after Benjamini-Hochberg correction to decrease false discovery rate). Fig. 2.e shows a  
140 representative activation map induced by the presentation of both pro-saccade and anti-  
141 saccade stimuli for correct trials for Monkey S (see Methods for GLM application). We detected  
142 significant pixels in both hemispheres although the right SEF (dashed green line) displayed more  
143 significant pixels, corresponding to an activated volume around  $2 \text{ mm}^3$ . All sessions were  
144 balanced in terms of ratio pro- v.s. antisaccades and left vs right. Fig. 2f represents the  
145 population analysis of median z-scores and volume of activations in SEF for sessions in which  
146 activation was detected in the region of interest ( $n=11$ ). The mean stimuli-induced volume of  
147 activation in the SEF was  $1.64 \pm 0.54 \text{ mm}^3$ . Figure 2.g shows a representative activation map in  
148 the visual cortex induced by the stimulus presentation for correct trials for Monkey L. We  
149 detected significant pixels in the superficial and deeper layers of the region of interest (V1 and  
150 V2, respectively) corresponding to an activated volume of  $3.7 \text{ mm}^3$ . Fig. 2h represents the

151 population analysis of median z-scores and volume of activations in the visual cortex for  
152 sessions in which activation was detected in the region of interest ( $n=17$ ). The mean stimuli-  
153 induced volume of activation was  $2.5 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ .

154

155 For Monkey S, among  $n=18$  imaging sessions, we recorded  $n=18$  single-units. Among this  
156 pool of 18 neurons, we obtained  $n=11$  single-units displaying significant response locked to the  
157 saccade execution. For Monkey L, among  $n=53$  imaging sessions, we recorded  $n=17$  single-units  
158 displaying significant response locked to the stimulus presentation. We then investigated the  
159 neurovascular response associated with isolated single-unit activities. To visualize the dynamics  
160 of the CBV responses, we plotted the averaged variation of CBV over time for all correct trials  
161 and for all pixels of each region of interest (delimited by dotted lines in Fig. 2). The SEF CBV  
162 variation rose after a dip synchronized with the stimulus presentation ( $t=0\text{s}$ ) and reached a  
163 plateau around 3% 1.8s later, before decreasing back to its initial value after 4s (Fig 3.a., bottom  
164 panel, red curve). Here, during the same example session, we recorded the activity from a  
165 single unit located in the right SEF. The raster plot (Fig. 3.a, top panel) and the spike density  
166 function (Fig 3.a., bottom panel, blue curve) show a transient increase of the firing rate (up to  
167 30 Hz) that corresponds to the saccade execution, followed by a less active period. Note the  
168 different kinetics between the fast neuronal activation and the slower neurovascular response;  
169 the peak of the CBV response occurred 1.6 s after the firing rate peak.

170

171 We next wanted to test whether the spiking activity recorded with the single electrode  
172 at a close location could contribute to the neurovascular response. To do so, we used another  
173 GLM approach based on the spike's activity. Here, we convoluted for each animal the single  
174 unit spike onsets with the HRF extracted from the same region of interest (Fig. 3.c for SEF, Fig  
175 3.d for V1) to obtain a CBV signal prediction. As previously, the representative co-activation  
176 maps show the Z-score of all pixels in the images with a p-value  $< 0.001$  (before Benjamini-  
177 Hochberg procedure to decrease false discovery rate) obtained from the fit between the  
178 predicted signal and the real CBV variations (Fig 3.e). We also represented the task-related  
179 activities displayed in Fig 2.e for comparison (green transparent colored pixels). For Monkey S,  
180 the co-activation map showed a spikes-correlated neurovascular response in the SEF  
181 corresponding to a volume of  $\sim 1.1 \text{ mm}^3$  (Fig 3.g, left panel) compared to  $2 \text{ mm}^3$  with the GLM  
182 based on stimuli. Interestingly, the spread of this co-activation was more localized than the  
183 activation detected with the GLM approach based on the stimulation pattern. Furthermore, the  
184 spread of this correlated activation was constrained around the electrode recording site  
185 (indicated by the dashed white line). We repeated these analyses for the visual cortex that  
186 revealed a different pattern of CBV variation. Indeed, the CBV variation displayed a biphasic  
187 increase up to 1.3% (Fig3.b, bottom panel, red curve). Interestingly and unlike for the SEF  
188 response, we detected a large undershoot in the visual cortex neurovascular response (from 4  
to 8s) before the signal went back to its initial value. The raster plot (Fig.3.b, top panel) and the

189 spike density function (Fig 3.b, bottom panel, blue curve) of simultaneous single unit recording  
190 show a transient increase of the firing rate (up to 11.5Hz). Here, the neuronal activation was  
191 also faster than the neurovascular response with a difference of 2.45 s. We reported consistent  
192 results for Monkey L (Fig 3.g, right panel). As for Monkey S, the spread of the spikes-correlated  
193 activity was smaller ( $\sim 0.6 \text{ mm}^3$ , Fig 3.h) than the activation induced by stimuli onsets but was  
194 not particularly restricted around the electrode recording site. To conclude, these results  
195 demonstrate our method allows examining specific links between single-unit activities and  
196 cerebral blood volume variations in behaving non-human primates.

197 To assess that the single unit-induced activation is more localized than the stimuli -  
198 induced activation, we computed the volumes and median Z-scores of activations for each  
199 condition over our entire pool of data (Fig 2.f and Fig 3.f for SEF, Fig 2.h and Fig 3.h for V1). For  
200 Monkey S, we showed that the mean stimuli-induced volume of activation in the SEF is  
201  $1.64 \pm 0.54 \text{ mm}^3$  whereas the SUA-induced volume of activation is  $0.86 \pm 0.68 \text{ mm}^3$ . (Student T-  
202 test between the stimuli-induced- and the SUA-induced activities gives the former significantly  
203 higher than the latter, with  $p = 0.016$ , T-test is chosen as data are gaussian (Shapiro-Wilk test,  $p$   
204  $= 0.82$  and  $p = 0.58$  respectively) and F-test gives similar variances ( $p = 0.49$ )). Peak Z-score of  
205 GLM-calculated maps was found slightly higher for the stimuli-induced map ( $7.81 \pm 0.47$ ) than  
206 the Z-score for the spikes map ( $6.39 \pm 1.00$ ;  $p = 0.0084$ , Shapiro-Wilk test assures both Z-scores  
207 for stimuli-induced and SUA-induced are gaussian, F-test assures that variances are unequal).  
208 We confirmed these results in the second animal: for Monkey L, the mean stimuli-induced  
209 volume of activation of the visual cortex was significantly higher than the SUA-induced volume  
210 of activation (stimuli-induced:  $2.5 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ ,  $n=17$  acquisitions; SUA:  $0.8 \pm 0.5 \text{ mm}^3$ ,  $n=8$   
211 responsive units,  $p=1.3915 \cdot 10^{-4}$ , two-sample T-test with unequal variances as samples are  
212 gaussian according to Shapiro-Wilk test ( $p = 0.6064$  and  $p = 0.8096$  for stimuli-induced and SUA-  
213 induced, respectively) as illustrated in Fig 3.g for the example session. Interestingly, the median  
214 Z-score of stimuli-induced activation was also significantly higher than the median Z-score of  
215 SUA-induced activation (stimuli-induced:  $5.19 \pm 0.17$ ,  $n=17$  acquisitions; SUA:  $4.58 \pm 0.55 \text{ mm}^3$ ,  
216  $n=8$  responsive units,  $p=0.0024$ , two-sample T-test as samples are gaussian according to  
217 Shapiro-Wilk test ( $p = 0.2882$  and  $p = 0.4771$  for stimuli-induced and SUA-induced, respectively)  
218 and have equal variances according to F-test ( $p = 0.0947$ ). Altogether, these results  
219 demonstrate that single-unit activities partially contribute to the cerebral blood flow variations  
220 in behaving non-human primates.

221 With GLM analyses, we spatially characterized the relationship between neural spiking  
222 and CBV in two different cortical areas during behavioral tasks. One could also ask how both  
223 CBV and neural spiking are temporally linked. We next investigated how neural spiking  
224 contribution to the neurovascular activity changes between resting state (i.e. BL=baseline, 100  
225 to 120s-long period before task onset) and the start of the task. We first represented display



226 examples of CBV variations and SDF over one unique session for SEF and V1, respectively (Fig.  
227 4.a. and Fig. 4.b). We computed the moving non-overlapping cross-correlation across resting  
228 state and task between the fUS signal in the ROI and the SDF of the recorded single-unit. Fig. 4.c  
229 and Fig. 4.d. left graphs represent the mean and s.e.m. of these moving cross-correlations  
230 across sessions for SEF (n=9) and V1 (n=15, two sessions missing initial baseline), respectively.  
231 We quantified the average values of cross-correlation during resting state and task for SEF and  
232 V1, and for two control areas: median cingulate cortex (MCC) for monkey S and a 1x1 mm<sup>2</sup>  
233 squared ROI located at the bottom left corner of fUS images for monkey L (see the locations of  
234 these areas in the maps Fig 4.c. and Fig. 4.d). Interestingly, both in the SEF and in V1, there is no  
235 correlation between SDF and fUS signal during resting state (t-test comparison to null  
236 distribution, SEF :  $p = 0.96$ , V1 :  $p = 0.56$ ) but these signals became correlated in SEF and  
237 anticorrelated in V1, respectively, after the task began (SEF  $r = 0.2 \pm 0.03$  s.e.m,  $p = 2.6e-3$ , V1  
238  $r = -0.06 \pm 0.0096$  s.e.m,  $p = 0.0204$ , t-test). The anticorrelation in V1 might be due to the  
239 undershoot of the HRF in this cortical area. Finally, we computed the correlation between CBV  
240 variations of different areas of the brain, both during resting state and during task in order to  
241 characterize the vascular component of the default mode network and the variation due to the  
242 beginning of a behavioral task. In the median wall of primate brain, we observe a correlation  
243 between SEF and the MCC during resting state (Fig 4.c, right panel,  $r = 0.42 \pm 0.07$  s.e.m.,  $p =$   
244  $3.4e-4$  t-test comparison to null distribution) and a decrease of this correlation between the SEF  
245 and the MCC during the task ( $r = 0.15 \pm 0.11$  s.e.m.,  $p = 0.20$  compared to null distribution,  $p$   
246  $= 0.03$  compared to resting state, t-test) suggesting a vascular component of the default mode  
247 network and an alteration of vascular co-oscillations during active behavior whereas neuron  
248 spiking and vascular activities synchronize during behavioral tasks. Similarly, in the visual cortex,  
249 the correlation between V1 and V2 during the baseline is higher during the resting state (Fig.  
250 4.d, right panel,  $r = 0.66 \pm 0.019$ ,  $p = 5.0e-11$  compared to null distribution) than it is during  
251 task ( $r = 0.39 \pm 0.083$ ,  $p = 3.66e-4$  compared to null distribution,  $p = 0.0038$  compared to  
252 resting state, t-test).

253 We have developed a methodology and associated setup to record simultaneous CBV  
254 and electrophysiological signals in awake behaving macaques. Our method offers first to report  
255 online tracking of the microelectrode localization in the brain of behaving non-human primates.  
256 The spatial resolution of ultrasound imaging offers an unprecedented ability to co-register  
257 micro-electrode and micro-sensor and potentially any rigid pipettes around 100  $\mu\text{m}$  wide within  
258 the Ultrasound imaging referential frame. Further studies might combine our method to  
259 localize viral injections' pipette and may help quantify the spread of compound perfusion  
260 during surgeries with a deeper field of view than allowed by optical imaging<sup>39</sup>, possibly allowing  
261 injections in subcortical areas. Functionally, fUS and electrophysiology do not seem to interfere  
262 with one another, or at least we were not able to measure the interference between them

263 both, thus the coupling of the techniques is far easier than fMRI, optical imaging, and  
264 electrophysiology in awake behaving primates. Previous studies have found that fUS could be  
265 combined with acute or chronic EEG recordings in awake rodents<sup>40,41</sup> and multi- or single-unit  
266 recordings in anesthetized or awake rodents<sup>33,34</sup>. These pioneering studies in awake rodents  
267 have shown a marked change of fUS activity at the initiation of tasks but were limited to  
268 explore sensory or cognitive functions in deep cortical folded brain areas. Our study  
269 demonstrate that our methodology allows using standard protocols to record simultaneous  
270 CBV and electrophysiological signals in awake behaving macaques without movements or  
271 electromagnetic artifacts. For the statistical assessment of CBV, some of these fUS studies used  
272 correlation methods of time evoked variations of CBVs compared to the more standard  
273 protocols used in other imaging techniques such as fMRI. In this study we report fUS analysis  
274 based on GLM standard statistical assessment in NHP<sup>42</sup>. It depicts for each voxel associated  
275 time-series  $Y$ , as the linear combination of regressor of interest (e.g., oculomotor or visual  
276 tasks) including spiking activity of our awake behaving primates. This analysis proved the high  
277 sensitivity of our recording method and showed that brain activity could be investigated with  
278 minimal adaptation for different brain areas or electrophysiological systems (SEF and V1) in  
279 awake behaving primates. We hypothesized that single unit-induced activation is more  
280 localized than the stimuli-induced activation based on the significantly activated area estimated  
281 from the thresholded Z-score maps. This assumes that there is no large difference in the  
282 statistics between both maps so that thresholding does not artificially reduce the activated area  
283 size. This seems to be generally the case as both maps are constructed from the same  
284 acquisitions and parameters.

285 The relationship between both vascular and neuronal signals is still debated. Recent  
286 studies report striking inconsistencies between the fMRI and electrophysiological signals<sup>43</sup>.  
287 Previous fMRI studies have shown that the neurovascular activity (BOLD signal) provided a  
288 reliable measure of multi-unit activities<sup>9-11</sup>. Conversely, other studies have reported a poor  
289 correlation between multi-unit activities and the BOLD signal<sup>5,7,8</sup>. Importantly, we  
290 demonstrated here the cortical volume in which SUA correlate significantly with CBV variations  
291 is smaller than the cortical volume in which task events correlate with cue presentation timings.  
292 Indeed, few works have spatially characterized spikes' contribution to the neurovascular  
293 system. It has been shown that blood flow variations in the olfactory bulb of rodents show a  
294 similar linear relationship with locally measured neuronal  $Ca^{2+}$ <sup>22</sup>. A recent publication showed  
295 that neural signals from the visual cortex and hippocampus in mice, and more particularly firing  
296 rates from inhibitory neurons, also correlate with fUS imaging signals in mice. Co-activation  
297 maps from an fMRI study carried out in human subjects<sup>12</sup> have shown that SUA correlation with  
298 BOLD signal in Heschl's gyrus is more localized than the activity predicted by LFP, although this  
299 result was more qualitative than quantitative. However, the authors tested the correlations



300 between SUA recorded in a first group of patients and the BOLD signals from other patients,  
301 whereas we perform here an intra-individual analysis. At least four hypotheses have been  
302 discussed that can explain the discrepancies between the two LFP and SUA methods: (1) the  
303 BOLD signal follows local field potential (LFP) signals closer than spikes<sup>4</sup>, (2) the BOLD signal is  
304 reflecting electrophysiological signals that are occurring later due to feedback delay<sup>44</sup>, (3) the  
305 BOLD signal is more sensitive than traditional electrophysiological methods due to massive  
306 pooling by the hemodynamic coupling process<sup>45</sup>, and finally (4) there is no real inconsistencies,  
307 and instead, small but reliable effects on firing rates may be obscured by differences in  
308 experimental design and interpretation of results across methods and statistical analysis<sup>46</sup>. Our  
309 main result demonstrates that a fifth explanation prevails. Indeed, fUS imaging enables us to  
310 show that the cortical volume in which SUA correlates significantly with CBV variations is  
311 smaller than the cortical volume in which task events correlate with cue presentation timings.  
312 We demonstrated this in two behaving non-human primates' primary visual and fronto-medial  
313 cortices. It consequently indicates that single-unit activities correlate with CBV variations  
314 recorded if and only if the blood dependent signal is extracted at sufficiently high spatio-  
315 temporal resolutions. As this is the case in fUS imaging, we showed that single unit activities  
316 provide a significant estimate of the neurovascular response with an activated area smaller  
317 than usual fMRI spatial resolution. Thereby, fUS seems a technique of choice in order to study  
318 neurovascular coupling in the brain of awake behaving primates because of a higher spatial  
319 resolution (~200 microns).

320 fUS imaging in awake behaving NHP allowed us also to study the difference of  
321 neurovascular responses between resting state and task. Resting state is believed to be the  
322 reflection of brain activity during rest<sup>47</sup> but it is still unclear if this vascular activity, measured  
323 with fMRI, is the reflection of the neuronal activity, even though some studies use fMRI  
324 combined with EEG or MEG to assess link between them both<sup>36,48-50</sup>. We demonstrated in this  
325 study that CBV and single unit activities are uncorrelated during resting state and become  
326 correlated during various tasks. Furthermore, we found that CBV activities across known  
327 connected brain areas are correlated but decorrelate at the onset of the tasks as expected if  
328 participating in the default mode network (DMN). Therefore, BOLD measured in fMRI, as well as  
329 CBV measured with fUS, during resting state might not much reflect the neuronal activity but  
330 basal metabolic changes through glia and astrocytes or intrinsic connectivity through slow  
331 synchronized neuronal oscillations across distant brain areas.

332 With the current 2D visualization, displacement of the probe is required to map a large  
333 volumetric area. The 2D view remains one intrinsic limitation of our method to investigate the  
334 3D brain activity. However, ongoing development to perform direct 3D ultrasound imagery with  
335 micro-probes would certainly offer new options soon as it is already done in rodents using 3D  
336 array probe<sup>51</sup> or row-column addressed probes<sup>52</sup>. Finally, the use of multi-contact electrodes

337 possibly introduced over an entire cortical region will allow the study of the dynamics and  
338 propagation of the relationship between electrophysiological signals and the vascular response.  
339 Within various parts of cortical areas of primates, the use of such a technique could  
340 undoubtedly allow the study of electrophysiological and vascular responses in layers and thus  
341 succeed in studying neuro-vascular coupling in primates at a spatial and temporal resolution  
342 never achieved.

#### 343 **Data availability**

344

345 All data underlying the figures are freely available on the following link: <https://osf.io/v9xgb/>

346

#### 347 **Author contributions.**

348 J.C. and P.T. designed the coupling system. J.C, M.P and Q.S trained monkeys and acquired  
349 data. J.C. and M.P. analyzed data. A.D. helped for the figures. T.D., S.P., M.T., F.A. and P.P.  
350 supervised this project. Abstract, core text as well as figures were done by J.C., M.P., F.A and  
351 P.P.

352

353 **Competing interests.** M.T. and T.D. are co-inventors of several patents in the field of functional  
354 ultrasound neuroimaging and co-founders of Iconeus company which commercializes ultrasonic  
355 neuroimaging scanners

#### 356 **Materials & Correspondence**

357 Corresponding authors:

358 Mickael Tanter : [mickael.tanter@espci.fr](mailto:mickael.tanter@espci.fr) and Pierre Pouget : [pierre.pouget@icm-institute.org](mailto:pierre.pouget@icm-institute.org)

359

360

361 **REFERENCES**

362

- 363 1. Markicevic, M., Savvateev, I., Grimm, C. & Zerbi, V. Emerging imaging methods to study  
364 whole-brain function in rodent models. *Transl. Psychiatry* **11**, 1–14 (2021).
- 365 2. Buzsáki, G., Anastassiou, C. A. & Koch, C. The origin of extracellular fields and currents  
366 — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 407–420 (2012).
- 367 3. Gupta, P., Balasubramaniam, N., Chang, H.-Y., Tseng, F.-G. & Santra, T. S. A Single-  
368 Neuron: Current Trends and Future Prospects. *Cells* **9**, E1528 (2020).
- 369 4. Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T. & Oeltermann, A. Neurophysiological  
370 investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* **412**, 150–157 (2001).
- 371 5. Niessing, J. *et al.* Hemodynamic Signals Correlate Tightly with Synchronized Gamma  
372 Oscillations. *Science* **309**, 948–951 (2005).
- 373 6. Viswanathan, A. & Freeman, R. D. Neurometabolic coupling in cerebral cortex reflects  
374 synaptic more than spiking activity. *Nat. Neurosci.* **10**, 1308–1312 (2007).
- 375 7. Maier, A. *et al.* Divergence of fMRI and neural signals in V1 during perceptual  
376 suppression in the awake monkey. *Nat. Neurosci.* **11**, 1193–1200 (2008).
- 377 8. Bartolo, M. J. *et al.* Stimulus-induced dissociation of neuronal firing rates and local field  
378 potential gamma power and its relationship to the resonance blood oxygen level-dependent  
379 signal in macaque primary visual cortex. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 1857–1870 (2011).
- 380 9. Nir, Y., Dinstein, I., Malach, R. & Heeger, D. J. BOLD and spiking activity. *Nat. Neurosci.*  
381 **11**, 523–524 (2008).
- 382 10. Rees, G., Friston, K. & Koch, C. A direct quantitative relationship between the functional  
383 properties of human and macaque V5. *Nat. Neurosci.* **3**, 716–23 (2000).
- 384 11. Lima, B., Cardoso, M. M. B., Sirotin, Y. B. & Das, A. Stimulus-related neuroimaging in  
385 task-engaged subjects is best predicted by concurrent spiking. *J. Neurosci. Off. J. Soc.*  
386 *Neurosci.* **34**, 13878–13891 (2014).
- 387 12. Mukamel, R. *et al.* Coupling Between Neuronal Firing, Field Potentials, and fMRI in  
388 Human Auditory Cortex. *Science* **309**, 951–954 (2005).
- 389 13. Klink, P. C. *et al.* Combining Brain Perturbation and Neuroimaging in Non-human  
390 Primates. *NeuroImage* 118017 (2021) doi:10.1016/j.neuroimage.2021.118017.
- 391 14. Das, A., Murphy, K. & Drew, P. J. Rude mechanicals in brain haemodynamics: non-  
392 neural actors that influence blood flow. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **376**, 20190635  
393 (2021).
- 394 15. Lee, J. H. *et al.* Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically  
395 by type and wiring. *Nature* **465**, 788–792 (2010).
- 396 16. Kahn, I. *et al.* Optogenetic drive of neocortical pyramidal neurons generates fMRI signals  
397 that are correlated with spiking activity. *Brain Res.* **1511**, 33–45 (2013).
- 398 17. Macé, E. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* **8**, 662–664  
399 (2011).
- 400 18. Bercoff, J. *et al.* Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow  
401 characterization. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **58**, 134–147 (2011).
- 402 19. Demené, C. *et al.* Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly  
403 Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity. *IEEE Trans. Med. Imaging* **34**, 2271–2285

- 404 (2015).
- 405 20. Brunner, C. *et al.* A Platform for Brain-wide Volumetric Functional Ultrasound Imaging  
406 and Analysis of Circuit Dynamics in Awake Mice. *Neuron* **108**, 861-875.e7 (2020).
- 407 21. Gesnik, M. *et al.* 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in  
408 rodents. *Neuroimage* **149**, 267–274 (2017).
- 409 22. Aydin, A.-K. *et al.* Transfer functions linking neural calcium to single voxel functional  
410 ultrasound signal. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
- 411 23. Macé, É. *et al.* Whole-Brain Functional Ultrasound Imaging Reveals Brain Modules for  
412 Visuomotor Integration. *Neuron* **100**, 1241-1251.e7 (2018).
- 413 24. Boido, D. *et al.* Mesoscopic and microscopic imaging of sensory responses in the same  
414 animal. *Nat. Commun.* **10**, 1110 (2019).
- 415 25. Bergel, A., Deffieux, T., Demené, C., Tanter, M. & Cohen, I. Local hippocampal fast  
416 gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep.  
417 *Nat. Commun.* **9**, (2018).
- 418 26. Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-  
419 related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
- 420 27. Blaize, K. *et al.* Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman  
421 primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 14453–14463 (2020).
- 422 28. Norman, S. L. *et al.* Single-trial decoding of movement intentions using functional  
423 ultrasound neuroimaging. *Neuron* **109**, 1554-1566.e4 (2021).
- 424 29. Imbault, M., Chauvet, D., Gennisson, J.-L., Capelle, L. & Tanter, M. Intraoperative  
425 Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity. *Sci. Rep.* **7**, 7304 (2017).
- 426 30. Demene, C. *et al.* Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns.  
427 *Sci. Transl. Med.* **9**, eaah6756 (2017).
- 428 31. Demené, C., Mairesse, J., Baranger, J., Tanter, M. & Baud, O. Ultrafast Doppler for  
429 neonatal brain imaging. *NeuroImage* **185**, 851–856 (2019).
- 430 32. Demené, C. *et al.* Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain  
431 vasculature in patients. *Nat. Biomed. Eng.* **5**, 219–228 (2021).
- 432 33. Sans-Dublanc, A. *et al.* Optogenetic fUSI for brain-wide mapping of neural activity  
433 mediating collicular-dependent behaviors. *Neuron* **0**, (2021).
- 434 34. Provansal, M. *et al.* Functional ultrasound imaging of the spreading activity following  
435 optogenetic stimulation of the rat visual cortex. *Sci. Rep.* **11**, 12603 (2021).
- 436 35. Nunez-Elizalde, A. O. *et al.* Neural correlates of blood flow measured by ultrasound.  
437 *Neuron* **110**, 1631-1640.e4 (2022).
- 438 36. Musso, F., Brinkmeyer, J., Mobascher, A., Warbrick, T. & Winterer, G. Spontaneous  
439 brain activity and EEG microstates. A novel EEG/fMRI analysis approach to explore resting-  
440 state networks. *NeuroImage* **52**, 1149–1161 (2010).
- 441 37. Huang, X., Long, Z. & Lei, X. Electrophysiological signatures of the resting-state fMRI  
442 global signal: A simultaneous EEG-fMRI study. *J. Neurosci. Methods* **311**, 351–359 (2019).
- 443 38. Claron, J. *et al.* Covariations between pupil diameter and supplementary eye field  
444 activity suggest a role in cognitive effort implementation. *PLoS Biol.* **20**, e3001654 (2022).
- 445 39. Mocanu, V. M. & Shmuel, A. Optical Imaging-Based Guidance of Viral Microinjections  
446 and Insertion of a Laminar Electrophysiology Probe Into a Predetermined Barrel in Mouse Area  
447 S1BF. *Front. Neural Circuits* **15**, 541676 (2021).

- 448 40. Sieu, L.-A. *et al.* EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nat. Methods* **12**,  
449 831–834 (2015).
- 450 41. Bergel, A. *et al.* Adaptive modulation of brain hemodynamics across stereotyped running  
451 episodes. *Nat. Commun.* **11**, 6193 (2020).
- 452 42. Claron, J. *et al.* Large-scale functional ultrasound imaging of the spinal cord reveals in-  
453 depth spatiotemporal responses of spinal nociceptive circuits in both normal and inflammatory  
454 states. *Pain* **162**, 1047–1059 (2021).
- 455 43. Takata, N. *et al.* Optogenetic astrocyte activation evokes BOLD fMRI response with  
456 oxygen consumption without neuronal activity modulation. *Glia* **66**, 2013–2023 (2018).
- 457 44. Saad, Z. S., Ropella, K. M., Cox, R. W. & DeYoe, E. A. Analysis and use of fMRI  
458 response delays. *Hum. Brain Mapp.* **13**, 74–93 (2001).
- 459 45. Bandettini, P. A. Neuronal or hemodynamic? Grappling with the functional MRI signal.  
460 *Brain Connect.* **4**, 487–498 (2014).
- 461 46. Boynton, G. M. Spikes, BOLD, attention, and awareness: a comparison of  
462 electrophysiological and fMRI signals in V1. *J. Vis.* **11**, 12 (2011).
- 463 47. Smith, S. M. *et al.* Resting-state fMRI in the Human Connectome Project. *NeuroImage*  
464 **80**, 144–168 (2013).
- 465 48. Brookes, M. J. *et al.* Investigating the electrophysiological basis of resting state networks  
466 using magnetoencephalography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16783–16788 (2011).
- 467 49. Yuan, H., Zotev, V., Phillips, R., Drevets, W. C. & Bodurka, J. Spatiotemporal dynamics  
468 of the brain at rest—exploring EEG microstates as electrophysiological signatures of BOLD  
469 resting state networks. *NeuroImage* **60**, 2062–2072 (2012).
- 470 50. Britz, J., Van De Ville, D. & Michel, C. M. BOLD correlates of EEG topography reveal  
471 rapid resting-state network dynamics. *NeuroImage* **52**, 1162–1170 (2010).
- 472 51. Rabut, C. *et al.* 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat.*  
473 *Methods* **16**, 994–997 (2019).
- 474 52. Sauvage, J. *et al.* 4D Functional Imaging of the Rat Brain Using a Large Aperture Row-  
475 Column Array. *IEEE Trans. Med. Imaging* **39**, 1884–1893 (2020).
- 476 53. Baranger, J. *et al.* Adaptive Spatiotemporal SVD Clutter Filtering for Ultrafast Doppler  
477 Imaging Using Similarity of Spatial Singular Vectors. *IEEE Trans. Med. Imaging* **37**, 1574–1586  
478 (2018).

480           **METHODS**

481

482    Animal model and behavioral data.

483 All experiments were ethically approved by the French “Ministère de l’Education, de  
484 l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” under the project references APAFIS #6355-  
485 2016080911065046 and #9013-2017021515254591. Functional data were acquired from two  
486 captive-born rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), S and L, each one trained to perform different  
487 visual tasks.

488 Monkeys were seated in a primate chair (Crist Instruments) with their head fixed and placed in  
489 front of a cathodic computer screen, 58cm away in a darkened booth. Mean screen luminance  
490 was controlled ( $1.15 \text{ mW.cm}^{-2}$ ). Eye position of the primate was monitored at 1 kHz using an  
491 infrared video eye tracker (Eyelink 1k, SR-Research), which enabled live control of the  
492 behavioral paradigm and the delivery of a reward (sugary water) based on the success or failure  
493 of a visual task. Experiments were controlled by EventIDE software (Okazolab, Netherlands).  
494 Primates were under mild fluid restriction (approximately 30 mL/kg/day) and could drink ad  
495 libitum while working.

496

497    Behavioral paradigm for SEF data. Monkey S was trained to perform an active oculomotor task  
498 consisting of successive and randomized pro-saccades and antisaccades. After a baseline (100  
499 to 120 seconds, random), the monkey had to perform a pro-saccade (look at the presented  
500 target) if the presented cue was a vertical rectangle or an anti-saccade (look on the opposite  
501 side of the presented target) if the above-mentioned rectangle was horizontal. After a  
502 successful trial, the monkey received a sugary water reward (few drops) and an intertrial of 3 to  
503 4 seconds (time between the end of a trial and the beginning of the next trial) was applied. If  
504 the trial was wrong, no sugary water was delivered and the intertrial started. The monkey  
505 worked for approximately one hour.

506

507    Behavioral paradigm for V1 data. Monkey L was trained to perform passive fixation tasks. All  
508 sessions (except two) began with a 100s-baseline during which no stimuli were presented. The  
509 animal started the trial by fixing a central green square subtending 0.2 degrees of visual angle  
510 (DVA) for a random duration between 500 and 1000 ms within a tolerance window of 1.5 DVA.  
511 A visual stimulus of the peripheral location was then presented for 1s. We used different types  
512 of stimuli among sessions that were all localized in the left visual field. For most sessions, a  
513 single stimulus was presented. First, we used hemi-concentric bands of 2 DVA width centered  
514 on the central fixation point, filled with sinusoidal gratings with a fixed temporal frequency (one  
515 cycle per degree). The eccentricity was locked to 6 DVA. Second, we used polar angle stimuli  
516 that were 15 DVA of angular width extending from 1.5 to 15 DVA filled with sinusoidal gratings  
517 with a fixed temporal frequency (one cycle per degree). Third, we used gratings with varying



518 spatial frequencies (3, 6, 9, 15 cycles per degree) in a rectangle area that covered the bottom-  
519 left quarter of visual field (DVA: -8 to 0 in the X axis, -7 to 0 in the Y axis). Fourth, we used a  
520 local checkerboard of 4\*4 DVA center at R=6 DVA and theta =  $-\frac{3}{4}\pi$  radians. The animal was  
521 rewarded by a small drop of liquid (sugary water) at the end of each correct fixation trial. We  
522 imposed an intertrial interval of 9 s to ensure that the CBV value came back to the initial value.  
523 We also used control trials with the same temporal organization but without any peripheral  
524 visual stimulus. All conditions were randomly interleaved.

525

#### 526 Implant and probe for functional ultrasound imaging For Awake Cooperative Monkeys.

527 The head of the monkey was fixed using a surgically implanted titanium head post (Crist  
528 Instrument, MD, USA). After behavioral training of the animals, a recording chamber (CILUX  
529 chamber, Crist Instrument, MD, USA) was implanted and a craniotomy (diameter 19 mm) was  
530 performed (for monkey S: mediolateral: +0mm, anteroposterior: +26mm; for monkey L:  
531 mediolateral: +7 mm, anteroposterior: -10 mm, dorso-ventral: +38 mm). A custom ultrasonic  
532 probe (128 elements, 15 MHz, 100 x 100  $\mu\text{m}^2$  of spatial resolution) with sterile ultrasonic gel  
533 was used in the chamber. The acquired images had a pixel size of 100 x 100  $\mu\text{m}$  and a slice  
534 thickness of 400  $\mu\text{m}$ . We could image 12 mm along the cortical surface and up to 15 mm in  
535 depth.

536

537

#### 538 Functional ultrasound (fUS) recordings.

539 Changes in CBV were measured using a real time functional ultrasound scanner prototype  
540 (Iconeus and Inserm U1273, Paris, France) with a custom 15-MHz linear probe. Data were  
541 acquired by emitting continuous groups of 11 planar ultrasonic waves tilted at angles varying  
542 from  $-10^\circ$  to  $10^\circ$ . Ultrasonic echoes were summed to create a single compound image acquired  
543 every 2 ms. Final Doppler images were sampled at 2.5Hz by averaging 200 compound ultrasonic  
544 images after spatiotemporal filtering based on the singular value decomposition of the  
545 ultrasonic images.

546

#### 547 Eye movements and pupil recordings.

548 Eye movements and pupil diameter were recorded during the tasks using a video eye tracker  
549 (Eyelink 1k, SR-Research) connected to an analog-to-digital converter (Plexon Inc, TX, USA). All  
550 data were collected using Plexon software and analyzed using MATLAB (The MathWorks  
551 Inc.,Massachusetts, USA). Saccades were detected when the eye's horizontal velocity went over  
552  $30^\circ/\text{s}$ .

553

554 Online microelectrode position monitoring

555

556 We slowly ( $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) inserted a microelectrode through the cortex via the adapter tube while  
557 performing live fUS imaging of the region of interest. The microelectrode is not visible in  
558 ultrasonic images and its location in the imaged plane is obtained by estimating local motion  
559 thanks to the Singular Value Decomposition (SVD) of the ultrasonic raw data. Because the  
560 electrode moved slowly, we adjusted the SVD clutter filter from  $\lambda = 30$  to  $\lambda = 2$  to track the  
561 electrode movement accurately rather than blood flow. We determined the optimum value for  
562 the SVD clutter filter in NPH using the adaptive spatiotemporal SVD as described by Baranger et  
563 al.<sup>53</sup> and determined  $\lambda = 30$  as the optimum SVD clutter filter for the discrimination between  
564 tissue motion and blood flow in NHP. However, as the electrode is moving slower than red  
565 blood cells in vessels, we changed the clutter filter to isolate the insertion motion signal from  
566 the electrode and experimentally determined  $\lambda = 2$  as the optimal value for the SVD clutter  
567 filter for online electrode monitoring.

568

#### 569 Extracellular electrophysiological recordings.

570 Extracellular neuronal activity and local field potential (LFP) were recorded in vivo  
571 simultaneously with fUS recording, using tungsten microelectrodes of impedance ranging from  
572 8 to 10 M $\Omega$  for monkey S (ref UEWLGASEFN1E, FHC Inc, ME, USA) or glass-coated tungsten  
573 electrodes of impedance ranging from 0.5 to 2.5 M $\Omega$  for monkey L (reference 366-120615-00,  
574 Alpha Omega, USA). The microelectrode was inserted into a 60 to 70mm stainless steel tubing  
575 and the tip of the microelectrode was connected to an amplifier with a male gold-plated pin  
576 connector (Ref. #520200, A-M Systems, WA, USA). The extracellular signal was amplified and  
577 collected using Plexon software. Offline spike analysis was performed manually using Plexon  
578 Offline Sorter (Plexon Inc, TX, USA). The microelectrode motion into cortical layers was  
579 performed using a micro-descender.

580

#### 581 Setup preparation:

582 The bottom of the recording chamber was filled with sterile ultrasonic gel. The ultrasonic probe  
583 and microelectrode with steel guide tube were inserted into the designed co-recording device.  
584 Hereafter, the device was inserted into the recording chamber, until contact with the ultrasonic  
585 gel. Appropriate position of the device was verified by fUS live view acquisition.

586

#### 587 fUS data processing:

588 Doppler data were analyzed using a generalized linear model approach implemented in Matlab.  
589 The stimulation pattern, consisting of a Dirac comb with all cues presentations, in the design  
590 matrix was convoluted with the fUS-determined hemodynamic response function and a Z-score  
591 and p-value map were obtained. The activation maps show the Z-score of all pixels in the  
592 images with a p-value  $< 0.001$  (before Benjamini-Hochberg procedure to decrease false  
593 discovery rate). We chose the region of interest (ROI) within the supplementary eye field based



594 on the Z-score map and Paxinos atlas for macaque brains and the signal was averaged to obtain  
595 a single temporal signal. The spatially averaged signal was then expressed as the relative  
596 increase in CBV (in percent) by subtracting the baseline CBV (calculated during the baseline at  
597 the beginning of an acquisition) followed by division of the difference by the baseline CBV.  
598 Same analysis was run for V1.

#### 599 Processing of electrophysiological signals

600 Electrophysiological data were spike-sorted both online and offline, using Plexon software  
601 (Plexon Offline Sorter v4.5.1, Plexon, Dallas, TX, USA) during and after data acquisition. After  
602 the spike sorting, spikes are realigned on different time events (time of the cue presentation,  
603 time of the saccade for monkey S. and time of the reward) to determine the nature of the  
604 recorded neuron and the spike density function (SDF). The spike-density function was produced  
605 by convolving the spike train from each trial with a function resembling a postsynaptic potential  
606 specified by  $\tau_g$ , the time constant for the growth phase, and  $\tau_d$ , the time constant for the decay  
607 phase as  $R(t) = (1 - \exp(-t/\tau_d)) * \exp(-t/\tau_d)$ . Based on physiological data from excitatory synapses  
608  $\tau_g$  was set to 1 ms and  $\tau_d$  to 20 ms / 50ms for Monkey S and Monkey L, respectively (Sayer et al.  
609 1990). The magnitude of the visual response was determined for each cell as the maximum  
610 value of the spike-density function during the time interval between the onset and the end of  
611 visual response. For the statistical parametric mapping, we needed an input signal linked to the  
612 neural activity. Here, we simply convolved spikes trains with the haemodynamic response  
613 function determined for each animal for their respective studied brain region (SEF for Monkey  
614 S. and V1 for Monkey L.) sampled at 1kHz and downsampled this signal to fUS imaging rate (2.5  
615 Hz) before applying the generalized linear model for the statistical parametric mapping  
616 algorithm.

#### 617 Cross-correlation between signals

618 In order to calculate the cross-correlation between fUS signal and spikes density function, we  
619 down-sampled the SDF to fUS signal frequency (2.5Hz). Signals were then cut in non-  
620 overlapping 10 seconds windows and cross-correlations were calculated using MATLAB *xcorr*  
621 function with '*normalized*' option (in order to normalize signals in such a way that auto-  
622 correlation at null lag is equal to 1). Same protocol was used to calculate fUS-fUS cross-  
623 correlation. Afterwards, we took in account the delay for which the absolute value of correlation or  
624 anti-correlation between signals was obtained: 2s (SEF) and 5.2s (V1) for fUS-SDF and 0s for fUS-fUS  
625 cross-correlation. As we wished to compare the cross-correlation during the baseline and the  
626 cross-correlation during the task, we used the *paired T-test* after verifications of data normality  
627 using the Shapiro-Wilk test.

628

629

630

631

632 **Figure 1: experimental setup. (a)** Co-localization adaptor. We used this set-up on both animals;  
633 here it is illustrated for the recording of SEF activities. Top panels: a custom cylindrical adaptor  
634 allowed the placement of a custom fUS probe (128 elements, 15 MHz, 100 x 100  $\mu\text{m}^2$  of spatial  
635 resolution) into the recording chamber. A micromanipulator was screwed on top of the adaptor  
636 and controlled the insertion of a single-channel electrode through the cortex via a tilted guide  
637 tube so that the tip of the electrode was placed in the fUS imaging plane. Bottom: fUS of the  
638 SEF. **(b)** Co-recording adapter. We used this set-up on both animals; here it is illustrated for the  
639 recording of the visual cortex activities. Same as the co-localization adapter except the single-  
640 channel electrode is inserted parallel to the fUS imaging plane. Spatial scale bar: 2mm **(c)** Online  
641 tracking of micro-electrodes. fUS of the region of interest (visual cortex here) was performed  
642 while inserting a single-channel electrode through the brain tissue. A high Power Doppler signal  
643 was detected when the tip of the electrode reached the fUS imaging plane at  $z=5\text{mm}$ . This high  
644 Power Doppler signal extended downward when further inserting the microelectrode ( $z=7\text{mm}$ ,  
645  $z=10\text{mm}$  and  $z=12\text{mm}$ , respectively).

646 **Figure 2. Task-related CBV responses. (a-b)** Behavioral tasks. Both tasks began with a baseline  
647 period (no stimulus). **(a)** Saccade task. Following an initial fixation of a central spot, the animal  
648 had to perform a saccade or anti-saccade depending on the cue that appeared on screen  
649 (vertical or horizontal bar, respectively). **(b)** Passive fixation task. Following an initial fixation of  
650 a central spot, the animal had to maintain its gaze during 1s while a visual stimulus (see  
651 Methods for the different stimuli) appeared on screen. **(c-d)** Task-based Generalized Linear  
652 Model (GLM). For each animal and cortical area (blue: SEF, green: visual cortex), we computed  
653 a behavior-based  $\Delta\text{CBV}$  prediction by convoluting the stimulation pattern (timings of cue  
654 presentation) with the hemodynamic response function (HRF). We then obtained activation  
655 maps that represent the Z-score for all voxels above a significance threshold ( $p<0.001$  after  
656 Benjamini-Hochberg correction). **(e)** and **(g)** respectively display representative activation maps  
657 of the SEF and the visual cortex. Coloured dashed lines represent the regions of interest. **(f)** and  
658 **(h)** display scatter plots of the median Z-score of activation of each session against its volume  
659 for SEF and visual cortex, respectively. Plain symbols display mean data. Ellipses represent the  
660 SD in each dimension. Spatial scale bar: 2 mm.

661 **Figure 3. Spike's contribution to the CBV response. (a)** Top: raster plot of the SEF single-unit  
662 that was co-recorded with fUS, for correct trials only. Bottom: spike density function (SDF, blue  
663 curve) of the same single-unit as above and  $\Delta\text{CBV}$  from the ROI delimited in the SEF map in (e).  
664 **(b)** Same but for the visual cortex activities extracted from the same example session than the  
665 visual cortex activation map in (g).  $t=0$  refers to the cue presentation. Data presented are mean  
666  $\pm$  s.e.m. **(c-d)** GLM based on spike activities. Diagrams in each panel: same as Fig. 2. (c-d) but  
667 the stimulus pattern is replaced by the spikes onset. **(e)** and **(g)** Representative spike-induced  
668 activation maps of the SEF and the visual cortex, respectively. Coloured dashed lines represent

669 the regions of interest. Stars represent the electrode insertion axis (distance *circa* 1mm tangent  
670 to the imaging plane). Green-colored pixels represent the behavior-induced CBV response  
671 (shown in Fig 2.(e) and (g)) which is more spread. **(f)** and **(h)** display scatter plots of the median  
672 Z-score of activation of each session against its volume for SEF and visual cortex, respectively.  
673 Task-induced and SUA-induced activations are represented by blue diamonds and red triangles,  
674 respectively. Plain symbols display mean data. Ellipses represent the SD in each dimension.  
675 Spatial scale bar: 2mm.

676 **Figure 4. Intra- and inter-areas cross-correlation of neural spiking and CBV variations shift**  
677 **when behavioral task is engaged.** **(a)** Left panel: example of CBV variations (red curve) and SDF  
678 (blue curve) during session for SEF. Right panel: mean sliding cross-correlation between CBV  
679 variations and SDF in SEF across all sessions ( $n=9$ ). Grey shaded area represents s.e.m. **(b)** Same  
680 as (a) for V1 ( $n=15$  sessions). **(c)** Left graph: mean cross-correlation between CBV variations and  
681 SDF during resting state (i.e., initial baseline (BL) of the recording session) and task for SEF and  
682 median cingulate cortex (MCC). Right graph: cross-correlation between CBV variations of SEF  
683 and MCC during resting state and task. Map: locations of the areas used before. **(d)** Same as **(c)**  
684 for V1 and V2. Control area is a  $1 \times 1$  mm<sup>2</sup> squared ROI located at the bottom left corner of fUS  
685 images for monkey L.

686 **Supplementary Figure 1.** Mean CBV variations among sessions for each stimulus used. Shaded  
687 areas represent standard deviation. The number of sessions per stimulus is indicated ( $n=79$  in  
688 total). 'Exc' refers to hemi-concentric bands of 2 DVA width with varying eccentricities. 'SF'  
689 refers to gratings with varying spatial frequencies in a rectangle area that covers the bottom-  
690 left quarter of visual field (DVA : -8 to 0 in the X axis, -7 to 0 in the Y axis). 'Polar angle' refers to  
691 the polar angle stimulus with 15 DVA of angular width extending from 1.5 to 15 DVA. 'CB' refers  
692 to local checkerboard.

693 **Supplementary Figure 2. All GLM stimuli-induced maps for SEF and V1.** Stimuli used for each  
694 session for V1 are indicated.

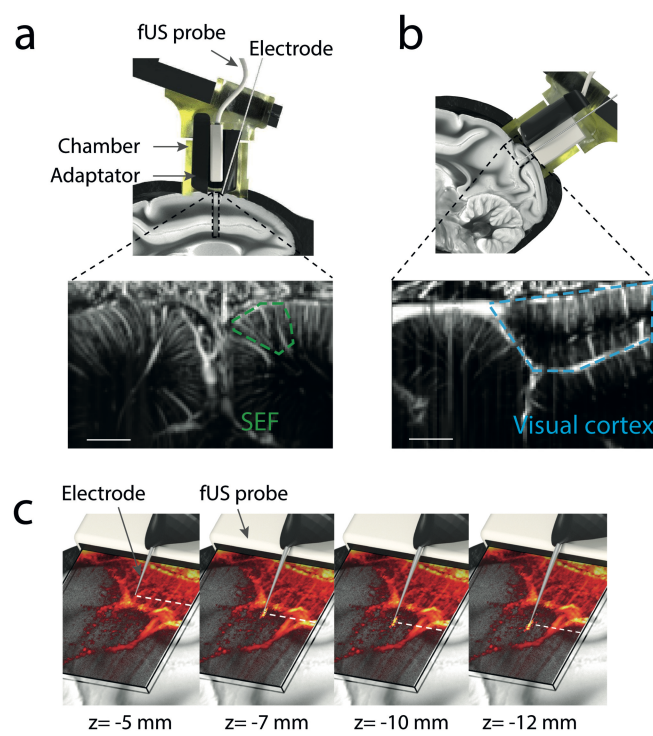
695 **Supplementary Figure 3. All GLM spikes-induced maps for SEF and V1.** Stimuli used for each  
696 session for V1 are indicated.

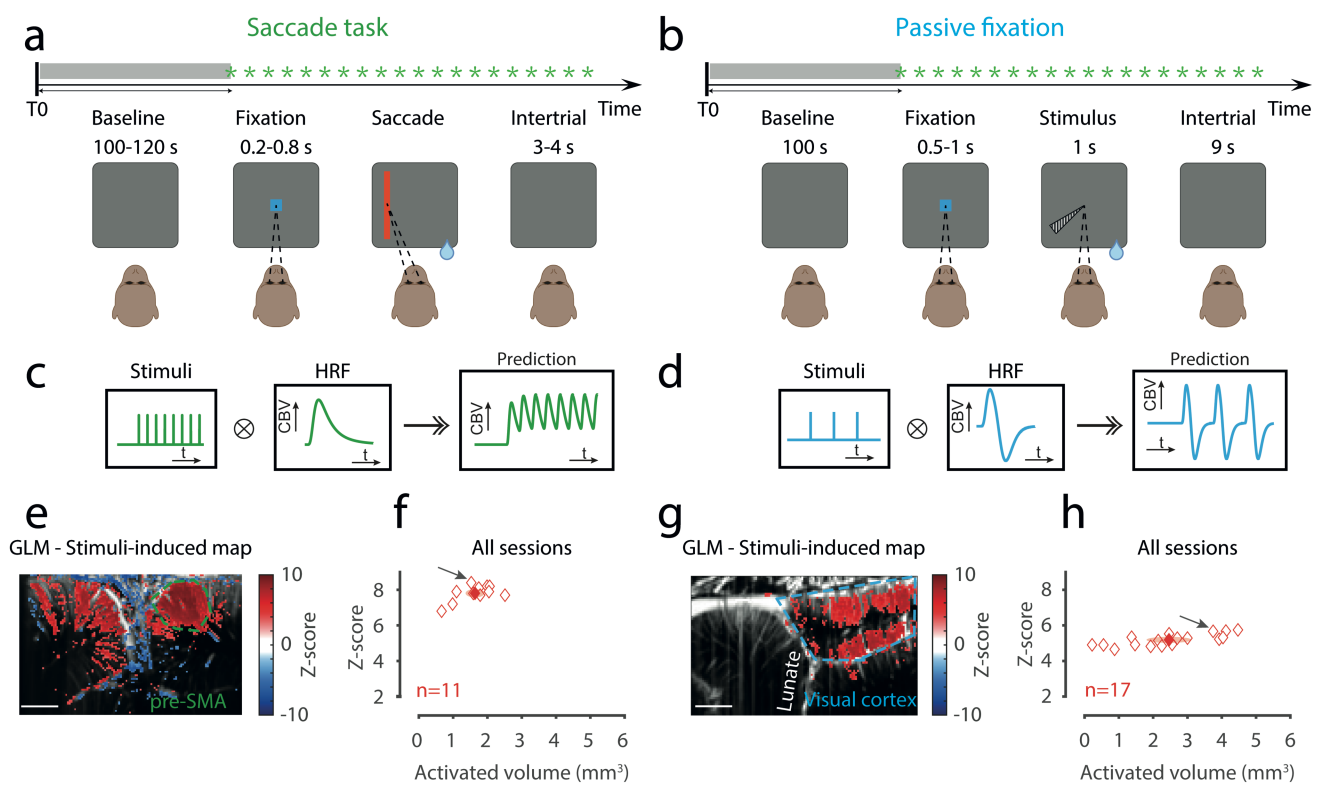
697

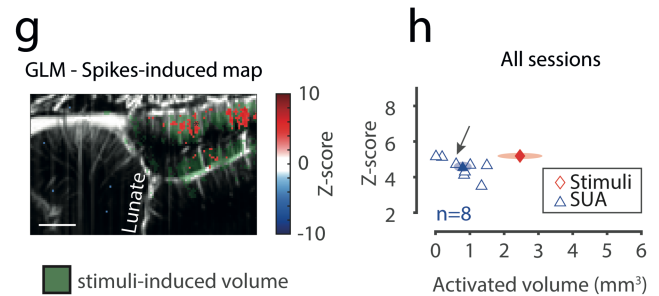
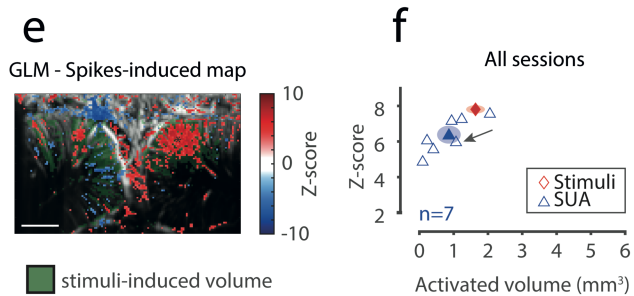
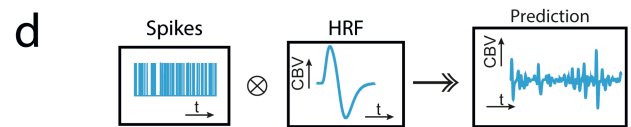
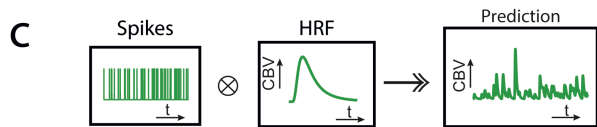
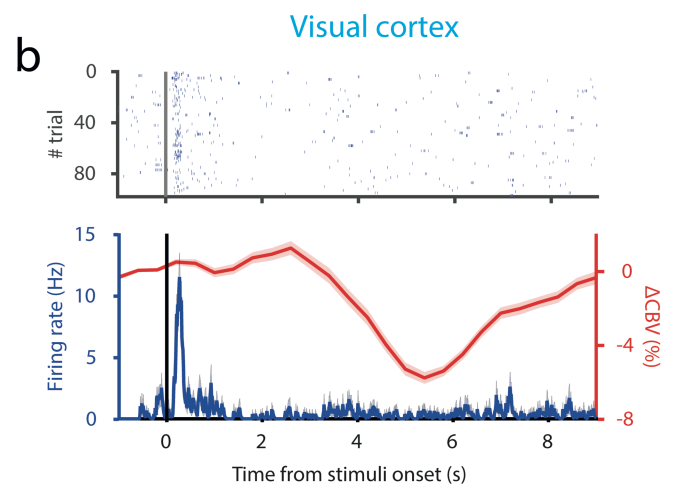
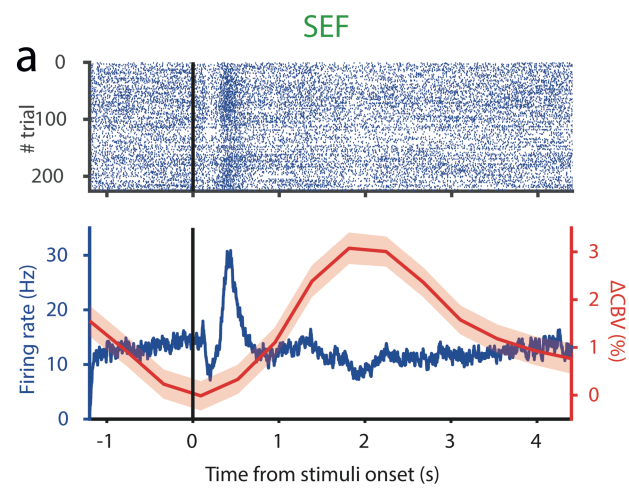
698

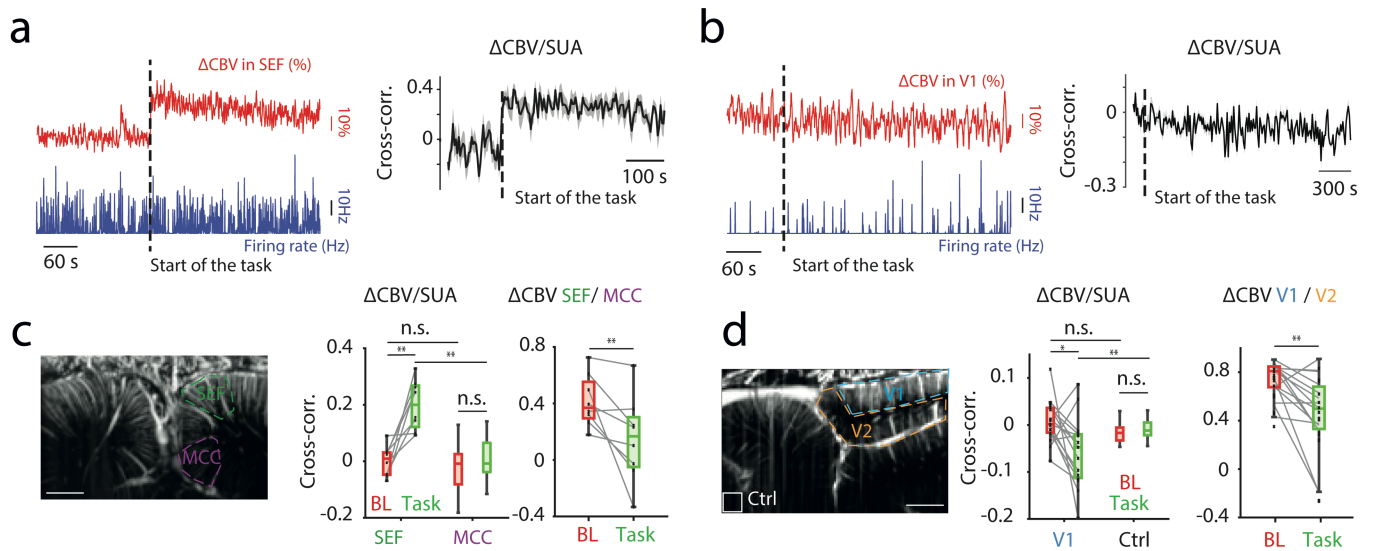
699

700

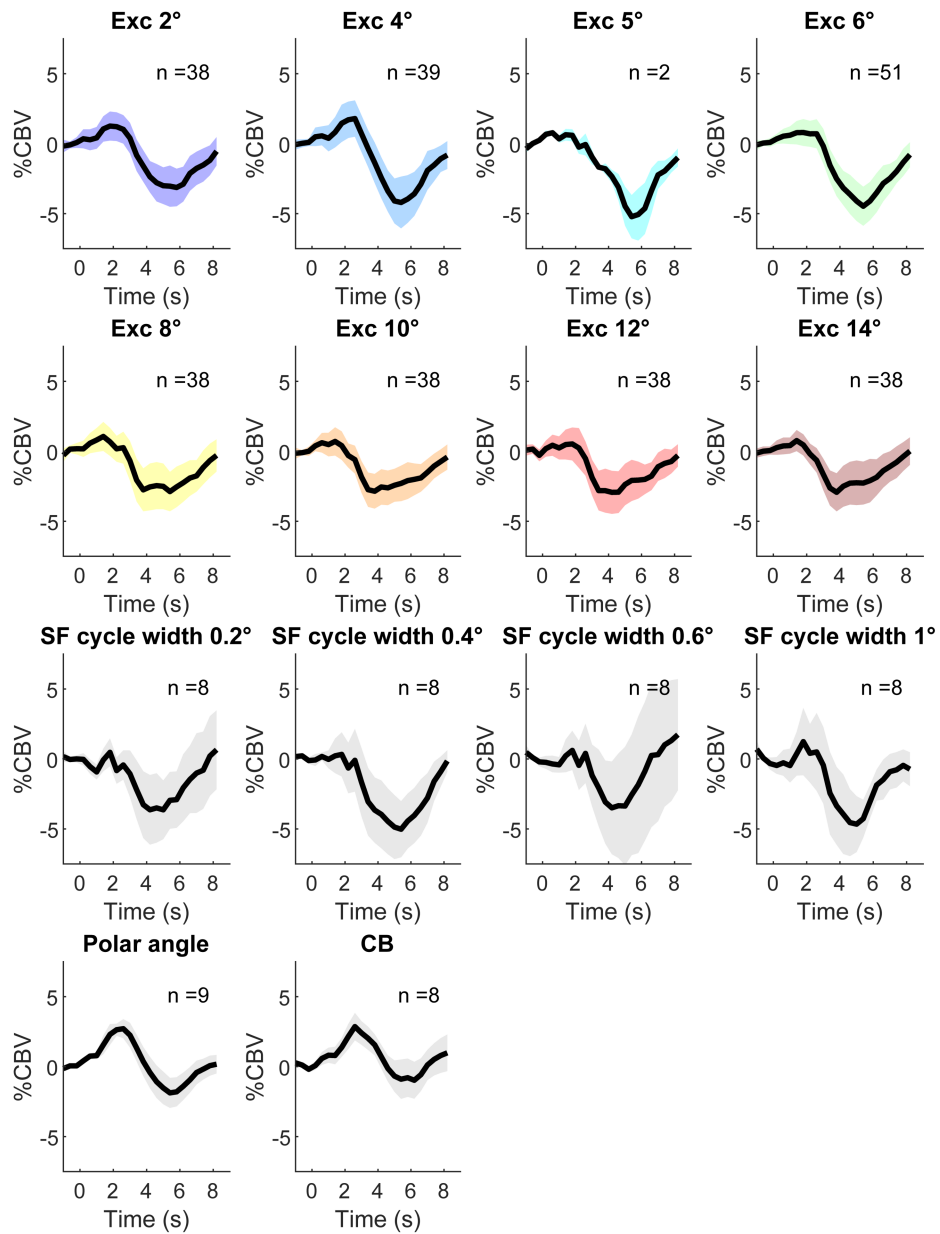




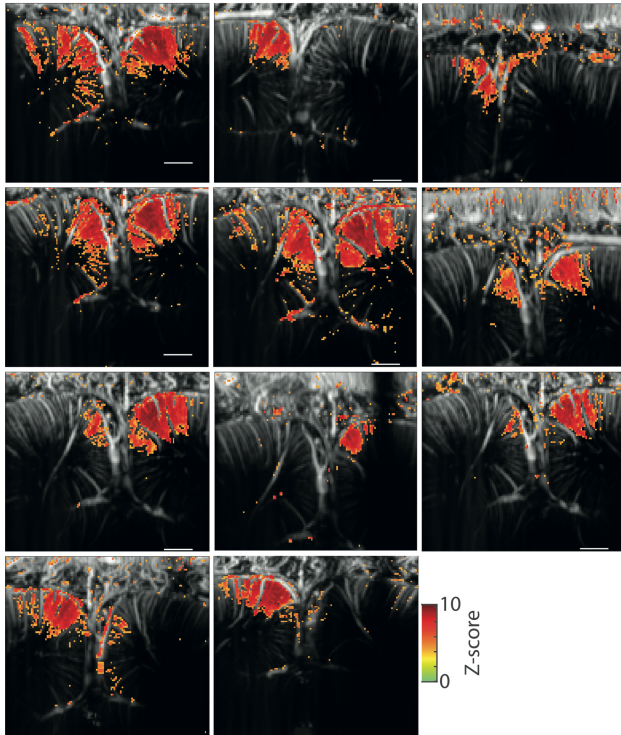




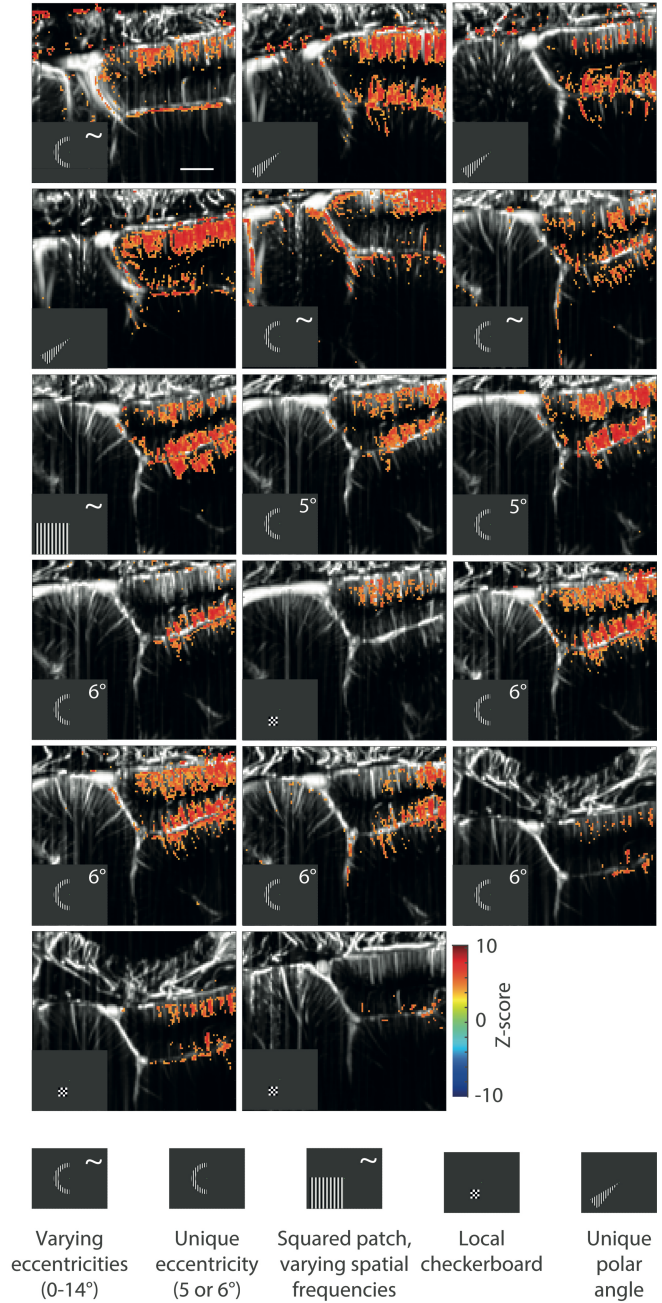




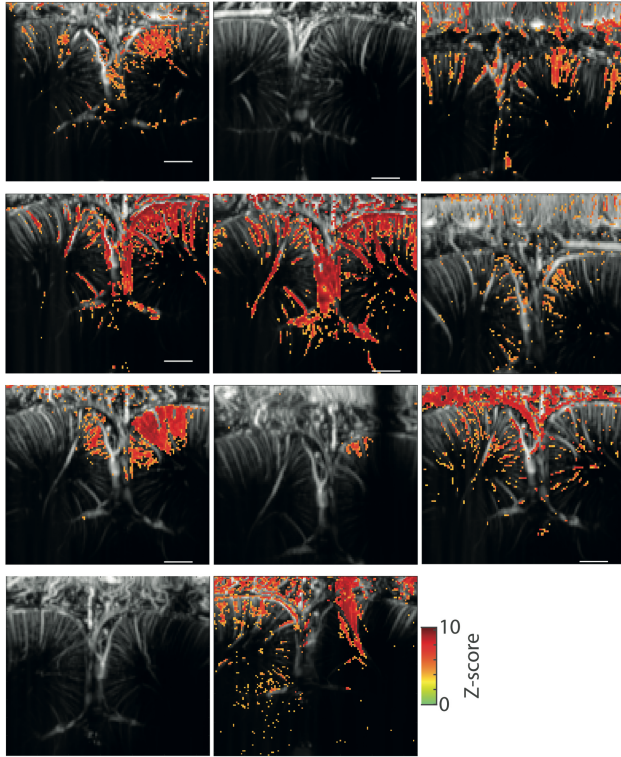
### Prefrontal cortex



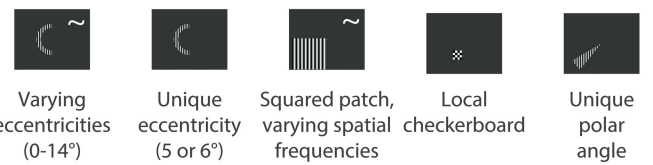
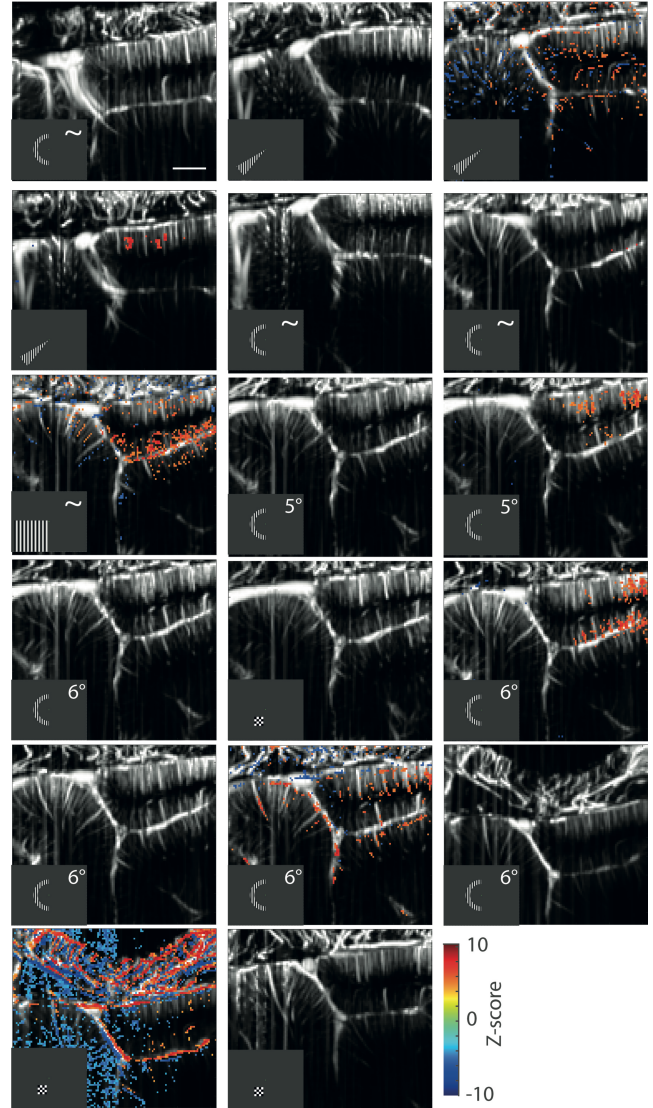
### Visual cortex



### Prefrontal cortex



### Visual cortex



## 2.4. Chapitre 4 : développement de la stratégie sonogénétique de restauration visuelle corticale chez le primate non-humain

### 2.4.1. Introduction.

Suite aux travaux sur le rat, nous avons décidé de poursuivre ce travail de restauration visuelle au niveau cortical sur la thérapie sonogénétique. Pour évaluer la possibilité de transférer cette stratégie en clinique, nous avons commencé le développement de cette approche sur le primate non-humain. L'objectif est de démontrer la possibilité d'exprimer le canal mécanosensible dans le cortex visuel de primate, prouver la possibilité de l'activer fonctionnellement, puis, par une étude du comportement de l'animal, apporter la preuve d'une vision des formes et des mouvements. Dans cette partie, nous présenterons les travaux préparatoires effectués pour tester physiologiquement et de façon comportementale le succès de la stratégie corticale de restauration visuelle sonogénétique.

La première question à laquelle nous avons voulu répondre est de savoir si le vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdT testé chez le rongeur permet aussi une transduction efficace des neurones de V1 chez le primate non-humain (*Macaca mulatta*). Pour cela, nous devons également développer une technique qui permette d'opérer en toute sécurité les injections d'AAV au niveau cortical du primate. Enfin, il nous faut également implémenter les analyses histologiques sur le cerveau de primates non-humains. Dans un premier temps, pour démontrer l'activation du canal mécanosensible, nous prévoyons de mesurer l'activité par imagerie ultrasonore fonctionnelle et par électrophysiologie mais aussi de tester si l'activation du canal se traduit par la perception d'un phosphène.

Dans ce chapitre, nous montrerons comment nous avons entraîné trois animaux (deux *Macaca mulatta* et un *Macaca fascicularis*) à effectuer une tâche de détection de cibles visuelles par exécution de saccades visuelles. Pour connaître la correspondance entre champs récepteur et les zones ciblées et donc par extension, la localisation du phosphène attendu produit dans le du champ visuel, nous avons réalisé des cartes rétinotopiques du cortex visuel au sein de la chambre d'enregistrement d'un premier animal (*Macaca mulatta*) par imagerie ultrasonore. Nous montrons dans ce chapitre comment ces résultats peuvent nous permettre de définir la zone d'injection d'AAV à privilégier dans la chambre d'enregistrement.

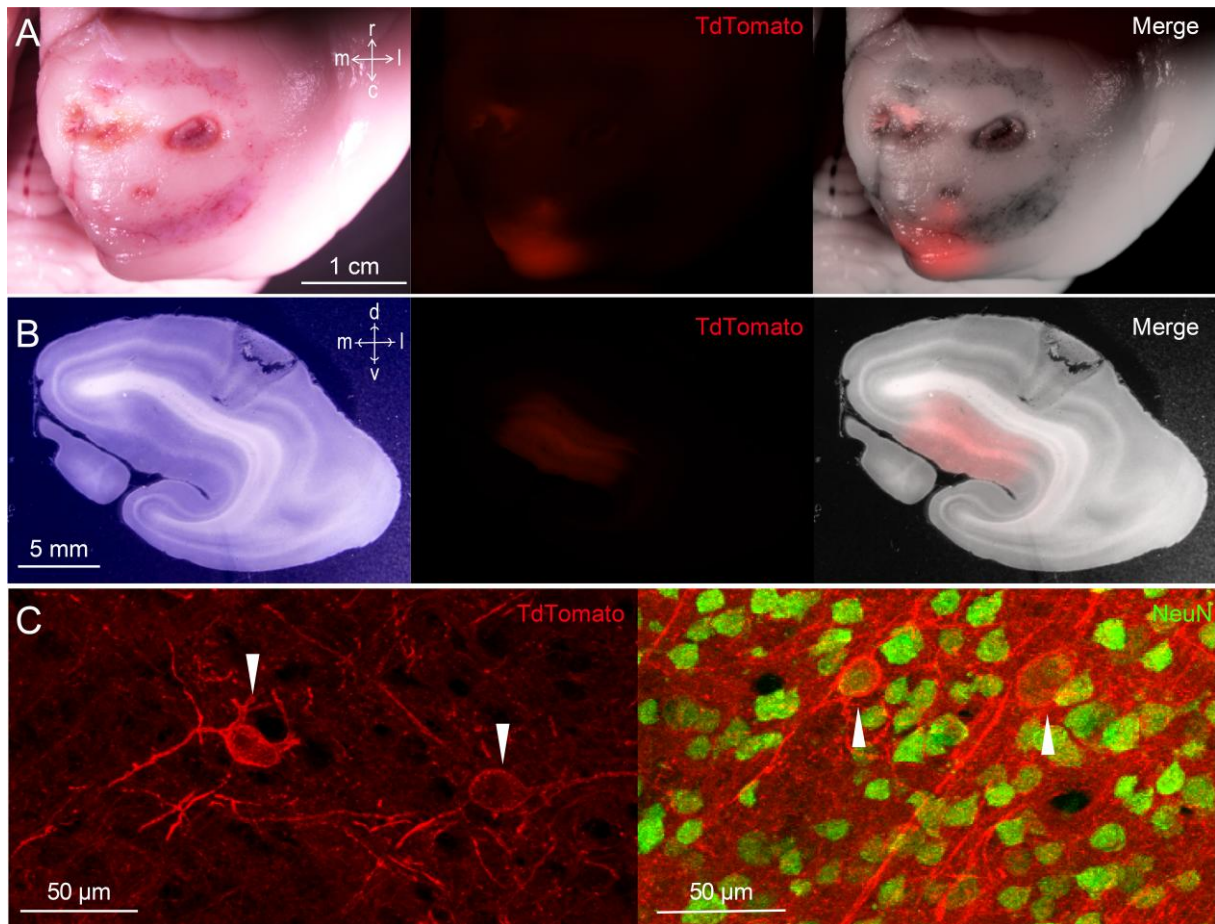


## 2.4.2. Résultats

### 2.4.2.1. Test du vecteur d'expression

Les résultats des chapitres précédents ont démontré l'efficacité du vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato chez le rat et la souris. Nous avons évalué son efficacité chez le primate non-humain sur les animaux A et E. Le vecteur viral a été injecté dans le cortex visuel primaire droit d'un premier animal, le singe A (*Macaca mulatta*, voir Méthodes). Deux mois après injection, nous avons extrait le cerveau et retiré la dure-mère. Le cortex présentait des dommages au niveau des trois zones correspondant aux craniotomies effectuées lors des injections (Fig. 21 A et B). L'origine de ces dommages n'est pas certaine : il peut s'agir d'une surpression due au ciment chirurgical déposé en surface des tracks d'injection afin de recouvrir ces derniers ou d'un dommage provoqué par l'arrachement de la dure-mère au niveau de ces zones plus fragilisées (voir Méthodes). Néanmoins, l'expression de MscL-G22S est détectable sur cerveau entier au niveau de deux des tracks d'injection (Fig. 21 A). Dans le cas du track le plus caudal, la zone d'expression est légèrement plus postérieure qu'anticipé. L'injection étant tangente à la surface du cortex, une explication possible est que le vecteur d'expression a diffusé dans la direction caudale. Nous avons par la suite effectué des coupes coronales de V1 (Fig. 21 B). 67 coupes (soit 3.35 mm selon l'axe antéropostérieur) présentent un signal tdTomato indiquant l'expression de ChromsonR. L'exemple représentatif correspond à un plan situé à 21 mm de la ligne reliant les barres d'oreille sur le cadre stéréotaxique (Ear Bar Zero, EBZ) dans la direction caudale. Le site d'injection le plus profond était de 2.5 mm depuis la surface corticale (voir Méthodes). Les résultats montrent que l'expression de MscL-G22S est visible mais située dans une zone de V1 bien plus ventrale qu'attendue. L'explication la plus probable est que l'origine de l'axe vertical des coordonnées des injections a été déterminée plus bas que sa position théorique qui correspond au niveau de la surface corticale. Enfin, l'imagerie des coupes au microscope confocal permet de voir que des corps cellulaires montrent bien l'expression de MscL-G22S dans leur membrane cellulaire (Fig. 21 C, image de gauche). Ces derniers co-localisent avec le marquage NeuN, ce qui confirme que ces cellules sont des neurones (Fig. 21 C, image de droite).

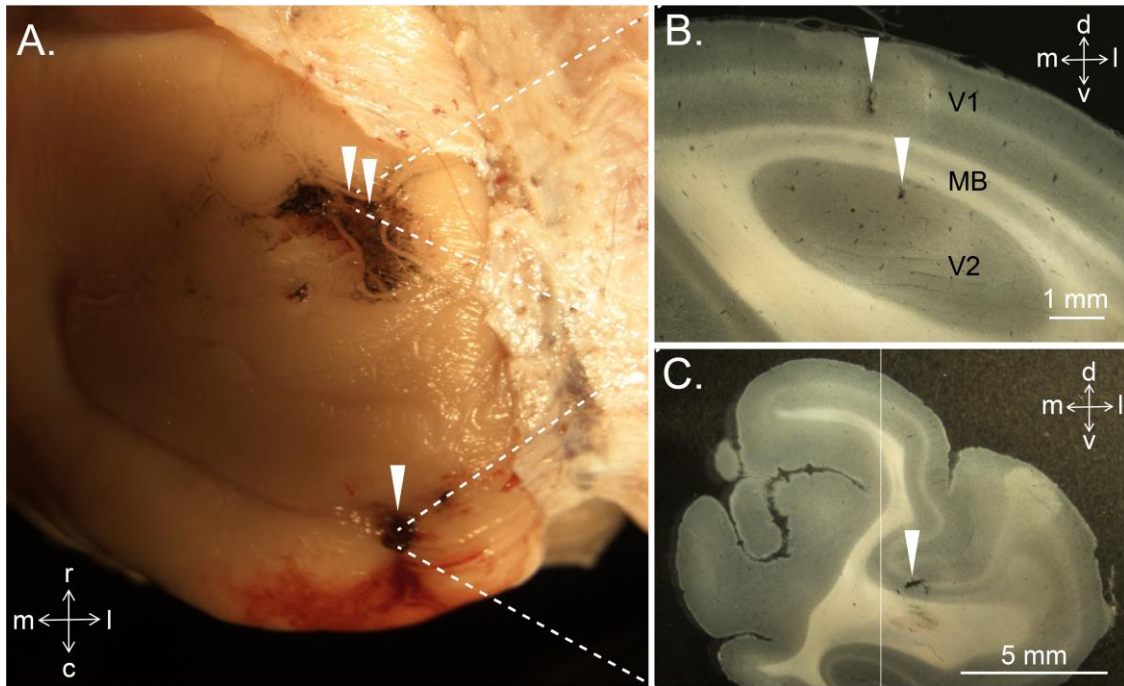
Ces premiers résultats chez le singe A montrent que le vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato permet bien une expression de MscL-G22S au sein des neurones de V1 chez le macaque rhésus. Pour confirmer ce résultat, un second animal a été injecté tout en raffinant nos procédures expérimentales pour limiter les lésions du cortex.



**Figure 21. Expression de MscL-G22S au sein des neurones de V1 obtenue chez le singe A.** A. Vue générale du cortex visuel primaire droit et de la localisation des zones d'expression de MscL-G22S après coupe au microtome. B. Exemple de coupe coronale (située 21 mm en caudal depuis l'EBZ). L'expression de MscL-G22S est plus ventrale qu'attendu. C. Détails d'images confocales de coupe, grossissement 20X. Image de gauche : exemples de corps cellulaires exprimant MscL-G22S. Image de droite : Le marquage NeuN confirme la nature neuronale des corps cellulaires. M : médian. L : latéral. R : rostral. C : caudal. D : dorsal. V : ventral.

Nous avons injecté un deuxième animal (singe Z) pour tester un protocole différent d'injection et d'extraction du cerveau de l'animal (voir Méthodes). Le but est ici d'obtenir des coupes non endommagées et de vérifier que nous pouvons cibler les bonnes couches corticales. Nous avons donc décidé d'injecter de l'encre de Chine et non pas notre vecteur viral. Pour ce test, nous n'avons pas appliqué de ciment chirurgical pour recouvrir les tracks après injections et nous n'avons pas retiré la dure-mère du cerveau après extraction. Pour ce singe, deux tracks distants de 0.5 mm ont été injectés au niveau du cortex visuel primaire gauche, ainsi que deux autres tracks distants de 1.5 mm situés plus en postérieur. Après extraction et fixation, le cerveau ne présente pas de dommages tissulaires visibles, ni en aspect général (Fig. 22, A) ni sur les coupes coronales (Fig. 22, B et C). Les coupes coronales exemples correspondent à deux plans situés à 15 et 22 mm de la ligne reliant les

barres d'oreille sur le cadre stéréotaxique (Ear Bar Zero, EBZ) dans la direction caudale, respectivement. Elles recourent les deux zones d'injections. Les résultats montrent que l'encre de Chine est bien située dans les profondeurs où les injections ont été faites sans reflux (voir Méthodes). Ces résultats permettent de valider ce protocole.



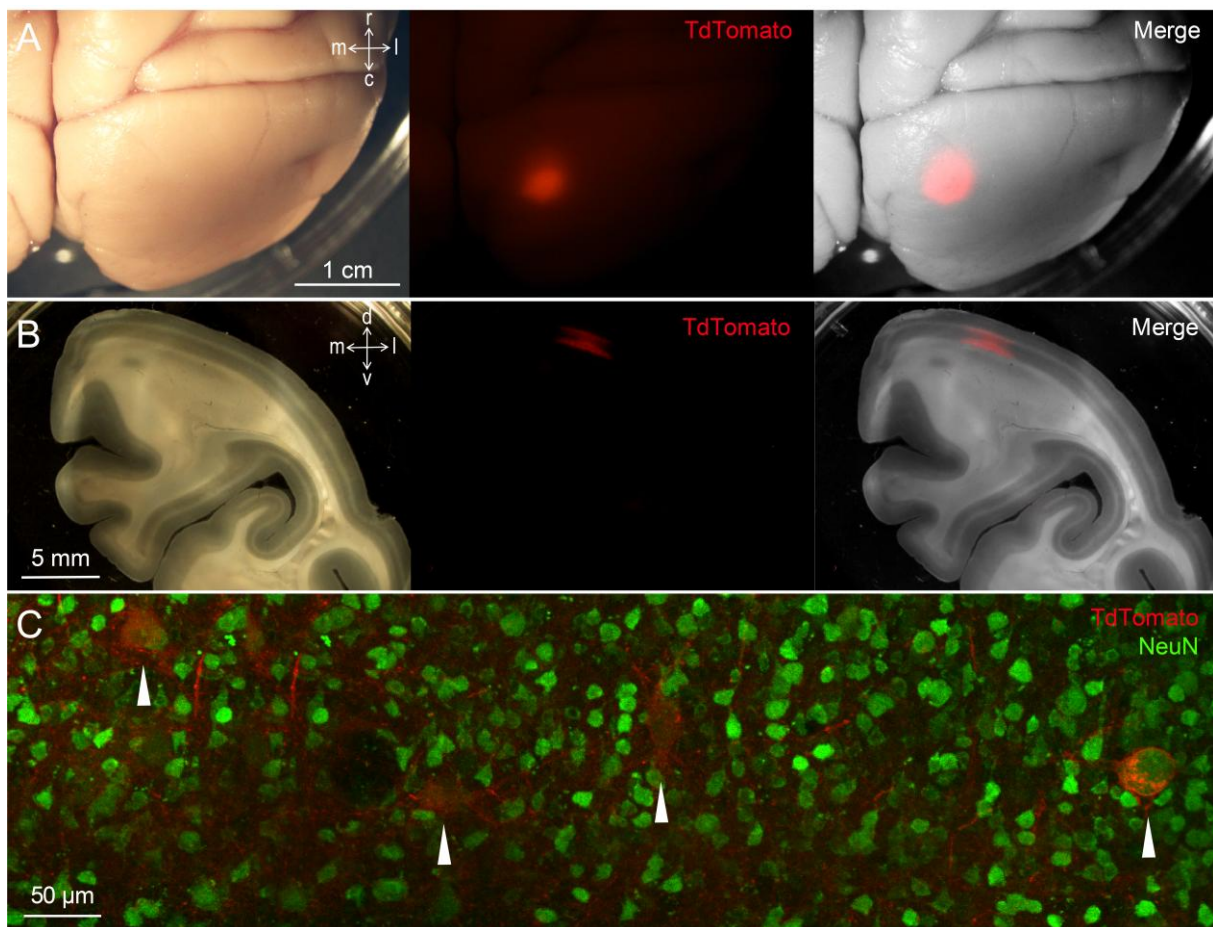
**Figure 22. Localisation de l'encre de Chine injectée chez le singe Z.** **A.** Vue générale du cortex visuel primaire gauche. Les tracks d'injection sont indiqués par les flèches blanches. La pigmentation noire en surface est due à un reflux de l'encre de Chine lors des injections. La dure-mère (structure opaque blanche visible sur la partie droite de l'image) est délicatement ouverte après extraction et fixation du cerveau : aucun dommage tissulaire est apparent. **B.** Exemple de coupe coronale recoupant les injections les plus rostrales (située 15 mm en caudal depuis l'EBZ). Les flèches pointent vers la localisation de l'encre de Chine. **C.** Exemple de coupe coronale recoupant les injections les plus caudales (située 22 mm en caudal depuis l'EBZ). Les flèches pointent vers la localisation de l'encre de Chine. M : médian. L : latéral. R : rostral. C : caudal. D : dorsal. V : ventral.

Nous avons donc injecté un troisième animal, le singe E, en conservant les modifications des protocoles d'injection et d'extraction du cerveau validées précédemment. Pour ce singe, deux tracks distants de 1 mm ont été injectés au niveau du cortex visuel primaire droit. Chez cet animal, les résultats montrent aussi qu'après extraction et fixation, le cerveau ne présente pas de dommages tissulaires visibles, ni en aspect général (Fig. 23 A) ni sur les coupes coronales (Fig. 23 B). 96 coupes (soit 4.8 mm selon l'axe antéropostérieur) présentent un signal tdTomato indiquant l'expression de ChrimsonR. La coupe coronale exemple correspond à un plan situé à 14 mm de la ligne reliant les barres d'oreille sur le cadre stéréotaxique (Ear Bar Zero, EBZ) dans la direction caudale. Les résultats montrent



que la zone d'expression est bien située dans les plis supérieurs de V1 comme attendu. De plus, la zone d'expression résultant des deux tracks d'injection présente une largeur de 3.5 mm. Enfin, les images confocales confirment aussi chez cet animal la co-localisation du marquage MscL-G22S et de NeuN.

En conclusion, nous avons donc confirmé chez deux animaux l'efficacité du vecteur AAV9-7m8-CamKII-MscL-G22S-tdTomato à transduire efficacement les neurones du cortex visuel chez le macaque rhésus. Nous avons de plus réussi à raffiner nos procédures pour éviter toute lésion du cortex et cibler plus précisément la zone d'expression de MscL-G22S.



**Figure 23. Expression de MscL-G22S au sein des neurones de V1 obtenue chez le singe E.** **A.** Vue générale du cortex visuel primaire droit et de la localisation des zones d'expression de MscL-G22S après avant découpe au microtome. **B.** Exemple de coupe coronale (située 14 mm en caudal depuis l'EBZ). L'expression de MscL-G22S est localisée au niveau des replis supérieurs de V1 comme attendu. **C.** Image confocale de coupe, grossissement 20X : exemples de corps cellulaires exprimant MscL-G22S. Le co-marquage NeuN confirme la nature neuronale des corps cellulaires. M : médian. L : latéral. R : rostral. C : caudal. D : dorsal. V : ventral.

#### 2.4.2.2. Tâche de détection



En parallèle du test du vecteur AAV9-7m8-CaMKII-G22S-tdTomato, nous avons entraîné deux macaques rhésus et un macaque fascicularis (L, U et F) à réaliser une tâche de détection de cibles visuelles présentées en périphérie (Fig. 24, A). Les animaux doivent réaliser des saccades visuelles depuis le point central de l'écran vers la cible visuelle présentée pour recevoir une récompense. Les cibles visuelles sont des disques de 2 DVA contenant un grating composé de l'alternance de teintes sombres et claires. Ces teintes sont variables. Nous avons défini pour chaque condition le contraste de la cible comme étant le contraste de Michelson entre la teinte du fond d'écran et la teinte de couleur la plus éloignée (voir Méthodes). Au cours d'une même séance, la cible occupe aléatoirement deux places symétriques par rapport au point central.

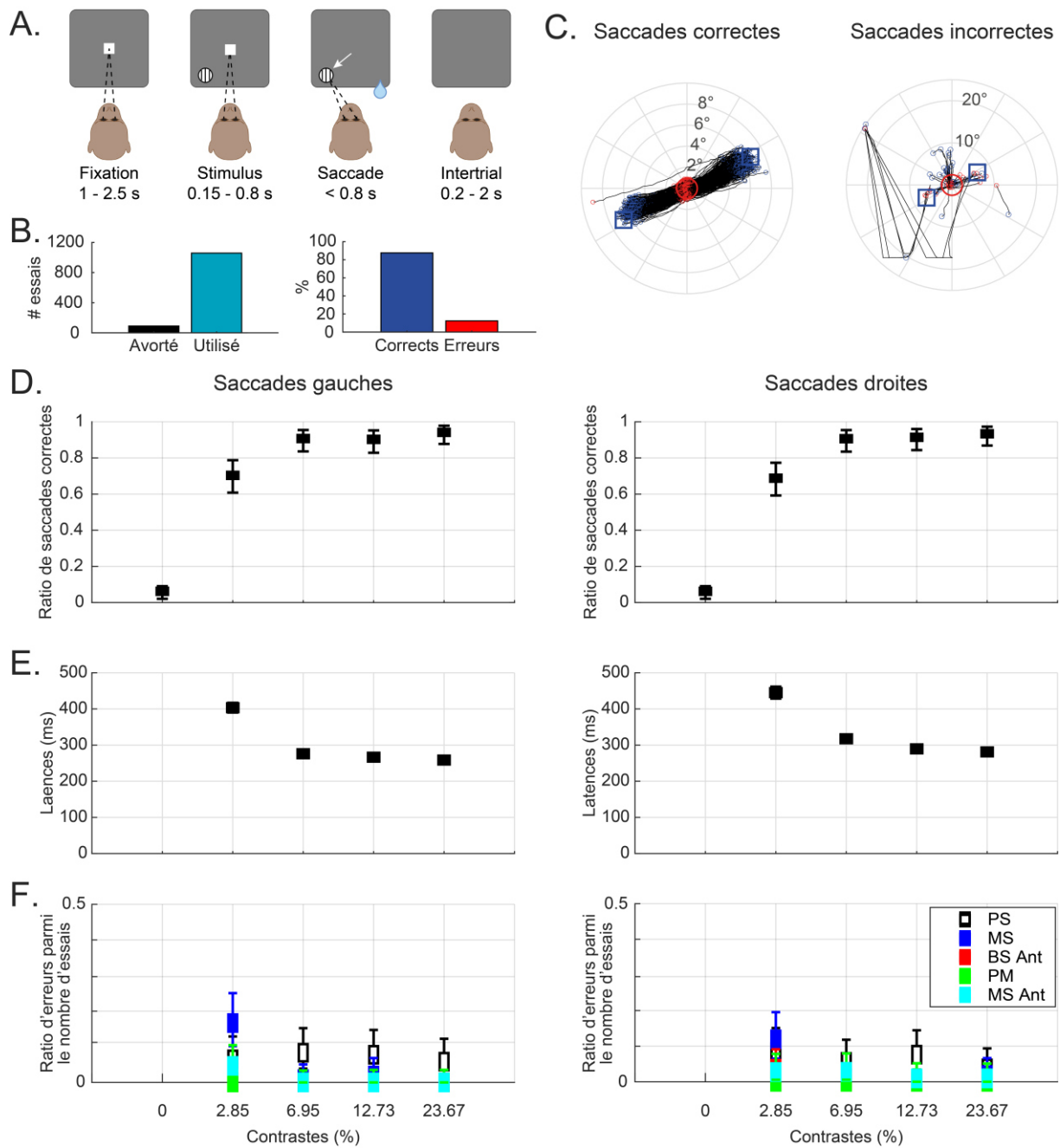
La figure 22 représente les performances d'une séance exemple réalisée par le singe L. Le nombre total d'essais de cette séance est 1149, dont seulement 90 sont avortés, c'est-à-dire que l'animal n'a pas initié la fixation du point central. Au sein des 1059 essais restants, le taux de succès est de 87.6% (Fig. 24, B). Le panel C représente les traces des yeux pour tous les essais corrects d'une séance quotidienne exemple montrent bien la réalisation des saccades depuis le centre du champ visuel vers les deux positions où la cible visuelle peut apparaître (coordonnées polaires,  $R = 8\ 9443$  DVA et  $\theta = 0.4636$  ou  $0.4636 + \pi$  rad). Les traces des yeux pour les saccades initiées dans une mauvaise direction confirment qu'elles ne sont pas dirigées vers ces deux positions de la cible visuelle. De plus, ces traces ne montrent pas de biais vers une trajectoire particulière.

Le panel D montre la probabilité des saccades correctes effectuées en fonction du contraste de la cible. Les résultats pour les saccades effectuées vers la position de la cible dans l'hémi-champ visuel gauche montrent une courbe psychométrique des performances en fonction du contraste : la probabilité des saccades correctes augmente avec le contraste. De même, les résultats pour les saccades effectuées vers la position de la cible dans l'hémi-champ visuel droit montrent aussi une augmentation de la probabilité des saccades correctes avec le contraste.

D'autre part, les latences d'exécution des saccades visuelles (calculées à partir de la disparition du point de fixation qui correspond au signal d'exécution de la saccade) montrent une décroissance avec le contraste, ce qui corrobore la forme des courbes psychométriques décrites précédemment. Les valeurs de latences moyennes extrêmes sont de 403 ms et 258 ms pour les saccades gauches, et de 445 ms et 281 ms pour les saccades droites (Fig. 24, E).

Nous avons examiné le type d'erreurs qu'effectue l'animal lors des essais où il n'obtient pas de récompenses (Fig. 24, F). Plusieurs types d'erreurs peuvent se produire : l'animal peut ne pas faire de saccade (PS, pas de saccade) et continuer à fixer le centre de l'écran ; il peut exécuter une saccade non anticipée dans une mauvaise direction (MS) ; il

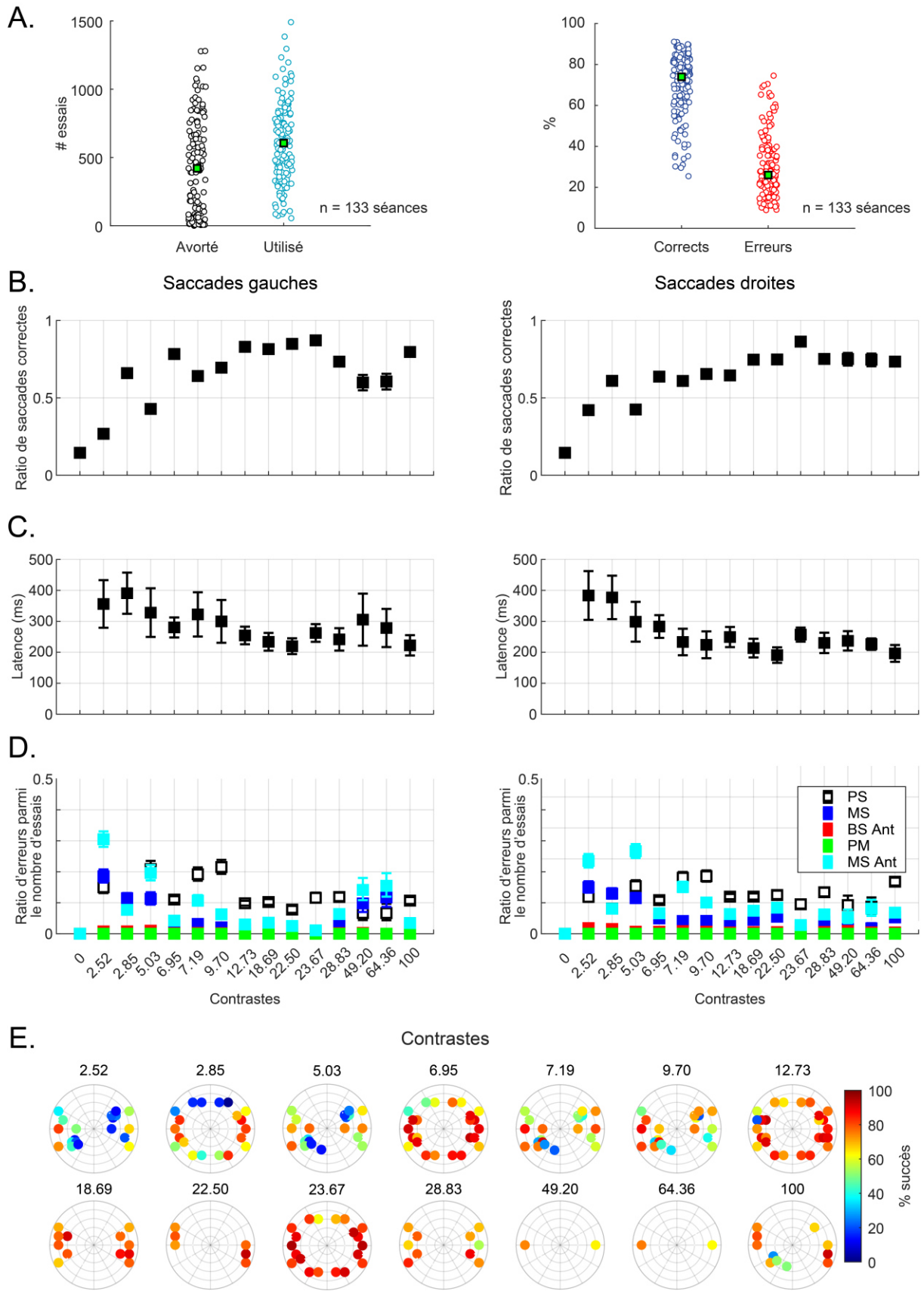
peut exécuter une saccade anticipée (latence inférieure à 100 ms) dans la bonne (BS Ant.) ou mauvaise direction (MS Ant.) lorsque la cible visuelle apparaît mais que le point de fixation n'a pas encore disparu ; enfin, il peut correctement exécuter la saccade mais dégager trop rapidement son regard de la cible (PM, pas de maintien du regard). Le panel F montre la distribution de ces cinq types d'erreur en fonction des contrastes. Logiquement, les résultats montrent que moins la performance par contraste est bonne, plus le pourcentage cumulé d'essais incorrects est important. D'autre part, les résultats montrent que pour les contrastes faibles, ce sont surtout les mauvaises saccades qui constituent la plus grande source d'erreurs. L'absence d'exécution de saccades constitue aussi une source d'erreurs importante pour cet animal.



**Figure 24. Performances du singe L pour une séance exemple de la tâche de détection de cibles visuelles.** **A.** Description de la tâche de détection. L'animal initie un essai en fixant un point central (Fixation), ce qui entraîne l'apparition d'une cible visuelle en périphérie (Stimulus). La disparition du point central autorise l'animal à effectuer une saccade vers la cible (Saccade). Une bonne exécution de saccade est récompensée par la délivrance d'une récompense. Les cibles possèdent des contrastes variables et prennent aléatoirement deux positions symétriques par rapport au point central. **B.** Répartitions des essais utilisés et des essais corrects. **C.** Traces des saccades correctement effectuées et effectuées dans une mauvaise direction. **D.** Probabilité de saccades correctes en fonction du contraste pour les saccades gauches et droites. **E.** Latences des saccades correctes en fonction du contraste. **F.** Distribution des types d'erreurs sur l'ensemble des essais pour chaque contraste pour les saccades gauches et droites. PS : Pas de Saccade (fixation du point central). MS : Mauvaise Saccade (saccade dans une direction autre que la cible). BS Ant : Bonne Saccade Anticipée. MS Ant : Mauvaise Saccade Anticipée. PM : Pas de Maintien du regard dans la cible visuelle

Nous avons par la suite regroupé les résultats obtenus sur l'ensemble des séances, animal par animal, afin de déterminer la significativité des courbes psychométriques illustrées précédemment.

La figure 25 illustre l'ensemble de ces résultats pour le même singe L. Le panel A illustre la répartition du nombre d'essais avortés et utilisés pour chaque séance (médianes : 428 et 610 essais, respectivement), ainsi que la distribution des pourcentages d'essais corrects et d'erreurs parmi les essais utilisés (médianes, 74% et 26%, respectivement). Les ratios moyens de saccades correctes (Fig. 25, B) sont calculés sur l'ensemble des séances effectuées ( $n=133$ ). De plus, les définitions de contraste ayant varié en fonction des séances, le nombre d'essais cumulés diffère entre les contrastes présentés ici ( $375 \leq n \leq 16206$ ). Les résultats montrent que le ratio des saccades correctes augmente significativement avec le contraste pour les saccades gauches (test de Kruskal-Wallis,  $p = 1.4698.10^{-66}$ ) ainsi que pour les saccades droites (test de Kruskal-Wallis,  $p = 9.3693.10^{-57}$ ). D'autre part, les latences d'exécution des saccades visuelles (Fig. 25, C) montrent une décroissance significative avec le contraste (test de Kruskal-Wallis pour les latences des saccades à gauche,  $p = 0$ ; test de Kruskal-Wallis pour les latences des saccades à droite,  $p = 0$ ), ce qui corrobore la forme des courbes psychométriques décrites précédemment. Les valeurs de latences moyennes extrêmes sont de 391 ms et 220 ms pour les saccades gauches, et de 383 ms et 191 ms pour les saccades droites). Enfin, concernant la répartition des erreurs (Fig. 25, D), les résultats globaux montrent aussi une diminution de la performance avec la diminution des contrastes. D'autre part, les résultats montrent que pour les contrastes faibles, ce sont surtout les mauvaises saccades, majoritairement anticipées, qui constituent la plus grande source d'erreurs. L'absence d'exécution de saccades constitue aussi une source d'erreurs importante pour cet animal. Enfin, nous avons analysé le taux de saccades correctes en fonction de la localisation de la cible pour chacun des contrastes testés (Fig. 25, E). Le nombre de localisations testées par contraste (44 au total) n'est pas constant ce qui explique la différence du nombre de cibles présentées pour chaque condition. De même, le pourcentage de succès calculé pour chaque cible l'est pour l'ensemble des essais cumulés pour la condition donnée (contraste et localisation). Le nombre moyen d'essais par condition est de 382 avec une grande variabilité (les extrêmes étant 9 et 7924 essais par condition). Les résultats montrent que le pourcentage de succès diminue avec le contraste quelle que soit la localisation. De plus, pour un même contraste, les performances pour les saccades exécutées vers des cibles proches de l'axe vertical sont légèrement moins bonnes que celles concernant les saccades exécutées vers des cibles placées sur ou proches de l'axe horizontal.

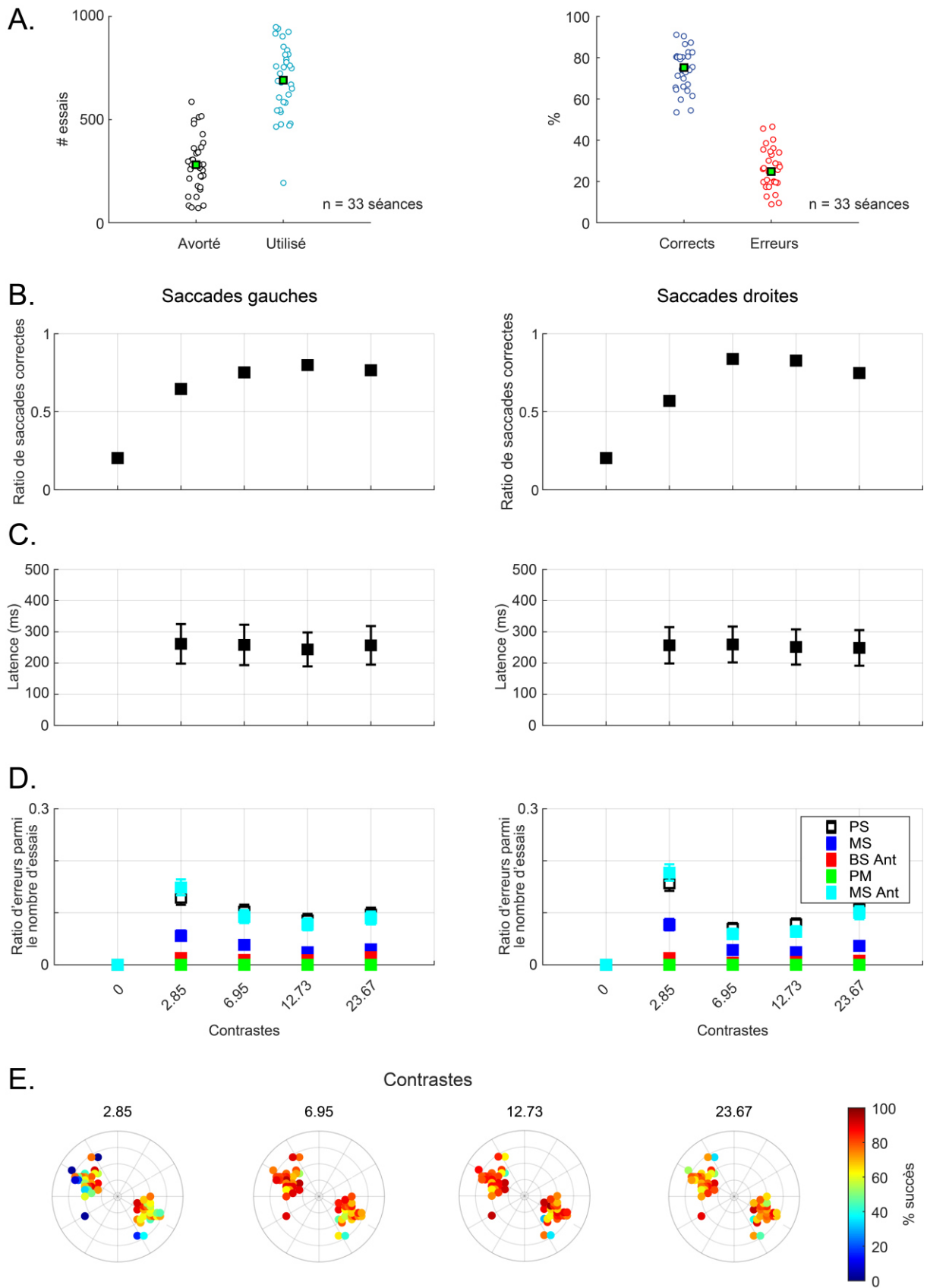


**Figure 25. Performances du singe L pour la tâche de détection de cibles visuelles. A.** Distribution du nombre d'essais avortés et utilisés. Panel de droite : distribution du

pourcentage d'essais corrects et du pourcentage d'erreurs. **B.** Ratio de saccades correctes **C.** Latences des saccades correctes **D.** Distribution des types d'erreurs sur l'ensemble des essais cumulés ( $375 \leq n \leq 16206$ ) pour chaque contraste pour les saccades gauches (colonne de gauche) ou droites (colonne de droite). PS : Pas de Saccade (fixation du point central). MS : Mauvaise Saccade (saccade dans une direction autre que la cible). BS Ant : Bonne Saccade Anticipée. MS Ant : Mauvaise Saccade Anticipée. PM : Pas de Maintien du regard dans la cible visuelle. **E.** Détails du ratio de saccades correctes en fonction du contraste et de la localisation des cibles visuelles sur l'ensemble des essais cumulés concernés ( $9 \leq n \leq 7924$ ). Le cercle concentrique extérieur a un rayon de 10 DVA.

Nous avons réalisé les mêmes analyses pour les singes U et F (Fig. 26 et 27). Les nombres médians d'essais avortés et utilisés sont de 281 et 691 pour le singe F et de 377 et 994 pour le singe U, respectivement (panels A). Les pourcentages médians d'essais corrects sont 75 et 25% pour le singe F et de 67 et 33% pour le singe U, respectivement. Les courbes psychométriques (panels B), montrent pour ces deux autres animaux une augmentation de la performance avec le contraste. Pour ces deux singes, moins de contrastes ont été testés pour ces deux animaux par rapport au singe L, cependant le nombre d'essais est moins variable entre les conditions ( $2125 \leq n \leq 4529$  pour le singe F,  $2660 \leq n \leq 5414$  pour le singe U). Les résultats montrent pour ces deux autres animaux une augmentation de la performance avec le contraste (test de Kruskal-Wallis,  $p = 3.57.10^{-17}$  et  $p = 3.35.10^{-18}$  pour les saccades gauches et droites, respectivement, pour le singe F ; test de Kruskal-Wallis,  $p = 6.81.10^{-13}$  et  $p = 2.34.10^{-11}$  pour les saccades gauches et droites, respectivement, pour le singe U). Pour le singe F, les latences d'exécution des saccades ne diminuent pas avec le contraste contrairement à ce qui est observé chez le singe L (panels C, test de Kruskal-Wallis,  $p = 0.18$  et  $p = 0.09$  pour les saccades gauches et droites, respectivement). Cependant, c'est le cas chez le singe U (test de Kruskal-Wallis,  $p = 1.54.10^{-237}$  et  $p = 9.5.10^{-236}$  pour les saccades gauches et droites, respectivement). La répartition des types erreurs (panels D) montrent aussi chez ces deux animaux une prépondérance des mauvaises saccades, anticipées et non-anticipées, qui augmente lorsque le contraste diminue, et d'absence d'exécution de saccades, en particulier pour le singe U.

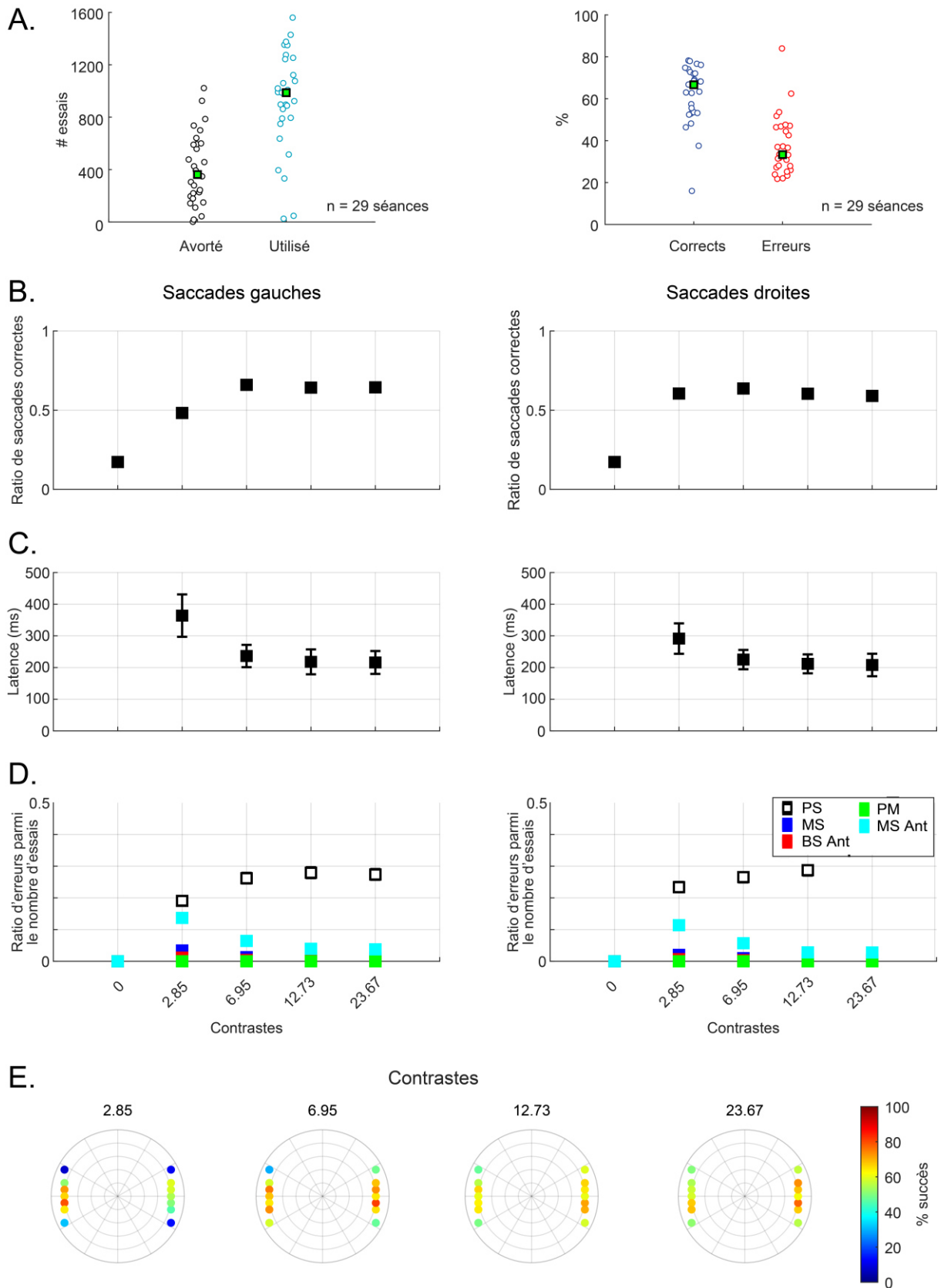
Enfin, nous avons aussi détaillé le taux de succès par contraste en fonction de la localisation de la cible visuelle (panels E). Pour le singe F, 54 localisations différentes ont été testées. Le nombre moyen d'essais par condition est de 101 (avec des extrêmes entre 18 et 513 essais). Les résultats montrent bien une diminution du succès avec le contraste pour chaque position testée, et ce d'autant plus que la cible visuelle occupe une position excentrée. Pour le singe U, le nombre moyen d'essais par condition est de 460 (avec des extrêmes entre 93 et 3196 essais).



**Figure 26. Performances du singe F pour la tâche de détection de cibles visuelles. A.** Distribution du nombre d'essais avortés et utilisés. Panel de droite : distribution du pourcentage d'essais corrects et du pourcentage d'erreurs. **B.** Ratio de saccades correctes.



**C.** Latences des saccades correctes. **D.** Distribution des types d'erreurs sur l'ensemble des essais cumulés ( $2125 \leq n \leq 4529$ ) pour chaque contraste pour les saccades gauches (colonne de gauche) ou droites (colonne de droite). **E.** Détails du ratio de saccades correctes en fonction du contraste et de la localisation des cibles visuelles sur l'ensemble des essais cumulés concernés ( $18 \leq n \leq 513$ ). Le cercle concentrique extérieur a un rayon de 20 DVA.



**Figure 27. Performances du singe U pour la tâche de détection de cibles visuelles. A.** Distribution du nombre d'essais avortés et utilisés. Panel de droite : distribution du pourcentage d'essais corrects et du pourcentage d'erreurs. **B.** Ratio de saccades correctes.

**C.** Latences des saccades correctes. **D.** Distribution des types d'erreurs sur l'ensemble des essais cumulés ( $2660 \leq n \leq 5414$ ) pour chaque contraste pour les saccades gauches (colonne de gauche) ou droites (colonne de droite). **E.** Détails du ratio de saccades correctes en fonction du contraste et de la localisation des cibles visuelles sur l'ensemble des essais cumulés concernés ( $93 \leq n \leq 3196$ ). Le cercle concentrique extérieur a un rayon de 10 DVA.

L'ensemble de ces résultats démontre un apprentissage correct de la tâche de détection pour ces conditions contrôles visuelles, chez 3 animaux différents.

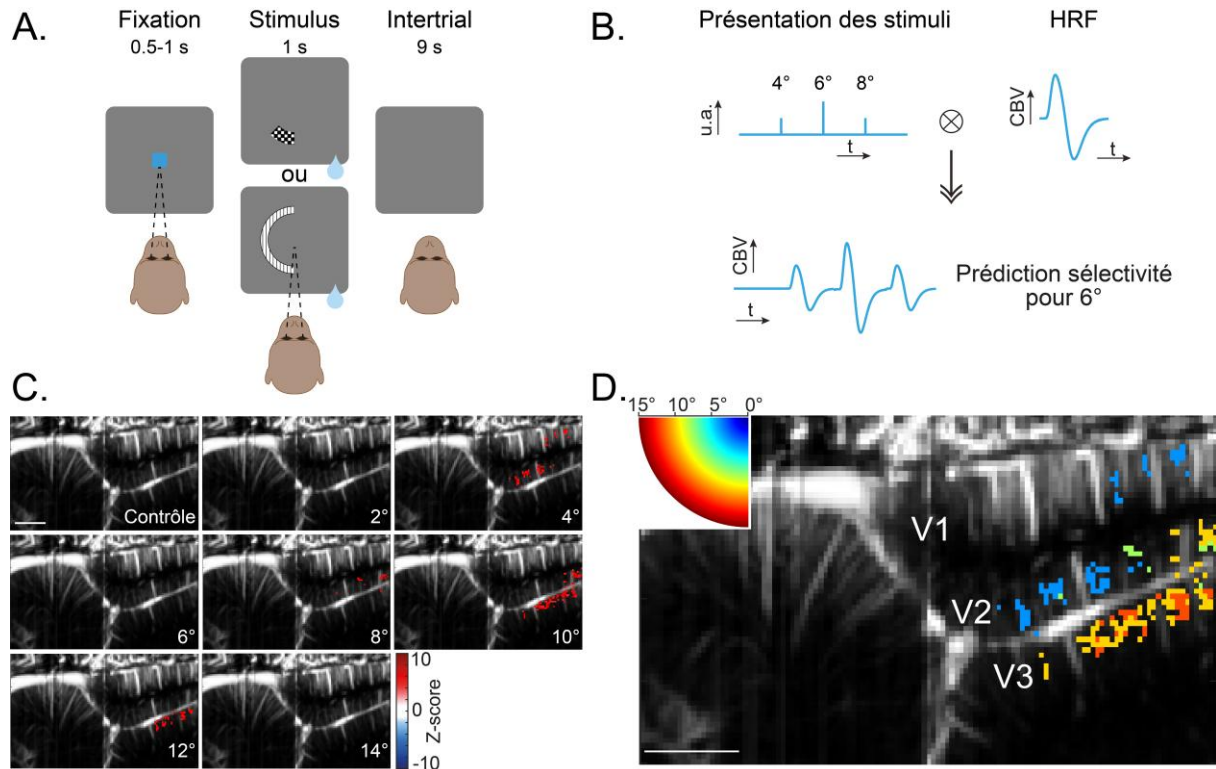
### 2.4.2.3. Rétinotopie du cortex visuel

Pour démontrer qu'un animal entraîné perçoit une stimulation sonogénétique comme un phosphène visuel, la cible visuelle présentée lors de la tâche de détection doit être remplacée par une stimulation sonogénétique ciblant un groupe de neurones dont le champ récepteur est localisé dans cette zone du champ visuel. Ceci implique donc de connaître la rétinotopie du cortex visuel primaire dans la chambre d'enregistrement.

Nous avons donc réalisé cette rétinotopie grâce à l'imagerie ultrasonore chez le singe L possédant une chambre d'enregistrement.

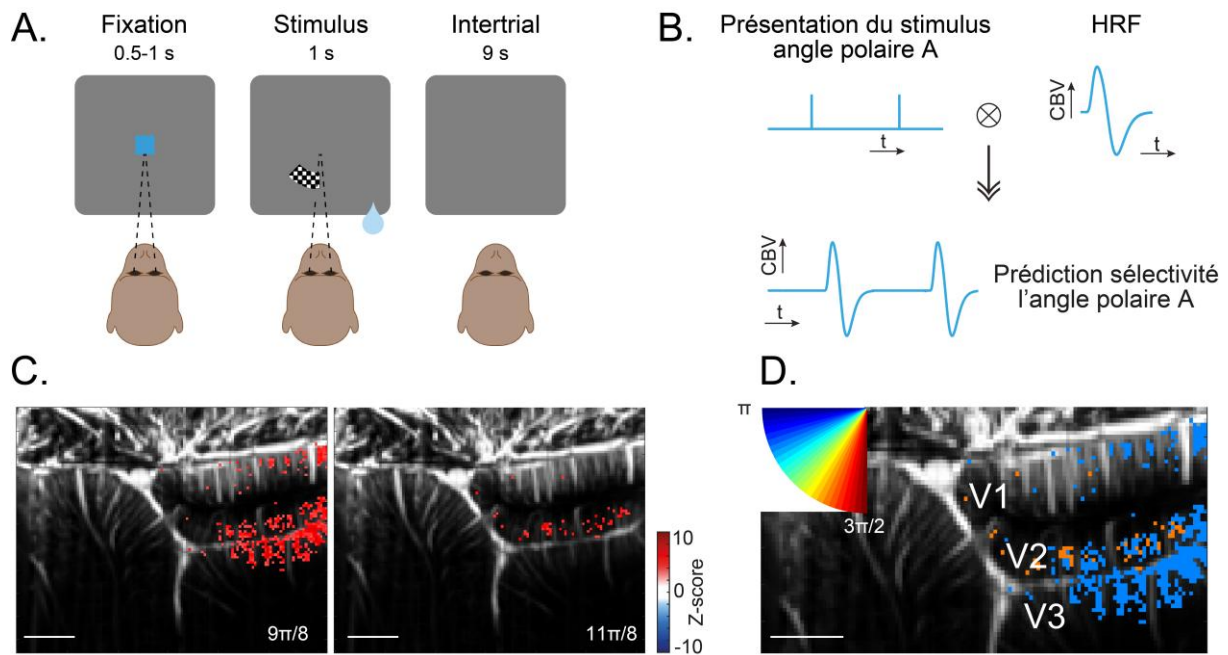
Pour réaliser ces cartes, l'animal exécute une tâche de fixation passive (voir Méthodes). Pour déterminer la sélectivité à l'excentricité, nous avons utilisé deux protocoles différents (Fig. 28, A). Dans le premier protocole, les stimuli visuels sont des arcs de cercle de 2.5 DVA de large et d'envergure fixe de  $\pi/8$  radians. Ces arcs de cercle occupent quatre excentricités différentes (entre 2.5 et 10 DVA pour la bordure extérieure) et deux angles polaires différents (entre  $\pi$  et  $5\pi/4$  radians pour le segment supérieur de l'arc de cercle) au sein du quart inférieur gauche de l'écran. Dans le deuxième protocole, les stimuli visuels sont des demi-cercles de 2 DVA de large occupant aléatoirement toutes les positions espacées de 2 DVA entre 2 DVA et 14 DVA dans la moitié gauche de l'écran. Pour les deux protocoles, chaque condition est présentée au minimum  $n=10$  essais lors d'une séance d'enregistrement. Pour analyser les résultats d'une séance, nous avons utilisé un modèle linéaire généralisé comme expliqué lors du chapitre 2.3. Pour chaque condition, nous avons établi un vecteur d'entrée contenant des valeurs non nulles pour les temps de présentation de cette condition, ainsi que des valeurs deux fois plus basses pour les temps de présentation des excentricités voisines (Fig. 28, B). Nous avons introduit cette subtilité pour refléter la courbe de réponse des neurones à une condition particulière qui n'est pas tout ou rien mais plutôt en cloche. La prédiction de variations de CBV d'un pixel est ensuite confrontée aux données réelles. En répétant ces opérations pixel par pixel, et pour toutes les conditions, nous obtenons une carte d'activation pour chaque excentricité (Fig. 28, C). Pour obtenir la carte rétinotopique d'excentricités préférées pour cette séance exemple, nous

avons ensuite sélectionné tous les pixels apparaissant significatifs sur au moins une carte d'activation à une condition. Pour chacun de ces pixels, le code couleur indique l'excentricité présentant le Z-score le plus élevé.



**Figure 28. Méthode pour l'obtention de la carte d'excentricités préférées pour une séance d'enregistrement.** **A.** Protocoles utilisés. **B.** Modèle linéaire généralisé utilisé. **C.** Cartes d'activation pour chaque condition. La condition contrôle correspond à une absence de stimulus. **D.** Carte d'excentricité préférée résultante : chaque couleur de pixel indique la condition pour laquelle le Z-score maximal est obtenu. Les barres d'échelles représentent 2 mm.

Pour déterminer la sélectivité aux angles polaires pour une séance d'enregistrement (Fig. 29), nous avons utilisé le premier des deux protocoles décrits plus tôt. En regroupant les conditions par angle polaire, seuls deux angles sont testés. Nous avons donc utilisé un modèle linéaire généralisé ne faisant intervenir que les temps de présentation de l'angle considéré dans le vecteur d'entrée (Fig. 29, B). De la même manière, nous obtenons ainsi deux cartes d'activation spécifiques de ces conditions (Fig. 29, C) et la carte rétinotopique de sélectivité aux angles polaires finale (Fig. 29, D).



**Figure 29. Méthode pour l'obtention de la carte d'angles polaires préférés pour une séance d'enregistrement. A.** Protocole utilisé. **B.** Modèle linéaire généralisé. **C.** Cartes d'activation pour chaque condition. La condition contrôle correspond à une absence de stimulus. **D.** Carte d'angles polaires résultante : chaque couleur de pixel indique la condition pour laquelle le Z-score maximal est obtenu. Les barres d'échelle représentent 2 mm.

Par la suite, nous avons répété ces séances d'enregistrement sur différents plans d'imagerie. Des adaptateurs de la sonde d'imagerie ultrasonore nous ont permis de cibler de manière reproductible sept plans différents (Fig. 30, A), et d'obtenir des cartes de sélectivité aux excentricités (Fig. 30, B) et aux angles polaires (Fig. 30, C) moyennes. Le sens des flèches bleues sur le panel A est identique à celui des panels B et C ce qui permet de situer les cartes rétinotopiques selon les axes rostro-caudal et médio-latéral.

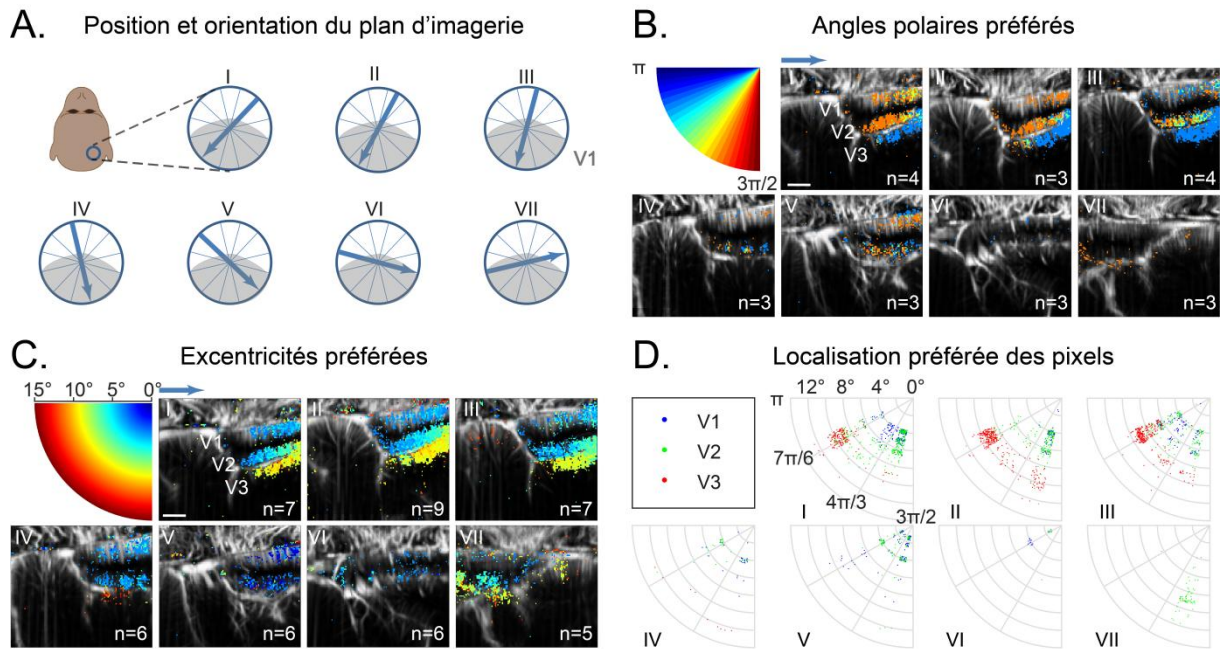
Pour les plans I à VI, V1 constitue la couche la plus superficielle de la moitié droite du cadre d'imagerie. V2 constitue la couche située immédiatement en-dessous. Enfin, V3 est présent sur les plans I à IV et correspond à la zone située en-deçà de V2 (Fig. 30, B et C). Pour le plan VII, V1 et V2 sont situés sur la moitié gauche du cadre d'imagerie.

Les cartes d'angles polaires préférés des plans d'imagerie I et II montrent une segmentation nette de la spécificité entre V1 / V2 d'une part dont les pixels sont majoritairement spécifiques d'un angle de  $11\pi/8$  radians et V3 d'autre part dont les pixels sont spécifiques d'un angle de  $9\pi/8$  radians. Sur le plan III, les zones imagées de V1 à V3 sont plus occipitales et latérales. Les résultats montrent une plus grande diversité de spécificité d'angles polaires pour V1 et V2 mais V3 reste spécifique d'un angle de  $9\pi/8$  radians. Sur les plans IV et V, les zones imagées du cortex visuel sont plus rostrales et latérales. V1 et V2 n'y présentent pas de spécificité homogène dans ces deux couches. Le nombre de pixels colorés est plus réduit, ce qui suggère qu'un plus grand nombre de pixels

ne présentent pas de spécificité pour les conditions présentées. Sur le plan VI, aucune spécificité n'est détectée. Enfin, le plan VII présente une spécificité pour un angle polaire de  $11\pi/8$  radians au sein de V2, comme pour le plan I dont il est voisin.

Concernant les excentricités préférées, l'ensemble des plans d'imagerie montre que V1 présente une spécificité entre 2 DVA et 6 DVA, les plus petites valeurs étant obtenus pour les plans où la partie de V1 imagée est la plus latérale (plans V et VI). Pour les plans I à III et le plan VII qui rendent compte des excentricités préférées pour les zones les plus médianes imagées, les pixels de V2 présentent une spécificité d'excentricité qui augmente progressivement depuis 4 DVA pour les zones les plus latérales jusqu'à 8 DVA pour les zones les plus médianes. De façon cohérente avec ces résultats, les zones de V2 encore plus latérales présentes sur les plans III à VI sont spécifiques d'excentricités encore plus faibles, comprises entre 2 et 6 DVA. Enfin, V3 présente une préférence pour les excentricités les plus élevées (supérieures à 8 DVA).

Enfin, nous avons représenté la position préférée de chaque pixel au sein du champ visuel (Fig. 30, D). Chaque pixel présentant à la fois une spécificité d'angle polaire et une spécificité d'orientation peut être défini par ces deux coordonnées polaires. Les pixels de V1, V2 et V3 sont représentés en bleu, vert et rouge respectivement. Afin de visualiser l'ensemble des points, nous avons introduit une légère variabilité au sein des coordonnées pour éviter d'obtenir des points superposés (voir Méthodes). Les graphiques ainsi obtenus montrent que les cartes rétinotopiques décrites précédemment permettent d'identifier les localisations préférées d'un grand nombre de pixels pour les plans I à III, et dans une moindre mesure pour le plan V comparé aux autres plans. De plus, les plans I et II présentent une ségrégation nette entre la localisation préférée des pixels de V1 / V2 et de V3. Enfin, les pixels de V1 et V2 pour les plans I et III recouvrent une plus grande surface du champ visuel que pour le plan II. L'expression de MscL-G22S dans l'ensemble des régions de V1 et V2 imagées au niveau du plan I permettrait ainsi de pouvoir effectuer des stimuli sonogénétiques locaux dans une zone située entre 4 et 8 DVA d'excentricité et entre des angles polaires de  $9\pi/8$  radians à  $11\pi/8$  radians, où le singe L effectue correctement des saccades (Fig. 25, C).



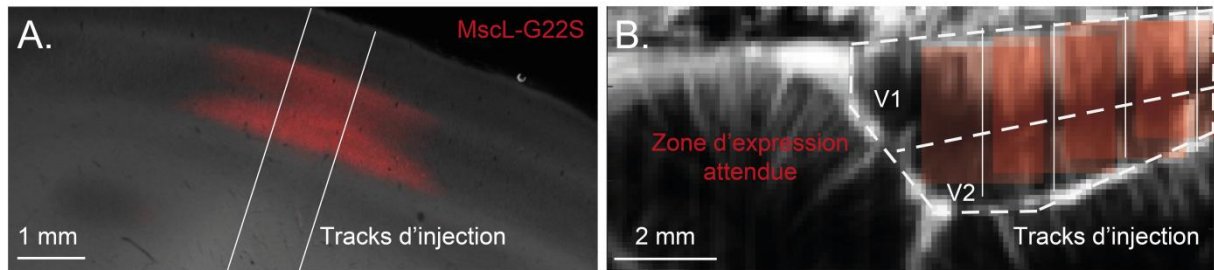
**Figure 30. Cartes rétinotopiques du cortex visuel primaire situé sous la chambre d'enregistrement du singe L.** **A.** Position de la chambre d'enregistrement sur le cortex visuel droit de l'animal. Les agrandis montrent la localisation de chaque plan imagé (en gras). Les flèches pointent vers la droite de chacun des cadres d'imagerie. La position de V1 en surface, calculée d'après les images ultrasonores, est indiquée en gris. **B.** Cartes rétinotopiques moyennes des angles polaires préférés. Le nombre de sessions d'enregistrement est indiqué dans le quart inférieur droit des images. **C.** Cartes rétinotopiques moyennes des excentricités préférées. **(B-C).** Les barres d'échelles représentent 2 mm. Le nombre de sessions moyennées pour chaque carte est indiqué dans le quart inférieur droit. **D.** Projection dans le champ visuel de la position préférée de chaque pixel présentant une spécificité d'angle polaire et d'excentricité.

#### 2.4.2.4. Etablissement d'un plan d'injection du vecteur viral

En se basant sur les résultats des cartes rétinotopiques établies précédemment, nous avons choisi d'exprimer la protéine MscL-G22S au sein de l'ensemble des sections de V1 et V2 imagées dans le plan I.

Les résultats du test du vecteur AAV9-7m8-CaMKII-ChrimsonR-tdT chez le deuxième primate montre que la fusion des sphères d'expression issues par les deux tracks d'injection produit une zone d'expression d'une largeur de 3.5 mm (Fig. 31, A). Compte tenu de l'espacement de 1 mm entre les tracks, ce résultat suggère l'existence d'un rayon d'expression de 1.25 mm autour de chaque track d'injection. Selon cette hypothèse, nous avons choisi quatre tracks d'injection espacés de 1.5 mm chacun afin d'obtenir une expression putative de MscL-G22S dans l'ensemble de V1 et V2 sur le plan I (Fig. 31, B, voir Méthodes).





**Figure 31. Plan d'injection du plan d'imagerie I chez le singe L.** **A.** Expression de MscL-G22S au sein d'une coupe coronale (située 14 mm en caudal depuis l'EBZ). La zone d'expression résultant des deux tracks d'injection est de 3.5 mm de large. **B.** Sur le plan d'imagerie fUS I, la position des quatre tracks d'injection suggère d'obtenir une expression de MscL-G22S dans l'ensemble de V1 et V2.

### 2.4.3. Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté les travaux préparatoires effectués pour tester physiologiquement et de façon comportementale le succès de la stratégie corticale de restauration visuelle sonogénétique.

Nous avons démontré chez deux animaux que le vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdT permet une transduction efficace des neurones de V1 chez le primate non-humain. Une revue détaillant le succès des injections de vecteurs viraux parmi l'ensemble des études d'optogénétique réalisées chez le primate non-humain montre que la capsid AAV9 et le promoteur CaMKII sont associés à une efficacité importante de l'expression du transgène utilisé (Tremblay et al. 2020). Nos résultats sont donc en accord avec la littérature actuelle, bien que nous utilisons ici un variant de la capsid AAV9. Néanmoins la protéine exprimée ici n'est pas une opsine : ces résultats constituent la première démonstration de la possibilité d'exprimer un canal mécanosensible sonogénétique chez le primate non-humain. Enfin, nous avons de plus pu améliorer notre expertise afin de cibler correctement la zone d'expression souhaitée au sein du cortex.

D'autre part, nous avons apporté la preuve que trois animaux sont correctement entraînés à effectuer une tâche de détection de cibles visuelles dans des positions variées du champ visuel. Nous avons pu établir les courbes psychométriques en fonction des différents contrastes utilisés pour chaque animal. Il reste désormais à obtenir les résultats de cette tâche lors de stimulations sonogénétiques seules ou combinées aux mêmes stimulations visuelles.

Enfin, nous avons obtenu des cartes rétinotopiques d'excentricités préférées et d'angles polaires préférés pour sept plans d'imagerie différents au sein de la chambre d'enregistrement d'un premier animal. Ces cartes permettent de compléter la rétinotopie du cortex visuel par imagerie ultrasonore précédemment établie sur un nombre de plans

d'imagerie plus réduit (Blaize et al. 2020). De plus, nous avons pu établir les coordonnées des champs récepteurs pour chaque pixel présentant une sélectivité d'angle polaire et d'excentricités. Grâce à ces informations, nous avons pu identifier une zone où il est pertinent d'exprimer MscL-G22S en regard des performances de cet animal pour la tâche de détection. Ainsi, nous avons injecté le vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdT de manière à obtenir une expression de MscL-G22S dans l'ensemble de la zone de V1 et V2 détectée au sein du plan d'imagerie I. Il reste désormais à apporter une preuve physiologique puis comportementale de l'efficacité de la stimulation sonogénétique.

## 2.4.4. Méthodes

### 2.4.4.1. Animaux utilisés

Toutes les expériences réalisées ont été validées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que par le comité d'éthique de l'Institut du Cerveau au sein du projet APAFIS #9013-2017021515254591.

Pour les tests de vecteurs viraux, nous avons utilisé deux macaques rhésus (*Macaca mulatta*) mâles âgés entre 8 et 15 ans (singes A et E) ainsi qu'un macaque rhésus femelle âgé de 19 ans (singe Z).

Pour les tests comportementaux, nous avons utilisé un macaque rhésus femelle âgée de 12 ans (singe L) ainsi qu'un macaque rhésus et un macaque crabier (*Macaca fascicularis*) mâles âgés de 17 et 11 ans (singes U et F).

### 2.4.4.2. Injection du vecteur AA9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato

Les chirurgies des injections se sont déroulées en conditions stériles.

L'anesthésie des trois animaux A, E, L et Z a été induite par injection d'un mélange kétamine (3 mg/kg) / dexdomitor (0.015 mg/kg) puis relayée par une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (entre 1.5 et 2.5%) lors de la mise en barres d'oreille sur cadre stéréotaxique (Kopf). Les animaux ont été intubés et oxygénés à partir de ce moment-là. Pour assurer l'analgésie, des injections de Buprécare (0.01 mg/kg) et de Solumédrol (0.5 mL/kg) ont été réalisées à l'induction de l'anesthésie puis toutes les 12 h. De plus, les barres d'oreille ont été induites de xylocaïne. Trois injections de Clamoxyl espacées de 48 h à partir de l'induction de l'anesthésie permettent d'assurer une couverture antibiotique. Pour assurer le bien-être des animaux, ces derniers ont été perfusés en intraveineuse par un mélange

glucose 5 % 2/3 et Ringer 1/3 (20 mL/kg/h pendant 1 h puis 10 mL/kg/h). Pour assurer le maintien de la température corporelle, les animaux ont de plus été placés sur un tapis chauffant et bordés par une couverture chauffante. Enfin, les yeux des animaux ont été enduits de Lubrithal pour prévenir d'une sécheresse oculaire. Le crâne des animaux non implanté est rasé, nettoyé au savon puis à la Bétadine.

Les animaux A, E et Z ne possédaient pas de chambre d'enregistrement. Après incision au scalpel, la peau et les muscles sous-jacents sont écartés afin de faire apparaître la portion du crâne protégeant le cortex visuel primaire. Une ou plusieurs petite craniotomies sont ensuite réalisées à l'aide d'une fraiseuse afin d'atteindre la dure-mère.

Pour le singe A, le titre du vecteur viral était de  $7.8 \cdot 10^{15}$  vg/mL (vg = génome viral). Nous avons effectué pour chaque animal trois tracks d'injection au sein du cortex visuel primaire comprenant chacun trois sites d'injection espacées de 500  $\mu$ m. Le site le plus profond était situé entre 2.5 et 1.5 mm depuis la surface du cortex, selon les tracks. Le volume injecté par site d'injection est de 1.5  $\mu$ L.

Pour le singe E, le titre du vecteur viral était de  $1.33 \cdot 10^{12}$  vg/mL. Nous avons effectué deux tracks d'injection au sein du cortex visuel primaire comprenant chacun onze sites d'injection espacées de 500  $\mu$ m, répartis entre 5.5 et 0.5 mm depuis la surface du cortex. Le volume injecté par site d'injection est de 1.2  $\mu$ L.

Pour le singe Z, nous avons injecté de l'encre de Chine. Dans la craniotomie la plus rostrale, nous avons effectué deux tracks d'injection au sein du cortex visuel primaire gauche comprenant chacun tous les sites d'injection espacées de 500  $\mu$ m, répartis entre 5 et 2 mm depuis la surface du cortex, ainsi qu'un site à 1 mm sous la surface du cortex. Le volume injecté par site d'injection est de 1.2  $\mu$ L. Pour le deuxième track, espacé de 0.5 mm vers la droite, nous avons effectué des injections à 5 mm, 3 mm, 1.5 et 0.5 mm sous la surface, avec un volume de 1  $\mu$ L. Nous avons observé un reflux pour la partie basse (<2 mm) des injections du premier track ainsi que pour la partie haute (>1.5 mm) du deuxième track. Dans la craniotomie la plus caudale, deux tracks d'injection ont également été effectués. Nous avons effectué tous les sites d'injection espacées de 500  $\mu$ m, répartis entre 5 et 1.5 mm depuis la surface du cortex. Le volume injecté par site d'injection est de 0.5  $\mu$ L. Nous avons observé un reflux pour les sites supérieurs à 4 mm sous la surface. Enfin, un dernier track d'injection a été effectué 1.5 mm vers la gauche, mais nous avons observé du reflux pour l'ensemble des trois sites d'injections (2 mm, 1.5 mm et 0.7 mm sous la surface).

Le singe L possède une chambre d'enregistrement. Nous n'avons donc pas eu besoin d'effectuer de craniotomie. Nous avons utilisé une grille adaptatrice afin de

positionner les tubes guides des injections aux positions déterminées à l'aide des cartes rétinotopiques de la chambre d'imagerie. Pour le singe L, le titre du vecteur viral était de  $1.33 \cdot 10^{12}$  vg/mL. Nous avons effectué 4 tracks d'injections alignés sur le plan 0 (voir Figure X), espacés tous les 1.5 mm entre 1.5 et 6 mm dans la direction du côté médio-caudal de la chambre d'enregistrement à partir de son centre. Chaque track possède 8 sites d'injection (7 pour le track le plus médian) espacés de 400  $\mu$ m entre 3.2 et 0.2 mm sous la surface du cortex. 1  $\mu$ L de vecteur est injecté par site.

Pour tous les animaux, les injections ont été réalisées à l'aide de seringues Hamilton 10  $\mu$ L (Gastight 1701) ainsi que d'aiguilles biseautées (Gastight, sur-mesure). Le débit (0.2 – 0.5  $\mu$ L/min) est contrôlé par un microinjecteur (Harvard Apparatus).

Après injection pour le singe A, du ciment chirurgical a été appliqué au niveau des tracks d'injection afin de les protéger. Pour les singes A, E et Z, la peau incisée est suturée et désinfectée à la Bétadine pour les animaux. L'intubation et la perfusion intraveineuse sont coupées. L'arrêt de l'anesthésie gazeuse permet le réveil progressif des animaux.

#### **2.4.4.3. Préparation des coupes histologiques de cortex visuels primaires de primates non-humains**

L'anesthésie des deux animaux A et E est induite par injection d'un mélange kétamine (3 mg/kg) / dexdomitor (0.015 mg/kg) puis relayée par une anesthésie sous perfusion intraveineuse d'Alfaxan (0.1 mg/kg/min). La mise à mort des animaux est provoquée par surdose d'anesthésique (5 mL euthasol). Les corps des animaux sont ensuite perfusés avec du paraformaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich, 100496). Les cerveaux sont ensuite extraits, rincés au NaCl puis transférés dans des bains de sucrose successifs (10, 20 puis 30% - Sigma-Aldrich, 84097) à 4°C. Dans le cas du singe A, la dure-mère est détachée du cerveau avant fixation. Pour éviter de potentiels dommages tissulaires corticaux, elle est laissée intacte sur le cerveau des singes E et Z. Les cerveaux ainsi cryoprotégés sont ensuite sectionnés dans le plan coronal en coupes de 50  $\mu$ m d'épaisseur au microtome à congélation (Microm, HM450).

#### **2.4.4.4. Immunomarquages**

Les coupes sont d'abord perméabilisées en étant transférées dans un mélange PBS (tampon phosphate salin ou phosphate-buffered saline) 1X et Triton X-100 0.5% pendant 1 h. Elles suivent ensuite une étape de saturation en étant transférées dans un mélange PBS 1X, BSA (sérum d'albumine bovine) 1% et Tween 20 0.1% pendant 1 h. Le marquage avec les anticorps primaires est réalisé pendant une nuit dans un mélange comprenant le tampon

de saturation dilué de moitié dans du PBS, du Triton 0.5%, et les anticorps primaires. Pour le marquage des neurones, nous avons utilisé un anticorps monoclonal anti-NeuN (souris, Merck-Millipore, MAB377) dilué à 1/500. Pour le marquage des microglies, nous avons utilisé un anticorps anti-Iba1 (chèvre, Abcam, ab5076) dilué à 1/500. Après rinçages successifs au PBS, les coupes sont transférées pendant 1 h dans le même tampon que pour les anticorps primaires mais en présence des anticorps secondaires conjugués avec un fluorophore (anti-souris,  $\lambda = 488$  nm ; anti-chèvre,  $\lambda = 647$  nm, Molecular Probes). Les noyaux cellulaires sont aussi marqués au cours de cette étape par du DAPI (Merck Millipore, D9542) dilué à 1/1000.

#### **2.4.4.5. Acquisition des images histologiques**

Les images de cerveau entier et de coupe entières sont réalisées avec une loupe binoculaire à épifluorescence (Nikon, SMZ18) munie d'un objectif 2X.

Les images des coupes présentant des immunomarquages sont réalisées par microscopie confocale (Olympus FV1000 avec objectif 20X et 40X (UPLSAPO 20XO, NA : 0.85)). Les images ont ensuite été traitées avec le logiciel FIJI (ImageJ).

#### **2.4.4.6. Sortie des animaux entraînés à réaliser une tâche comportementale**

Lors de chaque séance quotidienne d'entraînement, les animaux sont assis dans une chaise (Crist Instruments) en tête fixe et sont placés en face à 58 cm d'un écran (Iiyama ; Prolite XB2783HSU ; correction gamma ; résolution 1920 x 1080 pixels, fréquence de rafraîchissement de 60 Hz). La luminance moyenne de l'écran est de 9 cd/m<sup>2</sup>. La position des yeux est enregistrée à l'aide du système infrarouge Eyelink 1000 (SR Research). Les protocoles des expériences sont contrôlés à l'aide du logiciel EventIDE (Okazolab).

#### **2.4.4.7. Tâche de détection**

Les animaux L, U et F étaient entraînés à réaliser une tâche de détection de cibles visuelles. Chaque essai débute par l'apparition d'un point carré central de 0.2 degrés d'angle visuels (DVA) que l'animal doit fixer (avec une fenêtre de tolérance de 3 DVA de diamètre) pendant une fenêtre de 1000 à 2500 ms pour engager l'apparition de la cible visuelle. L'animal doit ensuite continuer de fixer le point central pendant une durée de 150 à 800 ms. La disparition du point central constitue le signal d'exécution de la saccade vers la cible visuelle, avec une fenêtre de tolérance de 5 DVA de diamètre. Les saccades en retard (exécutées avec une latence au-delà de 800 ms) ne sont pas considérées comme correctes. Les animaux sont récompensés avec de la grenadine s'ils exécutent correctement cette saccade.

Pour chaque séance d'enregistrement, deux positions en périphérie symétriques par rapport au point central sont choisies. Les cibles sont des cercles de 2 DVA de diamètre comprenant un grating noir et blanc fixe de fréquence spatiale de 2.5 cycles par DVA. De plus, ces cibles présentent aléatoirement des contrastes différents au cours d'une séance. Les contrastes sont calculés selon la définition du contraste de Michelson. Nous avons mesuré la puissance lumineuse associée à chaque triplet de couleurs attribués aux bandes claires et sombres du grating en fonction des conditions, ainsi que la puissance lumineuse associée au triplet de couleur du fond d'écran. Le contraste de Michelson est défini comme la différence de puissances lumineuses divisé par la somme de puissances lumineuses entre le fond d'écran et la bande dont la valeur du triplet de couleur est la plus éloignée de celle du fond d'écran.

Les valeurs de contraste choisies diffèrent entre les séances d'enregistrement. Cependant, toutes les séances comprennent une condition pour laquelle la cible présente un contraste nul (elle est donc invisible). Pour cette condition, l'animal est récompensé s'il continue à fixer une la zone centrale avec une fenêtre de tolérance de 5 DVA de diamètre.

#### **2.4.4.8. Tâche de fixation passive (rétinotopie)**

Le singe L était entraîné à exécuter deux tâches de détection passive concomitantes avec l'imagerie ultrasonore afin d'établir la rétinotopie du cortex visuel au niveau de la chambre d'enregistrement. Chaque séance commence par une période de 100 s durant laquelle aucun stimulus n'est présenté. Les essais débutent à la fin de cette période. Chaque essai débute par l'apparition d'un point carré central de 0.2 degrés d'angle visuels (DVA) que l'animal doit fixer (avec une fenêtre de tolérance de 3 DVA de diamètre) pendant une fenêtre de 500 à 1000 ms pour engager l'apparition du stimulus visuel. Ce dernier apparaît ensuite en périphérie pendant 1000 ms. L'animal est récompensé s'il maintient la fixation du point central pendant cette période La période entre deux essais successifs est de 9 s.

Pour le premier protocole, les stimuli visuels sont des arcs de cercle de 2.5 DVA de large et couvrant  $\pi/8$  radians d'envergure dans le quart inférieur gauche de l'écran, centrés sur le point de fixation. Les stimuli possèdent un motif intérieur en damier noir et blanc dynamique : la longueur de chaque carré du damier est de 1 DVA, et la fréquence temporelle de l'inversion de teinte des carrés est de 10 Hz. L'arc de cercle présenté occupe 8 positions aléatoires : la courbure extérieure de l'arc de cercle est positionnée tous les 2.5 DVA entre 2.5 DVA et 10 DVA. Le segment supérieur de l'arc de cercle prend deux positions du cercle trigonométrique :  $\pi$  et  $5\pi/4$ . A ces huit conditions se rajoutent une neuvième lors de laquelle

aucun stimulus n'est présenté. Ce protocole est utilisé à la fois pour déterminer les excentricités préférées et les angles polaire préférés.

Pour le deuxième protocole, les stimuli visuels sont des demi-cercles de 2 DVA de large situés dans la partie gauche de l'écran, centrés sur le point de fixation. Les demi-cercles possèdent un motif intérieur en grating sinusoïdal fixe dont la fréquence spatiale est de 1 cycle par DVA. Le centre des héli-bandes circulaires occupe aléatoirement toutes les positions espacées de 2 DVA entre 2 DVA et 14 DVA. A ces sept conditions s'ajoute une huitième lors de laquelle aucun stimulus n'est présenté. Ce protocole est utilisé pour déterminer les excentricités préférées.

#### **2.4.4.9. Traitement des données comportementales**

Les données sont importées dans Matlab et les graphes présentés sont générés par des scripts maison.

Pour la tâche de détection, seules les séances présentant un taux de réussite supérieur à 60% (nombre d'essais corrects divisé par le nombre d'essais utilisés par l'animal) sont prises en compte.

#### **2.4.4.10. Enregistrements d'imagerie ultrasonore**

Les enregistrements sont réalisés à l'aide d'un scanner ultrasonore fonctionnel prototype (Iconeus et Inserm U1273, Paris, France) connecté à une sonde ultrasonore linéaire (128 éléments, 15 MHz, résolution spatiale de  $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}^3$ ). La sonde est logée dans la chambre d'enregistrement (18 mm de diamètre) à l'aide d'un adaptateur. Du gel ultrasonique stérile est déposé à l'interface entre la sonde et le tissu afin de faciliter la transmission des ondes ultrasonores. Le plan d'imagerie est de 12.8 mm de large et de 10 mm de profondeur. Les données sont acquises en émettant des groupes continus de 11 ondes ultrasonores planaires inclinées à des angles variant de  $-10^\circ$  à  $10^\circ$ . Les échos ultrasonores sont additionnés pour créer une seule image composée acquise toutes les 2 ms. Les images Doppler finales ont été échantillonnées à 2.5 Hz en faisant la moyenne de 200 images ultrasonores composées après filtrage spatio-temporel basé sur la décomposition en valeurs singulières des images ultrasonores.

#### **2.4.4.11. Traitement des images ultrasonores**

Les données Doppler sont analysées à l'aide d'une approche de modèle linéaire généralisé implémentée dans Matlab. Le motif de stimulation constitue l'entrée du modèle. Il



correspond à un peigne de Dirac (un vecteur temps où les valeurs non nulles situées aux niveaux des temps de présentations des stimuli sont égales à 1). Pour établir la rétinotopie, il est nécessaire d'obtenir la réponse à chaque condition. Pour chacune d'entre elles, le motif de stimulation ne comporte des valeurs non nulles uniquement pour les temps correspondant à la présentation du stimulus en question. Dans le cas du protocole de rétinotopie comportant la présentation des demi-cercles, une subtilité supplémentaire est introduite : le motif de stimulation d'une excentricité comporte en plus des valeurs égales à 0.5 aux temps de présentations des excentricités voisines de la condition donnée. Ceci permet de prendre en compte la physiologie de la préférence des neurones à une condition particulière : l'amplitude de la réponse en fonction des excentricités n'est pas centrée de manière tout ou rien autour d'une excentricité préférée mais suit plutôt une courbe en cloche autour de cette condition préférée.

Par la suite, le modèle opère une convolution entre le motif de stimulation et la fonction de réponse hémodynamique. La fonction de réponse hémodynamique est quant à elle déterminée préalablement par la moyenne de plusieurs réponses CBV à la suite d'une stimulation visuelle (1 s). La convolution effectuée précédemment permet d'obtenir une prédiction de la variation de CBV pour chaque pixel. L'adéquation entre cette prédiction et les données réelles permet d'obtenir pour chaque condition une carte de Z-scores et une carte de p-values. Les cartes d'activation montrent le Z-score de tous les pixels possédant une p-value inférieure à 0.001 (après correction avec la procédure Benjamini-Hochberg utilisée pour diminuer le taux de faux positifs). Nous avons ensuite comparé pour chaque pixel apparaissant comme significatif sur au moins une des cartes obtenues précédemment les p-values obtenues pour chaque condition et retenu la condition présentant la plus faible p-value. A l'issue de cette étape nous obtenons la carte rétino-topique d'une séance d'enregistrement. Les cartes réalisées sur le même plan d'imagerie sont ensuite recalées les unes par rapport aux autres grâce à des repères anatomiques et moyennées entre elles. Chaque pixel de couleur présente donc l'excentricité préférée moyenne ou l'angle polaire préféré moyen. Le pixel en question est considéré comme significatif pour au minimum une condition d'une séance.

#### **2.4.4.12. Obtention du centre des champs récepteurs des pixels**

Pour chaque pixel présentant une double spécificité d'angle polaire et d'excentricité, ces deux paramètres permettent d'obtenir les coordonnées parallèles du centre du champ récepteur du pixel. Pour chaque plan, nous avons ainsi généré les représentations des centres des champs récepteurs des pixels doublement spécifiques imagés. Pour éviter

d'obtenir des points superposés, nous avons introduit une variabilité aléatoire de 0 à 0.2 radians pour les angles polaires et de 0 à 0.5 DVA pour les excentricités.

---

## CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE

---

Au cours de cette section seront d'abord résumés les principaux résultats obtenus au sein de l'étude présentée dans ce manuscrit. Puis, nous approfondirons les intérêts respectifs des thérapies optogénétique et sonogénétique pour une restauration visuelle corticale. D'autre part, l'imagerie fonctionnelle ultrasonore permet de valider l'activation consécutive à la stimulation avec une résolution spatiale élevée ( $100*100*400 \mu\text{m}^3$ ) au sein d'un large volume cérébral. Il est donc important d'identifier la relation entre activité neuronale et variation de CBV pour l'évaluation de l'activation neuronale de ces thérapies génétiques corticales. La discussion de ces résultats fera l'objet de la quatrième partie de cette discussion générale. Enfin, nous présenterons quels sont les défis à relever pour une possible application de la thérapie sonogénétique corticale chez l'homme.

## 3.1. Synthèse des principaux résultats

Le premier chapitre de résultats de ce manuscrit a permis d'établir la preuve de concept de la stratégie optogénétique de restauration visuelle corticale à l'aide de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS) et d'enregistrements unitaires multi-électrodes. Grâce aux enregistrements sur le rat anesthésié, j'ai démontré que la stimulation en surface de V1 conduit à l'activation neuronale de couches les plus superficielles jusque dans les couches corticales profondes, même à faible irradiance ( $36 \text{ mW}\cdot\text{mm}^{-2}$ ). De plus, les latences optogénétiques sont inférieures à celles consécutives à un stimulus lumineux, ce qui est cohérent avec une activation corticale directe. D'autre part, l'activité initiée au sein de V1 se propage aux autres aires visuelles. La première partie de la discussion est consacrée à cette preuve de concept de la thérapie corticale optogénétique.

En parallèle, j'ai participé à démontrer la preuve de concept de l'utilisation de la sonogénétique comme thérapie corticale chez le rongeur. Les résultats obtenus dans le chapitre 2.2 montrent que la stimulation sonogénétique du cortex visuel primaire induit une activation neuronale avec une résolution spatiale ( $400 \mu\text{m}$ ) et temporelle (10 ms, 13 Hz) compatible avec la restauration visuelle. Les latences des réponses sonogénétiques mesurées sont de plus inférieures à celles consécutives à un stimulus lumineux, ce qui est cohérent avec une activation corticale directe. Enfin, nous avons démontré que des souris exprimant MscL-G22S au sein de V1 sont capables de percevoir un stimulus sonogénétique comme un phosphène. Ces deux preuves de concept invitent à établir une confrontation ces deux stratégies de restauration visuelle. Cette discussion fait l'objet d'une revue de la littérature incluse en annexe et fait l'objet de la deuxième partie de cette discussion générale

D'autre part, dans la perspective d'une application clinique de la stratégie sonogénétique, j'ai amorcé la caractérisation d'aires corticales sous la chambre d'enregistrement physiologique de primates. Ce travail abordé par une approche d'électrophysiologie et d'imagerie ultrasonore m'a amené à identifier la contribution des activités unitaires au sein des variations de CBV. Nous avons réalisé des co-enregistrements chez deux animaux au sein des cortex visuel primaire et fronto-médians lors de tâches comportementales. Ce travail a permis de développer un dispositif innovant capable d'associer imagerie fUS et enregistrement électrophysiologique, et permettant le suivi en temps réel de l'insertion d'une électrode dans le cerveau. Les résultats montrent que la composante des variations de CBV dues à l'activité unitaire isolée est inférieure à  $1 \text{ mm}^3$  ce qui est plus localisée que l'activité neurovasculaire globale. Cependant, les cartes d'activations obtenues montrent que de nombreux pixels indiquent une contribution de l'activité unitaire aux variations de CBV locales, alors même que ces pixels sont éloignés du

site d'enregistrement de l'activité unitaire isolée. Ce point sera discuté dans la troisième partie de cette discussion générale.

Enfin, j'ai réalisé des travaux préparatoires pour l'application de la thérapie sonogénétique chez le primate non-humain. J'ai ainsi validé l'efficacité du vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato chez deux animaux. De plus, j'ai caractérisé par imagerie ultrasonore la rétinité de la chambre d'enregistrement d'un premier animal, ce qui a permis de localiser le centre des champs récepteurs des pixels présentant une double sélectivité d'angle polaire et d'excentricité. En parallèle, nous avons entraîné cet animal ainsi que deux autres singes à réaliser une tâche de détection de cibles visuelles. Grâce à cet ensemble de résultats, nous avons déterminé où injecter le vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdTomato chez un premier animal dans une région du cortex visuelle pertinente pour la validation physiologique et comportementale de la thérapie sonogénétique. La dernière partie de cette discussion générale permet de décrire les perspectives pour une application de la thérapie corticale sonogénétique chez l'Homme.

## **3.2. Sélection d'une stimulation corticale : la thérapie optogénétique ?**

### **3.2.1. Activation directe ou indirecte des neurones des couches profondes**

La thérapie optogénétique a été appliquée avec succès à la rétine pour restaurer la vision de patients aveugles. Nos travaux sur l'évaluation de l'efficacité de l'opsine ChrimsonR au niveau rétinien (article inclus en annexe) m'ont amené à tester si une approche analogue au niveau cortical permettrait de restaurer la vue de patients avec une atrophie optique. Les résultats sur la sécurité de l'opsine choisie tant chez les primates non-humains que chez l'Homme nous encourageait dans cette voie d'autant que son activation en lumière rouge devait faciliter une stimulation en profondeur du cortex visuel. Mes résultats obtenus par électrophysiologie et imagerie fUS démontrent une activation de V1 jusque dans ces couches les plus profondes ( $< 800 \mu\text{m}$ ). Au sein de V1, nous avons enregistré un ensemble homogène de latences optogénétiques très courtes (moyenne:  $1.76 \pm 3.14 \text{ ms}$ ,  $n = 76$  neurones) ce qui suggère que les neurones enregistrés sont directement activés par la stimulation optique. Cependant, pour les neurones activés au sein des couches profondes, une incertitude supplémentaire subsiste : la réponse enregistrée au niveau du soma peut être la conséquence d'une activation optique au niveau du soma ou / et la conséquence

d'une activation optique dendritique plus en surface. En effet, les coupes histologiques montrent que l'expression de ChrimsonR est présente dans l'ensemble des couches et qu'elle est présente dans l'ensemble des compartiments neuronaux (soma, dendrites et axone). De plus, de précédents travaux réalisés par enregistrements de neurones pyramidaux de l'hippocampe et de la couche corticale 5 par la technique de patch-clamp *in vitro* et *in vivo* démontrent qu'une activation dendritique suffisamment importante permet de générer des potentiels d'action axonaux (Spruston 2008; Losonczy and Magee 2006; Golding, Staff, and Spruston 2002). Ces travaux ne quantifient pas la différence de latences entre ces deux évènements mais d'après les traces d'activation présentées dans ces publications elle paraît trop courte ( $< 5$  ms) pour que ces deux mécanismes conduisent à deux groupes de latences facilement identifiables. Une solution pour démontrer ou réfuter l'importance de cette activation dendritique dans nos résultats serait de dupliquer les mêmes expériences en utilisant un vecteur viral permettant de restreindre l'expression de ChrimsonR aux somas, une stratégie déjà appliquée pour l'expression d'autres opsines (Shemesh et al. 2017; Linghu et al. 2022). De plus, il serait intéressant d'affiner les paramètres d'injection du vecteur viral afin de restreindre l'expression de ChrimsonR (ou d'une version de ChrimsonR assurant une expression somatique) à une couche corticale unique. Répéter les expériences réalisées précédemment en utilisant ces nouveaux paramètres pourrait nous renseigner sur l'importance d'une couche corticale pour la propagation de l'activité à l'ensemble de V1 ou à d'autres structures.

### 3.2.2. Dispositif optique

D'autre part, nous démontrons ici la possibilité d'activer les couches profondes de V1 depuis une stimulation en surface en ayant utilisé une simple fibre comme dispositif optique. La fibre optique utilisée possède un diamètre de 400  $\mu\text{m}$  et son ouverture numérique (0.39) entraîne une dispersion de la lumière de 23° de manière symétrique par rapport à l'axe constitué par le prolongement de la fibre. Elle ne permet donc pas une stimulation optogénétique locale puisque ChrimsonR est exprimée sur une zone large de V1. Idéalement, il serait préférable d'utiliser un dispositif optique permettant d'illuminer une surface comprise dans un disque de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre qui correspond au diamètre des colonnes d'orientation chez le primate. L'imagerie multi-photons permet d'atteindre une telle résolution mais son application pour une potentielle stratégie thérapeutique semble difficilement réalisable. L'utilisation de fibres optiques connectées à une lentille convergente permettrait de focaliser le faisceau lumineux excitateur dans une telle zone. En combinant ce dispositif optique avec l'imagerie fonctionnelle ultrasonore, il serait possible de mesurer la résolution spatiale de l'activation en ajustant les paramètres de stimulation. De plus, il serait

intéressant de tester si le barycentre de l'activation se déplace en changeant la fibre de position à la surface du cerveau. Une fois les paramètres de stimulation adaptés déterminés, il serait envisageable de développer une matrice composée de telles fibres optiques focalisées.

### **3.2.3. Spécificité de l'activation optogénétique**

Enfin, nos résultats démontrent la possibilité de combiner l'optogénétique avec l'imagerie fUS pour l'étude fonctionnelle de circuits neuronaux. Une telle combinaison avait déjà été effectuée dans une première publication dans laquelle les auteurs démontrent que la stimulation optique du cortex de souris naïves n'exprimant pas d'opsines avec de la lumière bleue engendre des activations hémodynamiques non spécifiques pour des puissances en sortie de fibre supérieures à 2 mW (Rungta et al. 2017). Nous démontrons dans les résultats présentés ici que l'utilisation de ChrimsonR, une opsine sensible à la lumière rouge, permet d'exercer un contrôle optogénétique spécifique de l'activité neuronale même à des puissances lumineuses en sortie de fibre de 7.1 mW. Cependant, le contrôle optogénétique de circuits neuronaux reste possible en utilisant des opsines sensibles à la lumière bleue tant que la puissance utilisée n'excède pas cette valeur limite de 2 mW. Une première étude a comparé chez des souris Thy-ChR2 exprimant ChR2 au sein de la couche corticale 5 les profils d'activation optogénétique du cortex moteur détectés par IRM fonctionnelle et par imagerie fUS, et ce à différentes puissances lumineuses. Leurs résultats démontrent que l'imagerie fUS est une technique plus sensible pour détecter des activations optogénétiques (Edelman et al. 2021). De façon intéressante, ils rapportent que les fonctions de réponse hémodynamique à la stimulation optogénétique diffèrent entre les deux techniques. Enfin, les auteurs confirment de plus l'origine neuronale de ces activations par des enregistrements électrophysiologiques. Enfin, un autre groupe a appliqué la même stratégie pour l'étude des circuits neuronaux associés à différentes sous-populations au sein du colliculus supérieur ainsi qu'à leur rôle dans différents comportements (Sans-Dublanc et al. 2021).

## **3.3. Sélection d'une stimulation corticale : la thérapie sonogénétique ?**

### **3.3.1. Rappel des principaux résultats**



Dans ce manuscrit, nous avons évalué en parallèle deux stratégies génétiques de restauration visuelle corticale : la thérapie optogénétique qui repose sur l'expression d'opsines, et la thérapie sonogénétique basée sur l'expression de canaux mécanosensibles. L'approche de thérapie sonogénétique est apparue dans le cours de ma thèse, ce qui nous a amené à faire une analyse comparative de ces deux stratégies dans le cadre d'une restauration visuelle corticale. La revue incluse en annexe permet de comparer les résultats obtenus pour ces deux approches corticales. De plus, il est intéressant de comparer de façon plus générale les propriétés des opsines et des activateurs mécanosensibles et de confronter l'intérêt d'utiliser l'optogénétique et la sonogénétique en recherche fondamentale.

### 3.3.2. Comparaison des propriétés des activateurs optogénétiques et sonogénétiques

La littérature de l'optogénétique montre que plusieurs dizaines d'opsines différentes peuvent être utilisées. Ce répertoire de protéines photosensibles est donc plus vaste que les quelques protéines mécanosensibles utilisées dans la littérature sonogénétique et décrites dans le paragraphe 1.2.3.2. de l'introduction. Le tableau 2 ci-dessous permet de comparer les différences de propriétés fonctionnelles entre des deux groupes de molécules activatrices.

	Opsines	Protéines mécanosensibles
Effet excitateur / inhibiteur	<u>Excitateur</u> : channelrhodopsines <u>Inhibiteur</u> : bactériorhodopsines et halorhodopsines	Excitateur seulement
Sélectivité ionique	Bactériorhodopsines : H <sup>+</sup> Halorhodopsines : Cl <sup>-</sup> Channelrhodopsines : sélectivité cationique variable (Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> / Ca <sup>2+</sup> )	Courant cationique non sélectif (dont Ca <sup>2+</sup> )
Conductance (pour une molécule)	ChR2 : 50 - 250 fS	3 pS (dPiezo) – 3 nS (MscL)
Cinétique	Temps pour atteindre le pic d'activation : quelques ms. Constante de désactivation $T_{off}$ : 2.7 ms (vfChrimson) – 1000 ms (CnChR2).	Temps pour atteindre le pic d'activation : quelques ms dans les conditions physiologiques, de quelques ms (MscL, Piezo) à 1 s (TRP-4) ou plus (Prestin) dans le cas d'une application sonogénétique.

<b>Sélectivité à une longueur d'onde d'activation</b>	Spectre d'absorption plus ou moins étroit centré sur une longueur d'onde d'excitation maximale.  445 nm (PsChR) – 590 nm (ChrimsonR).	Peu d'informations mettent en évidence une sélectivité pour une fréquence ultrasonore particulière.
<b>Activation par d'autres modalités</b>	Non	<u>Prestin</u> : activation voltage-dépendante  <u>TRP4</u> : activation chimique, thermique ou par gradient d'osmolarité  <u>Piezo et MscL</u> : seulement mécanosensibles.

**Tableau 2. Comparaison des propriétés fonctionnelles des opsines et des protéines mécanosensibles utilisées en sonogénétique.**

Le vaste répertoire des opsines disponibles permet de contrôler d'une manière plus diversifiée l'activité neuronale que par utilisation des activateurs sonogénétiques actuellement testés. Ainsi, il ne serait pas possible d'inhiber l'activité neuronale d'une sous-population par sonogénétique car les protéines mécanosensibles utilisées sont toutes excitatrices. De plus, il est possible de combiner plusieurs opsines avec des spectres d'excitations distincts pour activer en parallèle plusieurs sous-populations neuronales (Klapoetke et al. 2014), ce qui ne semble pas possible en sonogénétique pour l'instant car peu d'informations suggèrent une sélectivité d'une molécule pour une fréquence d'ultrasons. Les paramètres utilisés dans la littérature pour l'utilisation de la protéine Prestin et du canal TRP-4 montrent d'autre part que les activations générées sont beaucoup plus lentes que la plupart des opsines. Enfin, les opsines sont exclusivement photosensibles alors que certaines protéines mécanosensibles (Prestin, TRP-4) sont activables par d'autres modalités.

Parmi les protéines utilisées pour la sonogénétique, certaines sont activées par l'augmentation de la température liée à la stimulation ultrasonore tandis que d'autres sont comme le canal MscL semblent activées par la déformation mécanique de la membrane par les ultrasons. Ces dernières permettent un contrôle temporel de l'activation plus précis tandis que l'augmentation de température est plus lente et plus durable dans le temps ce qui n'est pas souhaitable dans le cadre de la restauration visuelle.

Le canal MscL est d'origine bactérienne, comme un grand nombre des opsines couramment utilisées en optogénétique. Son utilisation en sonogénétique pour une

application humaine soulève par conséquent de nombreuses questions sur les risques d'inflammation consécutive à son expression. Étonnamment, dans toutes les études sur l'expression de ChrimsonR ou CatCh chez le primate non-humain ou l'homme, aucune inflammation majeure n'a été rapportée par rapport à l'expression ectopique de l'opsine dans la rétine. De même pour MscL, nos travaux ne montrent pas d'inflammation majeure qui aurait affecté le tissu. Cependant, des études plus spécifiques sur ce point précis seront nécessaires notamment dans des conditions d'activation de MscL sur plusieurs heures. Si les propriétés de MscL semblent adaptées pour une activation neuronale compatible avec la restauration visuelle, une recherche par criblage génétique à partir d'échantillons variés de micro-organismes pourrait permettre d'identifier de nouveaux canaux mécanosensibles et ainsi enrichir le répertoire de molécules actuellement utilisées. Une telle approche a été appliquée avec succès pour l'optogénétique (Klapoetke et al. 2014; Marshel et al. 2019).

L'imagerie fUS permet d'accéder à l'activité neuronale dans la profondeur du cerveau avec une résolution spatiale de  $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}^3$ . Par conséquent, la sonogénétique devrait permettre inversement d'activer depuis la surface du cerveau les neurones par stimulation ultrasonore. Une première étude a même démontré qu'en utilisant des fréquences ultrasonores basses, il est possible d'obtenir une activation transcraniale des neurones exprimant MscL-G22S (Qiu et al. 2020). De façon analogue, une activation optogénétique des aires profondes depuis la surface du cerveau a également été obtenue en utilisant des opsines sensibles à la lumière rouge. Ainsi, deux études montrent que l'utilisation de ReachR (J. Y. Lin et al. 2013) et ChRmine (R. Chen et al. 2021) permettent une activation transcraniale. Cependant, l'effet de l'absorption de la lumière est visible car les latences d'activation obtenues pour les neurones enregistrés en profondeur sont plus grandes que lors d'une activation non transcraniale. De plus, les ondes lumineuses se dispersent plus en profondeur des tissus biologiques que les ondes ultrasonores. La sonogénétique devrait donc permettre d'atteindre une résolution spatiale d'activation neuronale de structures profondes supérieure à l'optogénétique pour une stimulation surfacique. Nos premiers résultats confirment la possibilité d'atteindre une résolution spatiale qui serait compatible avec une stimulation de points espacés de  $400 \mu\text{m}$  même dans les couches profondes du cortex. Une telle résolution spatiale pourrait être obtenue même en intégrant la présence de la dure-mère au-dessus du cerveau. Au contraire, dans toutes les approches sur lesquelles nous avons travaillé pour l'application de l'optogénétique sur le primate non-humain, nous ne pouvons pas envisager de laisser la dure-mère. Si certaines équipes tentent de stimuler le cerveau depuis la surface avec des matrices de LEDs (Rajalingham et al. 2021), d'autres se sont résolues à produire des guides optiques pour une stimulation optogénétique dans la profondeur du cortex (McAlinden et al. 2019). Dans une perspective clinique, la possibilité de stimuler le cortex à partir d'une matrice ultrasonore placée au-dessus de la dure-mère

semble une approche offrant plus de sécurité et de durabilité pour le patient dans les conditions actuelles.

### **3.3.3. Vers un contrôle et une lecture entièrement ultrasonore de l'activité neuronale ?**

Enfin, pour la validation de notre stratégie de restauration visuelle et plus généralement pour une utilisation préclinique de la sonogénétique, il serait important de pouvoir combiner enregistrement et stimulation neuronale. A ce titre, l'optogénétique peut être combinée à de l'imagerie d'indicateurs calciques ou voltage-dépendants pour établir un contrôle et une lecture entièrement optique de l'activité neuronale en surface (typiquement, jusqu'à 750  $\mu\text{m}$  de profondeur pour l'imagerie bi-photon) (Emiliani et al. 2015). Dans ce manuscrit nous avons utilisé dans les chapitres 2.1, 2.3 et 2.4 des résultats une sonde de 128 éléments piézoélectriques émettant des ultrasons à une fréquence de 15 MHz et une pression acoustique de quelques kPa pour assurer l'imagerie fUS de l'activité cérébrale chez le rat et le primate non-humain. Dans le chapitre 2.2 des résultats, nous avons utilisé un transducteur mono-élément permettant une stimulation focale sonogénétique en utilisant une fréquence ultrasonore de 15 MHz et une pression acoustique de 1.2 MPa. Il serait intéressant d'adapter les sondes 128 éléments déjà existantes pour développer un système permettant un contrôle sonogénétique et une imagerie fonctionnelle ultrasonore simultanée. Les dimensions de cette sonde permettent d'obtenir une cadre d'imagerie de 12.8 mm de large et jusqu'à 15 mm de profondeur, ce qui permettrait de stimuler et imager l'ensemble d'un plan coronal de rongeur (souris ou rat) et un grand volume cortical chez le primate. D'autres sondes ultrasonores ont été développées et permettent une imagerie tridimensionnelle capable de couvrir un cerveau entier de souris (Brunner et al. 2020), ou permettent d'imager l'activité de rongeurs se déplaçant librement (Urban et al. 2015). L'adaptation de telles sondes permettrait d'étendre un tel système stimulation / imagerie tout acoustique à l'ensemble du cerveau chez ce modèle animal ou lors de tâches comportementales.

## **3.4. Relation entre les activités unitaires et les variations de CBV chez le primate non-humain**

Dans la perspective de l'utilisation des machines fUS pour l'imagerie et la stimulation, il apparaît important de pouvoir déterminer la relation entre activité neuronale et variation du

flux vasculaires. En effet, l'imagerie fUS pourrait servir pour valider l'activation neuronale avec d'autant plus de précision qu'une fonction de transfert entre activité neuronale et flux vasculaire cérébral est établie (Aydin et al. 2020).

### **3.4.1. Organisation spatiale des variations de CBV prédites par l'activité unitaire**

Les travaux présentés dans le deuxième chapitre de résultats montrent qu'il existe une contribution des activités unitaires au sein des variations de CBV des aires corticales imagées (SEF et cortex visuel). Les cartes de co-activation obtenues selon les modèles linéaires généralisés montrent que les pixels présentant des variations de CBV prédites par l'activité du neurone isolé peuvent être situés loin du site d'enregistrement. Une possible explication est que ces pixels contiennent des neurones dont l'activité est synchrone à celle du neurone dont nous avons isolé et enregistré l'activité. En effet, l'organisation du cortex visuel chez le primate présente des colonnes fonctionnelles activées par une même propriété d'un stimulus (Ho et al. 2021; Blaize et al. 2020). Il est donc plausible que d'autres neurones éloignés du site d'enregistrement aient été activés par le même stimulus et soient responsables de l'activation de ces pixels éloignés sur les cartes d'imagerie fUS. Une autre possibilité, non exclusive de la précédente, est que les pixels activés situés loin du site d'enregistrement contiennent des neurones établissant une connexion horizontale avec celui dont nous avons isolé l'activité. De nombreuses études ont étudié la contribution des activités unitaires dans les variations de signal BOLD imagé par IRM fonctionnelle et peuvent corroborer nos observations. Cependant peu d'études effectuent une caractérisation spatiale de la corrélation entre les deux signaux, à l'exception d'une publication (Mukamel et al. 2005) dans laquelle les auteurs ont enregistré les réponses unitaires au sein des gyrus de Heschl (une zone du cortex auditif) de deux patients épileptiques lors d'une stimulation visuelle et auditive. Les auteurs ont ensuite réalisé des acquisitions d'IRM fonctionnelle chez onze autres patients non-épileptiques en réponse aux mêmes stimuli. Ils ont ensuite effectué une analyse de la contribution des activités unitaires aux variations du signal BOLD en utilisant un modèle généralisé linéaire similaire à celui que nous avons utilisé dans notre étude. Cette analyse est assez similaire à celle que nous avons réalisée à ceci près que nous avons utilisé les activités unitaires pour prédire les variations de CBV d'un même individu, alors que les auteurs effectuent ici une analyse inter-individus. La carte d'activation moyenne de signal BOLD prédite à partir des activités unitaires présente des pixels activés éloignés de site d'enregistrement des neurones chez les autres patients, tout comme nous l'avons observé sur nos cartes de co-activation chez le primate non-humain. Enfin, seules deux études ont combiné imagerie fUS et enregistrements électrophysiologiques, ce qui

limite la comparaison avec nos travaux. Ces études ont enregistré un nombre de neurones beaucoup plus importants grâce à l'utilisation d'électrodes Neuropixels comportant une densité très élevée de sites d'enregistrements (Steinmetz et al. 2021). La première étude est réalisée dans le laboratoire de Karl Farrow et s'intéresse à des circuits colliculaires chez la souris (Sans-Dublanc et al. 2021). Les résultats montrent que les signaux d'un grand nombre de sites d'enregistrements présents dans le colliculus présentent des activités synchrones qui corrént avec les variations de CBV des pixels situés le long de l'axe de l'électrode. En outre, la réponse vasculaire s'étend dans l'ensemble du colliculus supérieur et au-delà, mais les auteurs n'apportent pas la démonstration que ces pixels plus éloignés corrént avec les activités électrophysiologiques mesurées. La deuxième étude est réalisée dans le laboratoire Matteo Carandini et s'intéresse à la relation entre les activités multi-unitaires et les variations de CBV dans V1 et l'hippocampe (Nunez-Elizalde et al. 2022). De même, les résultats publiés dans cette étude montrent que les neurones enregistrés dans V1 ont des activités synchrones. Cependant, à la différence de l'étude précédente, les auteurs montrent que ces activités corrént avec les variations de CBV de pixels plus éloignés situés dans le cortex visuel contralatéral.

### **3.4.2. Contribution de différentes activités neuronales aux variations de CBV**

Dans notre étude, nous avons étudié le signal CBV prédit par l'activité d'un seul neurone et non plusieurs comme le font les études précédemment citées. Il aurait intéressant d'utiliser des électrodes comprenant un nombre plus élevés de sites d'enregistrements. Cela permettrait d'identifier la contribution de l'activité d'une couche corticale particulière aux variations de CBV des autres couches, ou d'identifier des différences de contribution des activités neuronales à la réponse neurovasculaire générale entre les neurones excitateurs ou inhibiteurs. Les travaux du laboratoire de Matteo Carandini cités précédemment (Nunez-Elizalde et al. 2022) montrent que chez la souris, l'activité des neurones inhibiteurs ainsi que celle des couches supra-granulaires corrént mieux avec les variations de CBV enregistrées.

### **3.4.3. Différence de HRF entre les aires corticales**

Enfin, nos résultats semblent montrer aussi une différence de fonctions de réponse hémodynamique entre les deux régions corticales auxquelles nous nous sommes intéressés, même s'il faut souligner que ces données sont issues d'un seul animal par aire corticale. Ces résultats soulignent l'importance de la détermination de telles réponses en fonction de l'aire cérébrale utilisée pour l'interprétation correcte des données issues d'analyses de type

modèles linéaires généralisés. Des études d'IRM fonctionnelle ont aussi démontré une nette différence de fonction de réponse hémodynamique entre V1 et le cortex moteur (Miezin et al. 2000), ou entre V1 et le SEF (Handwerker, Ollinger, and D'Esposito 2004). Ces fonctions de réponse sont obtenues à partir des signaux BOLD dans le cas de l'IRM fonctionnelle, qui constitue une grandeur différente (bien que liée) des variations de CBV. Cependant, une étude récente (mais pas encore publiée) d'imagerie fUS réalisée chez le ouistiti montre aussi des profils de réponses à des stimuli sonores différents entre les aires cérébrales imagées (Takahashi et al. 2021).

### **3.5. Perspectives pour une application d'une thérapie corticale sonogénétique chez l'Homme**

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis d'établir la preuve de concept de la thérapie corticale sonogénétique chez le rongeur, ainsi que les travaux préparatoires à son évaluation préclinique chez le primate non-humain. Dans cette dernière partie, nous discuterons des défis à résoudre pour l'implantation de cette thérapie de restauration visuelle chez l'Homme. Dans un premier temps, nous discuterons du volume nécessaire d'expression de MscL-G22S à obtenir pour une thérapie efficace. A ce titre, nous confronterons les résultats de nos tests viraux à ces objectifs et par quels moyens atteindre ces derniers. D'autre part, nous expliquerons la marche à suivre pour déterminer la position des sites d'injection en fonction du patient. Enfin, nous détaillerons à quoi pourrait ressembler une prothèse ultrasonore permettant de stimuler la zone du cortex visuel primaire exprimant le canal mécanosensible et quelles contraintes d'ingénierie restent à résoudre.

#### **3.5.1. Quelle zone d'expression du canal mécanosensible doit-on obtenir, et comment ?**

Les résultats présentés dans le dernier chapitre démontrent la possibilité d'exprimer MscL-G22S dans le cortex de primates non-humains, ce qui suggère que l'utilisation du vecteur AAV9-7m8-CaMKII-MscL-G22S-tdT chez l'homme permette aussi l'expression de cette protéine d'intérêt. Cependant, les données obtenues pour le singe E suggèrent que le protocole d'injection utilisé permet d'obtenir pour chaque track un cylindre d'expression de 1.25 mm de rayon et de 1.5 mm de hauteur, soit un volume total de 7.3 mm<sup>3</sup>. Chez l'homme, une étude d'IRM fonctionnelle réalisée sur un ensemble de 7 participants (Dougherty et al. 2003) montre que la surface médiane de V1 dans un hémisphère traitant les informations

contenues dans une sous-partie du champ visuel comprise entre 0 et 12 DVA est de 2100 mm<sup>2</sup>, dont environ 700 mm<sup>2</sup> code les informations fovéolaires (entre 0 et 2 DVA d'excentricité). L'épaisseur corticale au sein de V1 étant de 2 mm chez l'homme (Alvarez, Parker, and Bridge 2019), les volumes correspondants sont donc de 4200 mm<sup>3</sup> et 1400 mm<sup>3</sup>. Selon ces chiffres, il faudrait plusieurs centaines d'injections pour couvrir une sous-partie du champ visuel, en utilisant les mêmes paramètres d'injection que ceux que nous avons utilisé (100 injections équivaldraient d'ailleurs à 1.32 mL de vecteur viral injecté). Diminuer le nombre de tracks d'injection et augmenter le volume injecté par track pourraient limiter l'endommagement mécanique du cortex causé par l'insertion des aiguilles, mais il faut développer de tels protocoles d'injection pour assurer que le volume d'expression est assez important et / ou cibler prioritairement une zone particulière du champ visuel (et donc de V1) en fonction du patient. Chez les patients atteints de glaucome, qui constitueraient la population ciblée par une telle thérapie corticale de restauration visuelle, c'est la perte du champ visuel périphérique intervient en premier (Germano et al. 2022) : chez les patients atteints de glaucome en phase précoce, il faudrait donc traiter la partie de V1 codant ces informations-là.

Il semble néanmoins difficile d'atteindre une transduction d'un volume suffisant de V1 à moins d'injecter un volume très important de vecteurs viraux. S'il est démontré que les vecteurs AAV sont peu immunogènes (Trapani, Puppo, and Auricchio 2014), il reste à démontrer que l'injection d'un volume supérieur à 1 mL est sans risque pour une potentielle application clinique de la thérapie sonogénétique chez l'homme. Cependant, le cerveau est un organe isolé de la circulation générale par la barrière hémato-encéphalique. De plus, le fluide cérébro-spinal présente une concentration d'anticorps neutralisants anti-AAV moindre par rapport à celle observée dans la circulation générale (Verdera, Kuranda, and Mingozi 2020). La présence d'anticorps neutralisants dans la circulation générale ne diminue pas l'efficacité de transduction du système nerveux central par des vecteurs AAV9 chez le primate non-humain (Gray et al. 2013). La littérature montre de plus que les réactions immunitaires consécutives à un transfert génétique sont moins fréquentes que pour d'autres organes (Piguet, Alves, and Cartier 2017). En outre, la majorité des tests de vecteurs viraux réalisés sur le primate non-humain démontrant une expression efficace du transgène d'intérêt ont été réalisés sans connaissance de la sérologie de l'animal et sans traitement immunosuppresseur additionnel (Tremblay et al. 2020). Le succès de ces essais suggère aussi une absence de réaction immunitaire humorale. Enfin, les données observées au cours de premiers essais cliniques apportent les dernières réponses à la question de l'immunogénicité des vecteurs AAV lors d'une injection intracérébrale. Dans un essai clinique concernant la maladie de Canavan (McPhee et al. 2006), les 10 patients sont divisés en deux cohortes selon le volume de vecteur viral injecté (900 ou 196 µL, le nombre de



particules virales étant de 1.09 ou  $5.37 \times 10^{12}$  pour ces cohortes 1 et 2, respectivement). Seuls 3 patients (dont 1 issu de la cohorte ayant reçu le volume le plus élevé) présentent une augmentation légère ou modérée du taux d'anticorps neutralisant dans le sang. Les données ne montrent pas non plus d'augmentation particulière de cytokines pro-inflammatoires dans les mois suivant l'injection. Pour les 4 patients issus de la cohorte 2 chez qui le fluide cérébro-spinal a été analysé, aucune augmentation d'anticorps neutralisants n'a été constatée. Enfin, une revue (Verdera, Kuranda, and Mingozi 2020) détaille des résultats préliminaires non publiés mais présentés en conférence de deux autres essais cliniques ayant recours à des injections intra-cérébrales de vecteurs AAV montrant qu'une minorité de patients présentent une augmentation d'anticorps neutralisants (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, France 2022) ou d'une réponse immunitaire cellulaire (National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) 2022) dans la circulation générale. Le détail des volumes injectés n'est pas communiqué.

Une possibilité alternative à l'augmentation du volume d'injection est le développement de vecteurs viraux plus efficaces. Dans le cas de la thérapie génique rétinienne, l'évolution dirigée de nouveaux vecteurs AAV a permis de développer avec succès le sérotype AAV2-7m8 capable de transduire les cellules des couches les plus internes depuis l'humeur vitrée (Dalkara et al. 2013). Le principe sous-jacent d'une telle stratégie est d'injecter une banque hautement diversifiée de vecteurs AAV dont les capsides présentent des mutations aléatoires, de trier par les cellules d'intérêt des autres cellules non ciblées et d'extraire le génome des variants AAV ayant infecté les cellules cibles. Le séquençage de ces derniers permet ensuite d'identifier les variants ayant la plus grande efficacité des cellules cibles. Dans ces travaux, le tri des cellules cibles est réalisé par cytométrie en flux et nécessite de recourir à une lignée transgénique de souris exprimant un fluorophore dans le type cellulaire ciblé. Dans le cas de la thérapie corticale, l'idéal serait de cibler les cellules de la couche 4 : certains travaux montrent qu'il est possible d'obtenir une lignée ciblant ces neurones (Frantz, n.d.; Madisen et al. 2015). Cependant, développer un nouveau variant chez la souris nécessiterait tout de même de le valider chez le primate non-humain. D'autres travaux d'évolution dirigée ont pu générer des variants AAV capables de franchir la barrière hémato-encéphalique à partir d'une injection systémique. Les premières capsides développées permettent une expression efficace et diffuse à l'ensemble du système nerveux central chez la souris dans le cas des capsides de la famille AAV-PHP (Chan et al. 2017) mais aussi chez le ouistiti et le macaque pour les capsides de la famille AAV-MaCPNS (Xinhong Chen et al. 2022), mais elles infectent les neurones et les astrocytes. Les résultats de la première publication citée précédemment montrent qu'il est possible de restreindre l'expression à un sous-type cellulaire en utilisant un promoteur approprié. Cependant, une application de ces vecteurs à la thérapie corticale nécessite de

cibler uniquement les neurones excitateurs du cortex visuel primaire. Il faudrait donc identifier un promoteur ciblant spécifiquement les cellules de cette aire cérébrale spécifiquement, or un tel promoteur n'est pas encore décrit dans la littérature.

Une dernière alternative consisterait à injecter non pas V1 mais le corps genouillé latéral qui occupe un volume plus réduit. Cette stratégie permettrait d'exprimer MscL-G22S jusque dans les terminaisons des cellules projetant vers les neurones de la couche 4 de V1. Il serait alors possible d'activer par sonogénétique ces afférences dans l'ensemble de V1.

Enfin, une dernière question importante liée à l'application clinique d'une stratégie de thérapie corticale génétique concerne la longévité de l'expression du transgène. Chez le primate non-humain, des données montrent que l'expression corticale peut persister jusqu'au-delà de 4 mois (Sadakane et al. 2015; Ju et al. 2018; S. C.-Y. Chen et al. 2022), et notre laboratoire a démontré que l'expression de ChrimsonR au sein des cellules ganglionnaires rétinienne est maintenue et permet de produire des potentiels évoqués après stimulation optogénétique de l'œil jusqu'à deux ans après injection (Chaffiol et al. 2022).

### **3.5.2. Utilisation de l'imagerie fUS pour guider les injections**

Dans le cas d'une application de la thérapie corticale sonogénétique, il pourrait être utile de déterminer la rétinotopie de V1 pour chaque patient afin d'identifier les coordonnées des zones de V1 à cibler. Le dernier chapitre des résultats présentés dans ce manuscrit montre que nous avons réalisé ce travail sur le primate non-humain par imagerie fUS sur plusieurs plans d'imagerie accessibles par la chambre d'enregistrement d'un premier animal. Cependant, il ne serait pas possible d'utiliser l'imagerie fUS pour cartographier V1 chez des patients préalablement aux injections de vecteurs viraux puisque les développements actuels de cette technique ne permettent pas encore d'obtenir un bon rapport signal sur bruit pour de l'imagerie transcrâniale sauf si une prothèse translucide aux ultrasons remplace localement le crâne. L'IRM fonctionnelle semble une technique plus appropriée, d'autant plus que des données ont déjà été publiées sur ce sujet. Ces études démontrent l'existence de différences de signal BOLD chez des patients atteints de glaucome simple entre les cartes d'activation réalisées à partir de l'œil sain et les cartes d'activation réalisées à partir de l'œil atteint (Duncan et al. 2007). Ces différences coïncident bien avec la rétinotopie des zones du champ visuel moins bien perçues par les patients. D'autre part, d'autres travaux suggèrent l'existence d'une légère atrophie de V1 (Frezza et al. 2014) ou montrent une plasticité cérébrale provoquant une surreprésentation de la zone fovéolaire au sein de V1 (Zhou et al. 2017). Ces résultats renforcent la nécessité de cartographier fonctionnellement V1 chez les

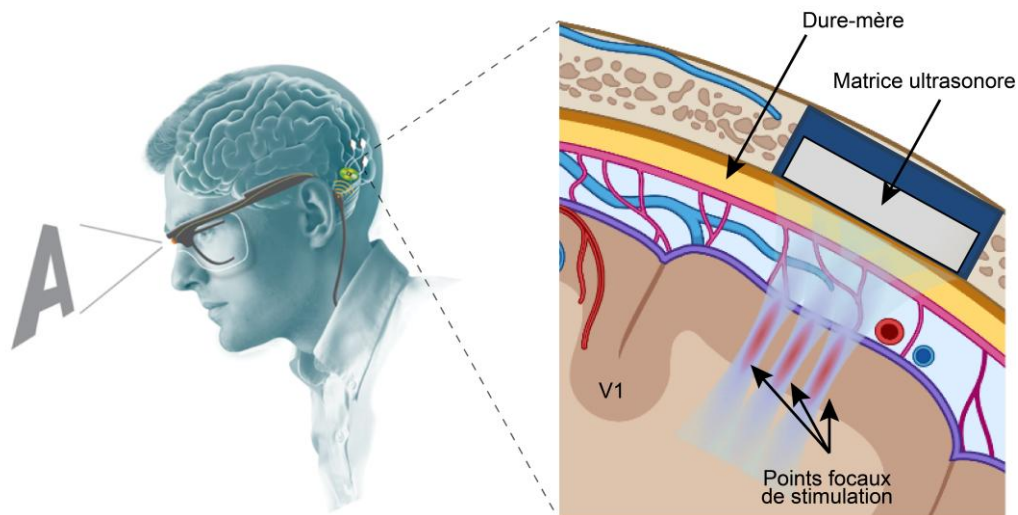
patients cibles d'une telle thérapie corticale sonogénétique afin de mieux déterminer les sites des injections du vecteur viral.

Néanmoins, l'imagerie fUS pourrait être utile pour guider avec précision les aiguilles des seringues d'injection lors de la chirurgie. Cette approche pourrait être d'autant plus utile si le cortex visuel des patients risque d'être plus fin qu'anticipé. Actuellement, des études utilisent l'IRM fonctionnelle (Khateeb et al. 2019) ou d'autres techniques comme l'imagerie optique intrinsèque (Mocanu and Shmuel 2021) pour guider le positionnement des aiguilles d'injection. Nous avons démontré dans le chapitre 2 des résultats que l'imagerie fonctionnelle ultrasonore permet de détecter en temps réel l'insertion d'une électrode au sein du cortex. Cette technique pourrait être transposée à la détection des aiguilles utilisées pour l'injection.

### **3.5.3. Développement d'une interface machine / cerveau ultrasonore pour une stimulation efficace du cortex visuel primaire**

La restauration visuelle implique de recréer plusieurs centaines de pixels voire quelques milliers afin de générer de véritables images. Nos résultats apportent la preuve de concept sur la possibilité de générer des activations neuronales par stimulation sonogénétique. Pour ces stimulations, nous avons utilisé un mono-élément permettant de focaliser la pression acoustique dans l'espace. La résolution spatiale de la stimulation est définie par la répartition spatiale des pressions acoustiques supérieures à la moitié de la valeur maximale atteinte. Celles-ci occupent un cylindre de 276  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 1 mm de hauteur. Les enregistrements EcoG réalisés sur le cortex primaire de rats exprimant MscL-G22S présentés dans le chapitre 2.2 des résultats montrent quant à eux que la résolution spatiale de l'activation est de 400  $\mu\text{m}$  de large. Cette résolution est compatible avec la résolution spatiale de matrices d'électrodes pénétrantes de type Utah. Plusieurs travaux ont démontré que cette résolution spatiale était suffisante pour induire une reconnaissance de formes et de mouvements (Xing Chen et al. 2020; Fernández et al. 2021). Pour démontrer cela chez le primate non-humain, nous prévoyons d'utiliser la même démarche expérimentale que celle utilisée dans ces travaux, présentée en introduction (Fig. 12) : déterminer les champs récepteurs des points focaux de stimulation, démontrer la possibilité d'une détection de phosphène simple puis la possibilité de discriminer deux formes différentes. Nous avons déjà déterminé dans le chapitre 2.4 des résultats le centre des champs récepteurs pour les pixels du cortex visuel présents sur les plans d'imagerie fUS. Par la suite, il nous reste à démontrer la possibilité de détecter un phosphène d'origine ultrasonore. Cependant, démontrer que les animaux peuvent discriminer deux formes

différentes nécessitera de d'adapter les sondes 128 éléments à la stimulation ultrasonore, comme expliqué dans le point 3.3. Idéalement, il faudrait développer des sondes ultrasonores qui soient des matrices bidimensionnelles d'éléments piézoélectriques. Le bénéfice serait de pouvoir disposer d'un plus grand nombre de points focaux capables de couvrir la zone d'expression de MscL-G22S (Fig. 32) Une telle matrice pourrait être insérée au sein du crâne au-dessus de la zone ciblée et protégée par un matériau protecteur. Certains matériaux sont déjà utilisés en clinique pour la reconstruction osseuse du crâne (Ozaki et al. 2017). Cette approche reste donc invasive car elle nécessite une craniotomie, mais elle présente l'avantage de préserver le tissu cérébral proprement dit. Enfin, la personne implantée avec une telle prothèse ultrasonore nécessiterait de porter des lunettes spéciales permettant de décoder la scène visuelle et de transmettre ces informations vers un récepteur capable d'activer les éléments piézoélectriques appropriés.



**Figure 32. Illustration conceptuelle de prothèse visuelle ultrasonore.** La personne receveuse de la thérapie corticale sonogénétique porte des lunettes permettant de décoder la scène visuelle. Ces informations sont ensuite transmises vers un récepteur permettant de stimuler une ou plusieurs matrices ultrasonores sus-durales constituées de plusieurs éléments piézoélectriques couvrant la zone d'expression de MscL-G22S. Ces éléments permettent de stimuler simultanément V1 en différents points focaux afin de coder le stimulus visuel. Modifié d'après Fernandez et al., 2021.

D'autre part, des développements techniques supplémentaires doivent être effectués pour miniaturiser l'échographe alimentant les sondes ultrasonores. Les machines utilisées actuellement représentent un volume d'environ 1 m<sup>3</sup>, alors qu'il faudrait atteindre un dispositif d'une taille et d'un poids tels qu'une personne puisse le transporter avec elle. L'alimentation de ce dispositif putatif doit de plus fonctionner sur batterie et pendant une période d'au moins plusieurs heures.

Enfin, le développement d'un système tout-ultrasonore pour le contrôle et l'imagerie de l'activité neuronale permettrait d'analyser les réponses consécutives aux stimulations sonogénétiques et si besoin de corriger le motif de stimulations sonogénétiques par machine learning. Une étude récente montre la possibilité chez le primate non-humain d'analyser par algorithme la réponse vasculaire d'un essai unique (Norman et al. 2021). Dans ces travaux, les chercheurs révèlent par imagerie fUS l'activité des aires intrapariétales antérieures (AIP) et latérales (LIP), qui sont impliquées respectivement dans la préparation des mouvements oculaires (saccades) et des mouvements des membres (comme pour la saisie d'un objet). Ces deux aires comportent en outre des cartes fonctionnelles spécifiques de la direction du mouvement effectué. Les deux animaux utilisés sont entraînés à effectuer des tâches qui leur imposent d'effectuer selon le stimulus présenté une saccade et un déplacement d'un joystick, vers la gauche ou la droite. En parallèle, les chercheurs ont développé un algorithme de machine learning qui analyse l'activité cérébrale détectée pendant la tâche et de l'associer au comportement effectué. Après quelques essais nécessaires à cet apprentissage, l'algorithme est capable de prédire correctement le comportement effectué par les singes, essai par essai. Cette stratégie pourrait être utilisée pour calibrer de manière efficace les stimulations sonogénétiques pour les patients.

En résumé, l'ensemble de mes travaux ouvre une perspective de validation physiologique et comportementale de la thérapie corticale sonogénétique chez le primate non-humain. L'application de cette thérapie de restauration visuelle chez l'Homme nécessitera de cartographier fonctionnellement chez chaque patient la zone de V1 où injecter le vecteur viral responsable de l'expression du canal mécanosensible. Des travaux supplémentaires pour déterminer les volumes de vecteur viral à injecter et / ou pour développer des vecteurs viraux plus efficaces demeurent nécessaires. Enfin, l'application de cette stratégie nécessitera le développement de matrices ultrasonores sus-durales capables d'être implantées dans le crâne des patients, au-dessus de la zone d'expression du canal mécanosensible.

---

## REFERENCES

---

- AbbVie. 2022. "Phase I/IIa, Open-Label, Dose-Escalation Study of Safety and Tolerability of Intravitreal RST-001 in Patients With Advanced Retinitis Pigmentosa (RP)." Clinical trial registration NCT02556736. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov).  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02556736>.
- "Age-Related Macular Degeneration | NEJM." n.d. Accessed July 6, 2022.  
[https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra0801537?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra0801537?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed).
- Ahmadlou, Mehran, Larry S. Zweifel, and J. Alexander Heimel. 2018. "Functional Modulation of Primary Visual Cortex by the Superior Colliculus in the Mouse." *Nature Communications* 9 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06389-6>.
- Alvarez, Ivan, Andrew J. Parker, and Holly Bridge. 2019. "Normative Cerebral Cortical Thickness for Human Visual Areas." *Neuroimage* 201 (November): 116057.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116057>.
- Al-Zamil, Waseem M, and Sanaa A Yassin. 2017. "Recent Developments in Age-Related Macular Degeneration: A Review." *Clinical Interventions in Aging* 12 (August): 1313–30.  
<https://doi.org/10.2147/CIA.S143508>.
- Andrei, Ariana R., Samantha Debes, Mircea Chelaru, Xiaoqin Liu, Elsa Rodarte, John L. Spudich, Roger Janz, and Valentin Dragoi. 2021. "Heterogeneous Side Effects of Cortical Inactivation in Behaving Animals." *eLife* 10 (September): e66400. <https://doi.org/10.7554/eLife.66400>.
- Andrei, Ariana R., Sorin Pojoga, Roger Janz, and Valentin Dragoi. 2019. "Integration of Cortical Population Signals for Visual Perception." *Nature Communications* 10 (1): 3832.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11736-2>.
- Aydin, Ali-Kemal, William D. Haselden, Yannick Goulam Housen, Christophe Pouzat, Ravi L. Rungta, Charlie Demené, Mickael Tanter, Patrick J. Drew, Serge Charpak, and Davide Boido. 2020. "Transfer Functions Linking Neural Calcium to Single Voxel Functional Ultrasound Signal." *Nature Communications* 11 (June). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16774-9>.
- Baden, Tom, Timm Schubert, Philipp Berens, and Thomas Euler. 2018. "The Functional Organization of Vertebrate Retinal Circuits for Vision." Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience. March 28, 2018. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.68>.
- Baker, Cameron K., and John G. Flannery. 2018. "Innovative Optogenetic Strategies for Vision Restoration." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (September).  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00316>.
- Baranger, Jerome, Bastien Arnal, Fabienne Perren, Olivier Baud, Mickael Tanter, and Charlie Demene. 2018. "Adaptive Spatiotemporal SVD Clutter Filtering for Ultrafast Doppler Imaging Using Similarity of Spatial Singular Vectors." *IEEE Transactions on Medical Imaging* 37 (7): 1574–86.  
<https://doi.org/10.1109/TMI.2018.2789499>.
- Bartolo, M. J., M. A. Gieselmann, V. Vuksanovic, D. Hunter, L. Sun, X. Chen, L. S. Delicato, and A. Thiele. 2011. "Stimulus-Induced Dissociation of Neuronal Firing Rates and Local Field Potential Gamma Power and Its Relationship to the Resonance Blood Oxygen Level-Dependent Signal in Macaque Primary Visual Cortex." *The European Journal of Neuroscience* 34 (11): 1857–70. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07877.x>.
- Batabyal, Subrata, Gregory Cervenka, David Birch, Young-tae Kim, and Samarendra Mohanty. 2015. "Broadband Activation by White-Opsin Lowers Intensity Threshold for Cellular Stimulation." *Scientific Reports* 5 (1): 17857. <https://doi.org/10.1038/srep17857>.

- Batabyal, Subrata, Sanghoon Kim, Weldon Wright, and Samarendra Mohanty. 2021. "Laser-Assisted Targeted Gene Delivery to Degenerated Retina Improves Retinal Function." *Journal of Biophotonics* 14 (1): e202000234. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000234>.
- Beauchamp, Michael S., Denise Oswald, Ping Sun, Brett L. Foster, John F. Magnotti, Soroush Niketeghad, Nader Pouratian, William H. Bosking, and Daniel Yoshor. 2020. "Dynamic Stimulation of Visual Cortex Produces Form Vision in Sighted and Blind Humans." *Cell* 181 (4): 774-783.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.033>.
- Bergel, Antoine, Thomas Deffieux, Charlie Demené, Mickaël Tanter, and Ivan Cohen. 2018. "Local Hippocampal Fast Gamma Rhythms Precede Brain-Wide Hyperemic Patterns during Spontaneous Rodent REM Sleep." *Nature Communications* 9 (December). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07752-3>.
- Bergel, Antoine, Elodie Tiran, Thomas Deffieux, Charlie Demené, Mickaël Tanter, and Ivan Cohen. 2020. "Adaptive Modulation of Brain Hemodynamics across Stereotyped Running Episodes." *Nature Communications* 11 (1): 6193. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19948-7>.
- Berry, Michael H., Amy Holt, Joshua Levitz, Johannes Broichhagen, Benjamin M. Gaub, Meike Visel, Cherise Stanley, et al. 2017. "Restoration of Patterned Vision with an Engineered Photoactivatable G Protein-Coupled Receptor." *Nature Communications* 8 (November). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01990-7>.
- Berry, Michael H., Amy Holt, Autoosa Salari, Julia Veit, Meike Visel, Joshua Levitz, Krisha Aghi, et al. 2019. "Restoration of High-Sensitivity and Adapting Vision with a Cone Opsin." *Nature Communications* 10 (1): 1221. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09124-x>.
- Bionic Sight LLC. 2021. "Phase 1/2, Safety and Efficacy Trial of BS01, a Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Expressing ChronosFP in Patients With Retinitis Pigmentosa." Clinical trial registration NCT04278131. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04278131>.
- Blaize, Kévin, Fabrice Arcizet, Marc Gesnik, Harry Ahnine, Ulisse Ferrari, Thomas Deffieux, Pierre Pouget, et al. 2020. "Functional Ultrasound Imaging of Deep Visual Cortex in Awake Nonhuman Primates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (25): 14453–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916787117>.
- Boido, Davide, Ravi L. Rungta, Bruno-Félix Osmanski, Morgane Roche, Tomokazu Tsurugizawa, Denis Le Bihan, Luisa Ciobanu, and Serge Charpak. 2019. "Mesoscopic and Microscopic Imaging of Sensory Responses in the Same Animal." *Nature Communications* 10 (1): 1110. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09082-4>.
- Born, Richard T., and David C. Bradley. 2005. "Structure and Function of Visual Area MT." *Annual Review of Neuroscience* 28: 157–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131052>.
- Briggs, Farran, and W. Martin Usrey. 2008. "Emerging Views of Corticothalamic Function." *Current Opinion in Neurobiology* 18 (4): 403–7. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.09.002>.
- . 2011. "Corticogeniculate Feedback and Visual Processing in the Primate." *The Journal of Physiology* 589 (Pt 1): 33–40. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.193599>.
- Brindley, G. S., and W. S. Lewin. 1968. "The Sensations Produced by Electrical Stimulation of the Visual Cortex." *The Journal of Physiology* 196 (2): 479–93.
- Brunner, Clément, Micheline Grillet, Arnau Sans-Dublanc, Karl Farrow, Théo Lambert, Emilie Macé, Gabriel Montaldo, and Alan Urban. 2020. "A Platform for Brain-Wide Volumetric Functional Ultrasound Imaging and Analysis of Circuit Dynamics in Awake Mice." *Neuron* 108 (5): 861-875.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.020>.
- Busskamp, Volker, Jens Duebel, David Balya, Mathias Fradot, Tim James Viney, Sandra Siegert, Anna C. Groner, et al. 2010. "Genetic Reactivation of Cone Photoreceptors Restores Visual Responses in Retinitis Pigmentosa." *Science (New York, N.Y.)* 329 (5990): 413–17. <https://doi.org/10.1126/science.1190897>.

- Buzsáki, György, Costas A. Anastassiou, and Christof Koch. 2012. "The Origin of Extracellular Fields and Currents — EEG, ECoG, LFP and Spikes." *Nature Reviews. Neuroscience* 13 (6): 407–20. <https://doi.org/10.1038/nrn3241>.
- Byrne, Leah C., Timothy P. Day, Meike Visel, Jennifer A. Strazzeri, Cécile Fortuny, Deniz Dalkara, William H. Merigan, David V. Schaffer, and John G. Flannery. 2020. "In Vivo-Directed Evolution of Adeno-Associated Virus in the Primate Retina." *JCI Insight* 5 (10): 135112. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.135112>.
- Callaway, E. M. 1998. "Local Circuits in Primary Visual Cortex of the Macaque Monkey." *Annual Review of Neuroscience* 21: 47–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.47>.
- Callaway, Edward M. 2005. "Structure and Function of Parallel Pathways in the Primate Early Visual System." *The Journal of Physiology* 566 (Pt 1): 13–19. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088047>.
- Carrillo-Reid, Luis, Shuting Han, Weijian Yang, Alejandro Akrouh, and Rafael Yuste. 2019. "Controlling Visually Guided Behavior by Holographic Recalling of Cortical Ensembles." *Cell* 178 (2): 447–457.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.045>.
- Cehajic Kapetanovic, Jasmina, Nicole Troelenberg, Thomas L. Edwards, Kanmin Xue, James D. Ramsden, Alfred Stett, Eberhart Zrenner, and Robert E. MacLaren. 2020. "Highest Reported Visual Acuity after Electronic Retinal Implantation." *Acta Ophthalmologica*, April. <https://doi.org/10.1111/aos.14443>.
- Chaffiol, Antoine, Romain Caplette, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Mélissa Desrosiers, Elisabeth Dubus, Laëtitia Duhamel, et al. 2017. "A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina." *Molecular Therapy* 25 (11): 2546–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.011>.
- Chaffiol, Antoine, Matthieu Provansal, Corentin Joffrois, Kévin Blaize, Guillaume Labernede, Ruben Goulet, Emma Burban, et al. 2022. "In Vivo Optogenetic Stimulation of the Primate Retina Activates the Visual Cortex after Long-Term Transduction." *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 24 (March): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.11.009>.
- Chan, Ken Y, Min J Jang, Bryan B Yoo, Alon Greenbaum, Namita Ravi, Wei-Li Wu, Luis Sánchez-Guardado, et al. 2017. "Engineered AAVs for Efficient Noninvasive Gene Delivery to the Central and Peripheral Nervous Systems." *Nature Neuroscience* 20 (8): 1172–79. <https://doi.org/10.1038/nn.4593>.
- Chen, Hui, Elise L. Savier, Victor J. DePiero, and Jianhua Cang. 2021. "Lack of Evidence for Stereotypical Direction Columns in the Mouse Superior Colliculus." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 41 (3): 461–73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1155-20.2020>.
- Chen, Ritchie, Felicity Gore, Quynh-Anh Nguyen, Charu Ramakrishnan, Sneha Patel, Soo Hyun Kim, Misha Raffiee, et al. 2021. "Deep Brain Optogenetics without Intracranial Surgery." *Nature Biotechnology* 39 (2): 161–64. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0679-9>.
- Chen, Spencer Chin-Yu, Giacomo Benvenuti, Yuzhi Chen, Satwant Kumar, Charu Ramakrishnan, Karl Deisseroth, Wilson S. Geisler, and Eyal Seidemann. 2022. "Similar Neural and Perceptual Masking Effects of Low-Power Optogenetic Stimulation in Primate V1." *ELife* 11 (January): e68393. <https://doi.org/10.7554/eLife.68393>.
- Chen, Xing, Feng Wang, Eduardo Fernandez, and Pieter R. Roelfsema. 2020. "Shape Perception via a High-Channel-Count Neuroprosthesis in Monkey Visual Cortex." *Science* 370 (6521): 1191–96. <https://doi.org/10.1126/science.abd7435>.
- Chen, Xinhong, Sripriya Ravindra Kumar, Cameron D. Adams, Daping Yang, Tongtong Wang, Damien A. Wolfe, Cynthia M. Arokiaraj, et al. 2022. "Engineered AAVs for Non-Invasive Gene Delivery to Rodent and Non-Human Primate Nervous Systems." *Neuron* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.05.003>.
- Chernov, Mykyta M., Robert M. Friedman, Gang Chen, Gene R. Stoner, and Anna Wang Roe. 2018. "Functionally Specific Optogenetic Modulation in Primate Visual Cortex." *Proceedings of the*



- National Academy of Sciences*, September, 2018/2018.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1802018115>.
- Cheung, Ning, Paul Mitchell, and Tien Yin Wong. 2010. "Diabetic Retinopathy." *Lancet (London, England)* 376 (9735): 124–36. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62124-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3).
- Chow, Alan Y., Vincent Y. Chow, Kirk H. Packo, John S. Pollack, Gholam A. Peyman, and Ronald Schuchard. 2004. "The Artificial Silicon Retina Microchip for the Treatment of Vision Loss from Retinitis Pigmentosa." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 122 (4): 460–69. <https://doi.org/10.1001/archophth.122.4.460>.
- Connolly, M., and D. Van Essen. 1984. "The Representation of the Visual Field in Parvicellular and Magnocellular Layers of the Lateral Geniculate Nucleus in the Macaque Monkey." *The Journal of Comparative Neurology* 226 (4): 544–64. <https://doi.org/10.1002/cne.902260408>.
- Cruz, Lyndon da, Brian F Coley, Jessy Dorn, Francesco Merlini, Eugene Filley, Punita Christopher, Fred K Chen, et al. 2013. "The Argus II Epiretinal Prosthesis System Allows Letter and Word Reading and Long-Term Function in Patients with Profound Vision Loss." *The British Journal of Ophthalmology* 97 (5): 632–36. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2012-301525>.
- Dalkara, Deniz, Leah C. Byrne, Ryan R. Klimczak, Meike Visel, Lu Yin, William H. Merigan, John G. Flannery, and David V. Schaffer. 2013. "In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous." *Science Translational Medicine* 5 (189): 189ra76. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005708>.
- Deffieux, Thomas, Youliana Younan, Nicolas Wattiez, Mickael Tanter, Pierre Pouget, and Jean-François Aubry. 2013. "Low-Intensity Focused Ultrasound Modulates Monkey Visuomotor Behavior." *Current Biology: CB* 23 (23): 2430–33. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.029>.
- Deisseroth, Karl. 2015. "Optogenetics: 10 Years of Microbial Opsins in Neuroscience." *Nature Neuroscience* 18 (9): 1213–25. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>.
- Demene, Charlie, Jérôme Baranger, Miguel Bernal, Catherine Delanoe, Stéphane Auvin, Valérie Biran, Marianne Alison, et al. 2017. "Functional Ultrasound Imaging of Brain Activity in Human Newborns." *Science Translational Medicine* 9 (411): eaah6756. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6756>.
- Demené, Charlie, Jérôme Mairesse, Jérôme Baranger, Mickael Tanter, and Olivier Baud. 2019. "Ultrafast Doppler for Neonatal Brain Imaging." *NeuroImage* 185 (January): 851–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.04.016>.
- Demené, Charlie, Justine Robin, Alexandre Dizeux, Baptiste Heiles, Mathieu Pernot, Mickael Tanter, and Fabienne Perren. 2021. "Transcranial Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy of Brain Vasculature in Patients." *Nature Biomedical Engineering* 5 (3): 219–28. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00697-x>.
- Dizeux, Alexandre, Marc Gesnik, Harry Ahnine, Kevin Blaize, Fabrice Arcizet, Serge Picaud, José-Alain Sahel, Thomas Deffieux, Pierre Pouget, and Mickael Tanter. 2019. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain Reveals Propagation of Task-Related Brain Activity in Behaving Primates." *Nature Communications* 10 (March). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09349-w>.
- Dobelle, W. H., and M. G. Mladejovsky. 1974. "Phosphenes Produced by Electrical Stimulation of Human Occipital Cortex, and Their Application to the Development of a Prosthesis for the Blind." *The Journal of Physiology* 243 (2): 553-576.1.
- Dobelle, W. H., M. G. Mladejovsky, J. R. Evans, T. S. Roberts, and J. P. Girvin. 1976. "'Braille' Reading by a Blind Volunteer by Visual Cortex Stimulation." *Nature* 259 (5539): 111–12. <https://doi.org/10.1038/259111a0>.
- Dobelle, W. H., M. G. Mladejovsky, and J. P. Girvin. 1974. "Artificial Vision for the Blind: Electrical Stimulation of Visual Cortex Offers Hope for a Functional Prosthesis." *Science (New York, N.Y.)* 183 (4123): 440–44. <https://doi.org/10.1126/science.183.4123.440>.
- Dougherty, Robert F., Volker M. Koch, Alyssa A. Brewer, Bernd Fischer, Jan Modersitzki, and Brian A. Wandell. 2003. "Visual Field Representations and Locations of Visual Areas V1/2/3 in Human Visual Cortex." *Journal of Vision* 3 (10): 1. <https://doi.org/10.1167/3.10.1>.

- Dräger, U. C., and D. H. Hubel. 1976. "Topography of Visual and Somatosensory Projections to Mouse Superior Colliculus." *Journal of Neurophysiology* 39 (1): 91–101. <https://doi.org/10.1152/jn.1976.39.1.91>.
- Duncan, Robert O., Pamela A. Sample, Robert N. Weinreb, Christopher Bowd, and Linda M. Zangwill. 2007. "Retinotopic Organization of Primary Visual Cortex in Glaucoma: Comparing FMRI Measurements of Cortical Function with Visual Field Loss." *Progress in Retinal and Eye Research* 26 (1): 38–56. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.10.001>.
- Edelman, Bradley Jay, Giovanna D. Ielacqua, Russell W. Chan, Mazen Asaad, Mankin Choy, and Jin Hyung Lee. 2021. "High-Sensitivity Detection of Optogenetically-Induced Neural Activity with Functional Ultrasound Imaging." *NeuroImage* 242 (November): 118434. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118434>.
- Ellis, Erika M., Gregory Gauvain, Benjamin Sivyver, and Gabe J. Murphy. 2016. "Shared and Distinct Retinal Input to the Mouse Superior Colliculus and Dorsal Lateral Geniculate Nucleus." *Journal of Neurophysiology* 116 (2): 602–10. <https://doi.org/10.1152/jn.00227.2016>.
- Emiliani, Valentina, Adam E. Cohen, Karl Deisseroth, and Michael Häusser. 2015. "All-Optical Interrogation of Neural Circuits." *The Journal of Neuroscience* 35 (41): 13917–26. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2916-15.2015>.
- Erişir, Alev, Susan C. Van Horn, and S. Murray Sherman. 1997. "Relative Numbers of Cortical and Brainstem Inputs to the Lateral Geniculate Nucleus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (4): 1517–20.
- Errico, Claudia, Juliette Pierre, Sophie Pezet, Yann Desailly, Zsolt Lenkei, Olivier Couture, and Mickael Tanter. 2015. "Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy for Deep Super-Resolution Vascular Imaging." *Nature* 527 (7579): 499–502. <https://doi.org/10.1038/nature16066>.
- Euler, Thomas, Silke Haverkamp, Timm Schubert, and Tom Baden. 2014. "Retinal Bipolar Cells: Elementary Building Blocks of Vision." *Nature Reviews. Neuroscience* 15 (8): 507–19. <https://doi.org/10.1038/nrn3783>.
- Farrow, Karl, Tadashi Isa, Harald Luksch, and Keisuke Yonehara. 2019. "Editorial: The Superior Colliculus/Tectum: Cell Types, Circuits, Computations, Behaviors." *Frontiers in Neural Circuits* 13 (June): 39. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00039>.
- Feinberg, Evan H., and Markus Meister. 2015. "Orientation Columns in the Mouse Superior Colliculus." *Nature* 519 (7542): 229–32. <https://doi.org/10.1038/nature14103>.
- Fenno, Lief, Ofer Yizhar, and Karl Deisseroth. 2011. "The Development and Application of Optogenetics." *Annual Review of Neuroscience* 34: 389–412. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113817>.
- Fernández, Eduardo, Arantxa Alfaro, Cristina Soto-Sánchez, Pablo Gonzalez-Lopez, Antonio M. Lozano, Sebastian Peña, Maria Dolores Grima, et al. 2021. "Visual Percepts Evoked with an Intracortical 96-Channel Microelectrode Array Inserted in Human Occipital Cortex." *The Journal of Clinical Investigation* 131 (23). <https://doi.org/10.1172/JCI151331>.
- Ferrari, Ulisse, Stéphane Deny, Abhishek Sengupta, Romain Caplette, Francesco Trapani, José-Alain Sahel, Deniz Dalkara, Serge Picaud, Jens Duebel, and Olivier Marre. 2020. "Towards Optogenetic Vision Restoration with High Resolution." *PLoS Computational Biology* 16 (7): e1007857. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007857>.
- Fliegeauf, Manfred, Thomas Benzing, and Heymut Omran. 2007. "When Cilia Go Bad: Cilia Defects and Ciliopathies." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (11): 880–93. <https://doi.org/10.1038/nrm2278>.
- Frantz, Michael G. n.d. "Layer 4 Gates Plasticity in Visual Cortex Independent of a Canonical Microcircuit," 18.
- Frezzotti, Paolo, Antonio Giorgio, Ilaria Motolese, Alessandro De Leucio, Michele Iester, Eduardo Motolese, Antonio Federico, and Nicola De Stefano. 2014. "Structural and Functional Brain Changes beyond Visual System in Patients with Advanced Glaucoma." *PLoS ONE* 9 (8): e105931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105931>.

- Gaub, Benjamin M., Michael H. Berry, Amy E. Holt, Andreas Reiner, Michael A. Kienzler, Natalia Dolgova, Sergei Nikonov, et al. 2014. "Restoration of Visual Function by Expression of a Light-Gated Mammalian Ion Channel in Retinal Ganglion Cells or ON-Bipolar Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (51): E5574–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414162111>.
- Gauvain, Gregory, Himanshu Akolkar, Antoine Chaffiol, Fabrice Arcizet, Mina A. Khoei, Mélissa Desrosiers, Céline Jaillard, et al. 2021. "Optogenetic Therapy: High Spatiotemporal Resolution and Pattern Discrimination Compatible with Vision Restoration in Non-Human Primates." *Communications Biology* 4 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01594-w>.
- GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators and Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. 2021. "Causes of Blindness and Vision Impairment in 2020 and Trends over 30 Years, and Prevalence of Avoidable Blindness in Relation to VISION 2020: The Right to Sight: An Analysis for the Global Burden of Disease Study." *The Lancet. Global Health* 9 (2): e144–60. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30489-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30489-7).
- GenSight Biologics. 2020. "A Phase 1/2a, Open-Label, Non-Randomized, Dose-Escalation Study to Evaluate the Safety and Tolerability of GS030 in Subjects With Retinitis Pigmentosa." Clinical trial registration NCT03326336. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03326336>.
- Germano, Renato A. S., Caroline S. Germano, Fernanda N. Susanna, and Remo Susanna. 2022. "Patterns of Visual Field Loss in Early, Moderate, and Severe Stages of Open Angle Glaucoma." *Journal of Glaucoma* 31 (7): 609–13. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000001986>.
- Gesnik, Marc, Kevin Blaize, Thomas Deffieux, Jean-Luc Gennisson, José-Alain Sahel, Mathias Fink, Serge Picaud, and Mickaël Tanter. 2017. "3D Functional Ultrasound Imaging of the Cerebral Visual System in Rodents." *Neuroimage* 149 (April): 267–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.01.071>.
- Ghezzi, Diego. 2015. "Retinal Prostheses: Progress toward the next Generation Implants." *Frontiers in Neuroscience* 9 (August): 290. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00290>.
- Golding, Nace L., Nathan P. Staff, and Nelson Spruston. 2002. "Dendritic Spikes as a Mechanism for Cooperative Long-Term Potentiation." *Nature* 418 (6895): 326–31. <https://doi.org/10.1038/nature00854>.
- Gong, Xin, Diego Mendoza-Halliday, Jonathan T. Ting, Tobias Kaiser, Xuyun Sun, André M. Bastos, Ralf D. Wimmer, et al. 2020. "An Ultra-Sensitive Step-Function Opsin for Minimally Invasive Optogenetic Stimulation in Mice and Macaques." *Neuron* 107 (1): 197. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.018>.
- Good, William V. 2009. "Cortical Visual Impairment: New Directions." *Optometry and Vision Science : Official Publication of the American Academy of Optometry* 86 (6): 663–65. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181a6176a>.
- Gray, Steven J., Sahana Nagabhushan Kalburgi, Thomas J. McCown, and R. Jude Samulski. 2013. "Global CNS Gene Delivery and Evasion of Anti-AAV Neutralizing Antibodies by Intrathecal AAV Administration in Non-Human Primates." *Gene Therapy* 20 (4): 450–59. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.101>.
- Grunda, Tomas, Petr Marsalek, and Pavla Sykorova. 2013. "Homonymous Hemianopia and Related Visual Defects: Restoration of Vision after a Stroke." *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 73 (2): 237–49.
- Grzybowski, Andrzej, Magdalena Zülsdorff, Helmut Wilhelm, and Felix Tonagel. 2015. "Toxic Optic Neuropathies: An Updated Review." *Acta Ophthalmologica* 93 (5): 402–10. <https://doi.org/10.1111/aos.12515>.
- Guillery, R. W. 1969. "The Organization of Synaptic Interconnections in the Laminae of the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Cat." *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)* 96 (1): 1–38. <https://doi.org/10.1007/BF00321474>.

- Guo, Hongsun, Mark Hamilton Li, Sarah J. Offutt, Cory D. Gloeckner, Tianqi Li, Yohan Kim, Wynn Legon, Jamu K. Alford, and Hubert H. Lim. 2018. "Ultrasound Produces Extensive Brain Activation via a Cochlear Pathway." *Neuron* 99 (4): 866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.049>.
- Hammer, Sarah, Aboozar Monavarfeshani, Tyler Lemon, Jianmin Su, and Michael Andrew Fox. 2015. "Multiple Retinal Axons Converge onto Relay Cells in the Adult Mouse Thalamus." *Cell Reports* 12 (10): 1575–83. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.003>.
- Handwerker, Daniel A., John M. Ollinger, and Mark D'Esposito. 2004. "Variation of BOLD Hemodynamic Responses across Subjects and Brain Regions and Their Effects on Statistical Analyses." *NeuroImage* 21 (4): 1639–51. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.11.029>.
- Hartong, Dyonne T., Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 2006. "Retinitis Pigmentosa." *The Lancet* 368 (9549): 1795–1809. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69740-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69740-7).
- Harvey, E. Newton. 1929. "The Effect of High Frequency Sound Waves on Heart Muscle and Other Irritable Tissues." *American Journal of Physiology-Legacy Content* 91 (1): 284–90. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1929.91.1.284>.
- Haswell, Elizabeth S., Rob Phillips, and Douglas C. Rees. 2011. "Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It?" *Structure (London, England: 1993)* 19 (10): 1356–69. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.005>.
- Heureaux, Johanna, Di Chen, Victoria L. Murray, Cheri X. Deng, and Allen P. Liu. 2014. "Activation of a Bacterial Mechanosensitive Channel in Mammalian Cells by Cytoskeletal Stress." *Cellular and Molecular Bioengineering* 7 (3): 307–19. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0337-8>.
- Ho, Chun Lum Andy, Robert Zimmermann, Juan Daniel Flórez Weidinger, Mario Prsa, Manuel Schottdorf, Sam Merlin, Tsuyoshi Okamoto, et al. 2021. "Orientation Preference Maps in Microcebus Murinus Reveal Size-Invariant Design Principles in Primate Visual Cortex." *Current Biology* 31 (4): 733-741.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.027>.
- Hoy, Jennifer L., Hannah I. Bishop, and Christopher M. Niell. 2019. "Defined Cell Types in Superior Colliculus Make Distinct Contributions to Prey Capture Behavior in the Mouse." *Current Biology: CB* 29 (23): 4130-4138.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.017>.
- Huang, Yao-Shen, Ching-Hsiang Fan, Ning Hsu, Nai-Hua Chiu, Chun-Yao Wu, Chu-Yuan Chang, Bing-Huan Wu, et al. 2020. "Sonogenetic Modulation of Cellular Activities Using an Engineered Auditory-Sensing Protein." *Nano Letters* 20 (2): 1089–1100. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04373>.
- Humayun, Mark S., Jessy D. Dorn, Lyndon da Cruz, Gislin Dagnelie, José-Alain Sahel, Paulo E. Stanga, Artur V. Cideciyan, et al. 2012. "Interim Results from the International Trial of Second Sight's Visual Prosthesis." *Ophthalmology* 119 (4): 779–88. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.09.028>.
- Ibsen, Stuart, Ada Tong, Carolyn Schutt, Sadik Esener, and Sreekanth H. Chalasani. 2015. "Sonogenetics Is a Non-Invasive Approach to Activating Neurons in Caenorhabditis Elegans." *Nature Communications* 6 (September): 8264. <https://doi.org/10.1038/ncomms9264>.
- Imbault, Marion, Dorian Chauvet, Jean-Luc Gennisson, Laurent Capelle, and Mickael Tanter. 2017. "Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity." *Scientific Reports* 7 (1): 7304. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06474-8>.
- Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, France. 2022. "A Phase I/II, Open Labeled, Monocentric Study of Direct Intracranial Administration of a Replication Deficient Adeno-Associated Virus Gene Transfer Vector Serotype Rh.10 Expressing the Human ARSA CDNA to Children With Metachromatic Leukodystrophy." Clinical trial registration NCT01801709. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01801709](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01801709).
- Ivanova, Elena, Grace-Soon Hwang, Zhuo-Hua Pan, and David Troilo. 2010. "Evaluation of AAV-Mediated Expression of Chop2-GFP in the Marmoset Retina." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (10): 5288–96. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5389>.

- Jazayeri, Mehrdad, Zachary Lindbloom-Brown, and Gregory D. Horwitz. 2012. "Saccadic Eye Movements Evoked by Optogenetic Activation of Primate V1." *Nature Neuroscience* 15 (10): 1368–70. <https://doi.org/10.1038/nn.3210>.
- Ju, Niansheng, Rundong Jiang, Stephen L. Macknik, Susana Martinez-Conde, and Shiming Tang. 2018. "Long-Term All-Optical Interrogation of Cortical Neurons in Awake-Behaving Nonhuman Primates." *PLoS Biology* 16 (8): e2005839. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005839>.
- Kandel, Eric R., John Koester, Sarah Mack, and Steven Siegelbaum, eds. 2021. *Principles of Neural Science*. Sixth edition. New York: McGraw Hill.
- Khabou, Hanen, Marcela Garita-Hernandez, Antoine Chaffiol, Sacha Reichman, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Stéphane Bertin, et al. 2018. "Noninvasive Gene Delivery to Foveal Cones for Vision Restoration." *JCI Insight* 3 (2). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96029>.
- Khateeb, Karam, Devon J. Griggs, Philip N. Sabes, and Azadeh Yazdan-Shahmorad. 2019. "Convection Enhanced Delivery of Optogenetic Adeno-Associated Viral Vector to the Cortex of Rhesus Macaque Under Guidance of Online MRI Images." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 147 (May). <https://doi.org/10.3791/59232>.
- Klapoetke, Nathan C., Yasunobu Murata, Sung Soo Kim, Stefan R. Pulver, Amanda Birdsey-Benson, Yong Ku Cho, Tania K. Morimoto, et al. 2014. "Independent Optical Excitation of Distinct Neural Populations." *Nature Methods* 11 (3): 338–46. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>.
- Kleinlogel, Sonja, Katrin Feldbauer, Robert E. Dempski, Heike Fotis, Phillip G. Wood, Christian Bamann, and Ernst Bamberg. 2011. "Ultra Light-Sensitive and Fast Neuronal Activation with the Ca<sup>2+</sup>-Permeable Channelrhodopsin CatCh." *Nature Neuroscience* 14 (4): 513–18. <https://doi.org/10.1038/nn.2776>.
- Klink, P. Christiaan, Xing Chen, Wim Vanduffel, and Pieter R. Roelfsema. 2021. "Population Receptive Fields in Nonhuman Primates from Whole-Brain fMRI and Large-Scale Neurophysiology in Visual Cortex." *eLife* 10 (November): e67304. <https://doi.org/10.7554/eLife.67304>.
- Krahe, Thomas E., Rana N. El-Danaf, Emily K. Dilger, Scott C. Henderson, and William Guido. 2011. "Morphologically Distinct Classes of Relay Cells Exhibit Regional Preferences in the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Mouse." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (48): 17437–48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4370-11.2011>.
- Krauzlis, Richard J., Lee P. Lovejoy, and Alexandre Zénon. 2013. "Superior Colliculus and Visual Spatial Attention." *Annual Review of Neuroscience* 36 (July): 165–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170249>.
- Kubaneck, Jan, Jingyi Shi, Jon Marsh, Di Chen, Cheri Deng, and Jianmin Cui. 2016. "Ultrasound Modulates Ion Channel Currents." *Scientific Reports* 6 (April): 24170. <https://doi.org/10.1038/srep24170>.
- Kubaneck, Jan, Poojan Shukla, Alakananda Das, Stephen A. Baccus, and Miriam B. Goodman. 2018. "Ultrasound Elicits Behavioral Responses through Mechanical Effects on Neurons and Ion Channels in a Simple Nervous System." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 38 (12): 3081–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1458-17.2018>.
- Lagali, Ps, Balya D, Awatramani Gb, Münch Ta, Kim Ds, Busskamp V, Cepko Cl, and Botond Roska. 2008. "Light-Activated Channels Targeted to ON Bipolar Cells Restore Visual Function in Retinal Degeneration." *Nature Neuroscience*. *Nat Neurosci*. June 2008. <https://doi.org/10.1038/nn.2117>.
- Lechner, Judith, Olivia E. O'Leary, and Alan W. Stitt. 2017. "The Pathology Associated with Diabetic Retinopathy." *Vision Research, Diabetic Retinopathy - an Overview*, 139 (October): 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.04.003>.
- Legon, Wynn, Priya Bansal, Roman Tyshynsky, Leo Ai, and Jerel K. Mueller. 2018. "Transcranial Focused Ultrasound Neuromodulation of the Human Primary Motor Cortex." *Scientific Reports* 8 (1): 10007. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28320-1>.

- Legon, Wynn, Tomokazu F. Sato, Alexander Opitz, Jerel Mueller, Aaron Barbour, Amanda Williams, and William J. Tyler. 2014. "Transcranial Focused Ultrasound Modulates the Activity of Primary Somatosensory Cortex in Humans." *Nature Neuroscience* 17 (2): 322–29. <https://doi.org/10.1038/nn.3620>.
- Li, Junping, Ramesh C. Tripathi, and Brenda J. Tripathi. 2008. "Drug-Induced Ocular Disorders." *Drug Safety* 31 (2): 127–41. <https://doi.org/10.2165/00002018-200831020-00003>.
- Liang, Feixue, Xiaorui R. Xiong, Brian Zingg, Xu-ying Ji, Li I. Zhang, and Huizhong W. Tao. 2015. "Sensory Cortical Control of a Visually Induced Arrest Behavior via Corticotectal Projections." *Neuron* 86 (3): 755–67. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.048>.
- Lima, Bruss, Mariana M. B. Cardoso, Yevgeniy B. Sirotin, and Aniruddha Das. 2014. "Stimulus-Related Neuroimaging in Task-Engaged Subjects Is Best Predicted by Concurrent Spiking." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (42): 13878–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1595-14.2014>.
- Lin, Bin, Amane Koizumi, Nobushige Tanaka, Satchidananda Panda, and Richard H. Masland. 2008. "Restoration of Visual Function in Retinal Degeneration Mice by Ectopic Expression of Melanopsin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (41): 16009–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806114105>.
- Lin, John Y., Per Magne Knutsen, Arnaud Muller, David Kleinfeld, and Roger Y. Tsien. 2013. "ReaChR: A Red-Shifted Variant of Channelrhodopsin Enables Deep Transcranial Optogenetic Excitation." *Nature Neuroscience* 16 (10): 1499–1508. <https://doi.org/10.1038/nn.3502>.
- Linghu, Changyang, I.-Wen Chen, Dimitrii Tanese, Valeria Zampini, and Or A. Shemesh. 2022. "Single-Cell Resolution Optogenetics Via Expression of Soma-Targeted Rhodopsins." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2501: 229–57. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2329-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2329-9_11).
- Liu, Yu-Chi, Mark Wilkins, Terry Kim, Boris Malyugin, and Jodhbir S. Mehta. 2017. "Cataracts." *The Lancet* 390 (10094): 600–612. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30544-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30544-5).
- Livingstone, M., and D. Hubel. 1988. "Segregation of Form, Color, Movement, and Depth: Anatomy, Physiology, and Perception." *Science (New York, N.Y.)* 240 (4853): 740–49. <https://doi.org/10.1126/science.3283936>.
- Logothetis, N. K., J. Pauls, M. Augath, T. Trinath, and A. Oeltermann. 2001. "Neurophysiological Investigation of the Basis of the fMRI Signal." *Nature* 412 (6843): 150–57. <https://doi.org/10.1038/35084005>.
- Losonczy, Attila, and Jeffrey C. Magee. 2006. "Integrative Properties of Radial Oblique Dendrites in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons." *Neuron* 50 (2): 291–307. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.016>.
- Mace, E., G. Montaldo, B. Osmani, I. Cohen, M. Fink, and M. Tanter. 2013. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain: Theory and Basic Principles." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 60 (3): 492–506. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2013.2592>.
- Macé, Emilie, Romain Caplette, Olivier Marre, Abhishek Sengupta, Antoine Chaffiol, Peggy Barbe, Mélissa Desrosiers, et al. 2015. "Targeting Channelrhodopsin-2 to ON-Bipolar Cells With Vitreally Administered AAV Restores ON and OFF Visual Responses in Blind Mice." *Molecular Therapy* 23 (1): 7–16. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.154>.
- Macé, Emilie, Gabriel Montaldo, Ivan Cohen, Michel Baulac, Mathias Fink, and Mickael Tanter. 2011. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain." *Nature Methods* 8 (8): 662–64. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1641>.
- Macé, Émilie, Gabriel Montaldo, Stuart Trenholm, Cameron Cowan, Alexandra Brignall, Alan Urban, and Botond Roska. 2018. "Whole-Brain Functional Ultrasound Imaging Reveals Brain Modules for Visuomotor Integration." *Neuron* 100 (5): 1241–1251.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.031>.
- Madisen, Linda, Aleena R. Garner, Daisuke Shimaoka, Amy S. Chuong, Nathan C. Klapoetke, Lu Li, Alexander van der Bourg, et al. 2015. "Transgenic Mice for Intersectional Targeting of Neural

- Sensors and Effectors with High Specificity and Performance." *Neuron* 85 (5): 942–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.022>.
- Mager, Thomas, David Lopez de la Morena, Verena Senn, Johannes Schlotte, Anna D Errico, Katrin Feldbauer, Christian Wrobel, et al. 2018. "High Frequency Neural Spiking and Auditory Signaling by Ultrafast Red-Shifted Optogenetics." *Nature Communications* 9 (1): 1750. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04146-3>.
- Maier, Alexander, Melanie Wilke, Christopher Aura, Charles Zhu, Frank Q. Ye, and David A. Leopold. 2008. "Divergence of fMRI and Neural Signals in V1 during Perceptual Suppression in the Awake Monkey." *Nature Neuroscience* 11 (10): 1193–1200. <https://doi.org/10.1038/nn.2173>.
- Marie, Mélanie, Valérie Forster, Stéphane Fouquet, Pascal Berto, Coralie Barrau, Camille Ehrismann, José-Alain Sahel, Gilles Tessier, and Serge Picaud. 2020. "Phototoxic Damage to Cone Photoreceptors Can Be Independent of the Visual Pigment: The Porphyrin Hypothesis." *Cell Death & Disease* 11 (8): 711. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02918-8>.
- Marshel, James H., Yoon Seok Kim, Timothy A. Machado, Sean Quirin, Brandon Benson, Jonathan Kadmon, Cephra Raja, et al. 2019. "Cortical Layer-Specific Critical Dynamics Triggering Perception." *Science (New York, N.Y.)* 365 (6453). <https://doi.org/10.1126/science.aaw5202>.
- Masland, Richard H. 2012a. "The Tasks of Amacrine Cells." *Visual Neuroscience* 29 (1): 3–9. <https://doi.org/10.1017/s0952523811000344>.
- . 2012b. "The Neuronal Organization of the Retina." *Neuron* 76 (2): 266–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.002>.
- Mathieson, Keith, James Loudin, Georges Goetz, Philip Huie, Lele Wang, Theodore I. Kamins, Ludwig Galambos, et al. 2012. "Photovoltaic Retinal Prosthesis with High Pixel Density." *Nature Photonics* 6 (6): 391–97. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.104>.
- McAlinden, Niall, Yunzhou Cheng, Robert Scharf, Enyuan Xie, Erdan Gu, Christopher F. Reiche, Rohit Sharma, et al. 2019. "Multisite MicroLED Optrode Array for Neural Interfacing." *Neurophotonics* 6 (3): 035010. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.6.3.035010>.
- McGregor, Juliette E., Tyler Godat, Kamal R. Dhakal, Keith Parkins, Jennifer M. Strazzeri, Brittany A. Bateman, William S. Fischer, David R. Williams, and William H. Merigan. 2020. "Optogenetic Restoration of Retinal Ganglion Cell Activity in the Living Primate." *Nature Communications* 11 (1): 1703. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15317-6>.
- McPhee, S. W. J., C. G. Janson, C. Li, R. J. Samulski, A. S. Camp, J. Francis, D. Shera, et al. 2006. "Immune Responses to AAV in a Phase I Study for Canavan Disease." *The Journal of Gene Medicine* 8 (5): 577–88. <https://doi.org/10.1002/jgm.885>.
- Melnick, Michael D., Dujie Tadin, and Krystal R. Huxlin. 2016. "Relearning to See in Cortical Blindness." *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 22 (2): 199–212. <https://doi.org/10.1177/1073858415621035>.
- Michalski, Nicolas, and Christine Petit. 2015. "Genetics of Auditory Mechano-Electrical Transduction." *Pflugers Archiv* 467 (1): 49–72. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1552-9>.
- Miezin, F. M., L. Maccotta, J. M. Ollinger, S. E. Petersen, and R. L. Buckner. 2000. "Characterizing the Hemodynamic Response: Effects of Presentation Rate, Sampling Procedure, and the Possibility of Ordering Brain Activity Based on Relative Timing." *NeuroImage* 11 (6 Pt 1): 735–59. <https://doi.org/10.1006/nimg.2000.0568>.
- Mocanu, Victor M., and Amir Shmuel. 2021. "Optical Imaging-Based Guidance of Viral Microinjections and Insertion of a Laminar Electrophysiology Probe Into a Predetermined Barrel in Mouse Area S1BF." *Frontiers in Neural Circuits* 15: 541676. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.541676>.
- Mukamel, Roy, Hagar Gelbard, Amos Arieli, Uri Hasson, Itzhak Fried, and Rafael Malach. 2005. "Coupling Between Neuronal Firing, Field Potentials, and fMRI in Human Auditory Cortex." *Science* 309 (5736): 951–54. <https://doi.org/10.1126/science.1110913>.
- Nakamichi, Yu, Kai Okubo, Takayuki Sato, Mitsuhiro Hashimoto, and Manabu Tanifuji. 2019. "Optical Intrinsic Signal Imaging with Optogenetics Reveals Functional Cortico-Cortical Connectivity at

- the Columnar Level in Living Macaques." *Scientific Reports* 9 (1): 6466. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42923-2>.
- Nassi, Jonathan J., and Edward M. Callaway. 2009. "Parallel Processing Strategies of the Primate Visual System." *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (5): 360–72. <https://doi.org/10.1038/nrn2619>.
- Nassi, Jonathan J., Michael C. Avery, Ali H. Cetin, Anna W. Roe, and John H. Reynolds. 2015. "Optogenetic Activation of Normalization in Alert Macaque Visual Cortex." *Neuron* 86 (6): 1504–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.040>.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). 2022. "A Phase I Study of Intrathecal Administration of ScAAV9/JeT-GAN for the Treatment of Giant Axonal Neuropathy." Clinical trial registration NCT02362438. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02362438>.
- Ni, Amy M., and John H.R. Maunsell. 2010. "Microstimulation Reveals Limits in Detecting Different Signals from a Local Cortical Region." *Current Biology : CB* 20 (9): 824–28. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.065>.
- Nickells, Robert W., Gareth R. Howell, Ileana Soto, and Simon W. M. John. 2012. "Under Pressure: Cellular and Molecular Responses during Glaucoma, a Common Neurodegeneration with Axonopathy." *Annual Review of Neuroscience* 35: 153–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135728>.
- Niessing, Jörn, Boris Ebisch, Kerstin E. Schmidt, Michael Niessing, Wolf Singer, and Ralf A. W. Galuske. 2005. "Hemodynamic Signals Correlate Tightly with Synchronized Gamma Oscillations." *Science* 309 (5736): 948–51. <https://doi.org/10.1126/science.1110948>.
- Nir, Yuval, Ilan Dinstein, Rafael Malach, and David J Heeger. 2008. "BOLD and Spiking Activity." *Nature Neuroscience* 11 (5): 523–24. <https://doi.org/10.1038/nn0508-523>.
- Norman, Sumner L., David Maresca, Vassilios N. Christopoulos, Whitney S. Griggs, Charlie Demene, Mickael Tanter, Mikhail G. Shapiro, and Richard A. Andersen. 2021. "Single-Trial Decoding of Movement Intentions Using Functional Ultrasound Neuroimaging." *Neuron* 109 (9): 1554–1566.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.003>.
- Nunez-Elizalde, Anwar O., Michael Krumin, Charu Bai Reddy, Gabriel Montaldo, Alan Urban, Kenneth D. Harris, and Matteo Carandini. 2022. "Neural Correlates of Blood Flow Measured by Ultrasound." *Neuron* 110 (10): 1631–1640.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.02.012>.
- Nurminen, Lauri, Sam Merlin, Maryam Bijanzadeh, Frederick Federer, and Alessandra Angelucci. 2018. "Top-down Feedback Controls Spatial Summation and Response Amplitude in Primate Visual Cortex." *Nature Communications* 9 (1): 2281. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04500-5>.
- Oda, Kazumasa, Johannes Vierock, Satomi Oishi, Silvia Rodriguez-Rozada, Reiya Taniguchi, Keitaro Yamashita, J. Simon Wiegert, Tomohiro Nishizawa, Peter Hegemann, and Osamu Nureki. 2018. "Crystal Structure of the Red Light-Activated Channelrhodopsin Chrimson." *Nature Communications* 9 (1): 3949. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06421-9>.
- Ortiz-Rios, Michael, Beshoy Agayby, Fabien Balezeau, Marcus Haag, Samy Rima, and Michael C. Schmid. 2021. "Optogenetic Stimulation of Primate V1 Reveals Local Laminar and Large-Scale Cortical Networks Related to Perceptual Phosphenes." *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.01.446505>.
- Ozaki, Mine, Keigo Narita, Masakazu Kurita, Yuki Iwashina, Akihiko Takushima, and Kiyonori Harii. 2017. "Implantation of Thickened Artificial Bone for Reduction of Dead Space and Prevention of Infection Between Implant and Dura in Secondary Reconstruction of the Skull." *The Journal of Craniofacial Surgery* 28 (4): 888–91. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000003507>.
- Palanker, D., Y. Le Mer, S. Mohand-Said, and J. A. Sahel. 2022. "Simultaneous Perception of Prosthetic and Natural Vision in AMD Patients." *Nature Communications* 13 (January): 513. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28125-x>.



- Palanker, Daniel, Yannick Le Mer, Saddek Mohand-Said, Mahiul Muqit, and Jose A. Sahel. 2020. "Photovoltaic Restoration of Central Vision in Atrophic Age-Related Macular Degeneration." *Ophthalmology* 127 (8): 1097–1104. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.02.024>.
- Pan, Yijia, Sangpil Yoon, Jie Sun, Ziliang Huang, Changyang Lee, Molly Allen, Yiqian Wu, et al. 2018. "Mechanogenetics for the Remote and Noninvasive Control of Cancer Immunotherapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (5): 992–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714900115>.
- Petrs-Silva, Hilda, Astra Dinculescu, Qihong Li, Wen-Tao Deng, Ji-Jing Pang, Seok-Hong Min, Vince Chiodo, et al. 2011. "Novel Properties of Tyrosine-Mutant AAV2 Vectors in the Mouse Retina." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.234>.
- Piguet, Françoise, Sandro Alves, and Nathalie Cartier. 2017. "Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future." *Human Gene Therapy* 28 (11): 988–1003. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.160>.
- Prévot, Paul-Henri, Kevin Gehere, Fabrice Arcizet, Himanshu Akolkar, Mina A. Khoei, Kévin Blaize, Omar Oubari, et al. 2020. "Behavioural Responses to a Photovoltaic Subretinal Prosthesis Implanted in Non-Human Primates." *Nature Biomedical Engineering* 4 (2): 172–80. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0484-2>.
- Prieto, Martin Loynaz, Kamyar Firouzi, Butrus T. Khuri-Yakub, and Merritt Maduke. 2018. "Activation of Piezo1 but Not Nav1.2 Channels by Ultrasound at 43 MHz." *Ultrasound in Medicine & Biology* 44 (6): 1217–32. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.12.020>.
- Pula, John H., and Carlen A. Yuen. 2017. "Eyes and Stroke: The Visual Aspects of Cerebrovascular Disease." *Stroke and Vascular Neurology* 2 (4): 210–20. <https://doi.org/10.1136/svn-2017-000079>.
- Qiu, Zhihai, Jinghui Guo, Shashwati Kala, Jiejun Zhu, Quanxiang Xian, Weibao Qiu, Guofeng Li, et al. 2019. "The Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Significantly Mediates In Vitro Ultrasonic Stimulation of Neurons." *iScience* 21 (November): 448–57. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.037>.
- Qiu, Zhihai, Shashwati Kala, Jinghui Guo, Quanxiang Xian, Jiejun Zhu, Ting Zhu, Xuandi Hou, et al. 2020. "Targeted Neurostimulation in Mouse Brains with Non-Invasive Ultrasound." *Cell Reports* 32 (7): 108033. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108033>.
- Rajalingham, Rishi, Michael Sorenson, Reza Azadi, Simon Bohn, James J. DiCarlo, and Arash Afraz. 2021. "Chronically Implantable LED Arrays for Behavioral Optogenetics in Primates." *Nature Methods* 18 (9): 1112–16. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01238-9>.
- Rees, Geraint, Karl Friston, and Christof Koch. 2000. "A Direct Quantitative Relationship between the Functional Properties of Human and Macaque V5." *Nature Neuroscience* 3 (August): 716–23. <https://doi.org/10.1038/76673>.
- Roska, Botond, and José-Alain Sahel. 2018. "Restoring Vision." *Nature* 557 (7705): 359–67. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0076-4>.
- Rungta, Ravi L, Bruno-Félix Osmanski, Davide Boido, Mickael Tanter, and Serge Charpak. 2017. "Light Controls Cerebral Blood Flow in Naive Animals." *Nature Communications* 8 (January). <https://doi.org/10.1038/ncomms14191>.
- Sadakane, Osamu, Yoshito Masamizu, Akiya Watakabe, Shin-Ichiro Terada, Masanari Ohtsuka, Masafumi Takaji, Hiroaki Mizukami, et al. 2015. "Long-Term Two-Photon Calcium Imaging of Neuronal Populations with Subcellular Resolution in Adult Non-Human Primates." *Cell Reports* 13 (9): 1989–99. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.050>.
- Sahel, José-Alain, Elise Boulanger-Scemama, Chloé Pagot, Angelo Arleo, Francesco Galluppi, Joseph N. Martel, Simona Degli Esposti, et al. 2021. "Partial Recovery of Visual Function in a Blind Patient after Optogenetic Therapy." *Nature Medicine* 27 (7): 1223–29. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01351-4>.
- Sans-Dublanc, Arnau, Anna Chrzanowska, Katja Reinhard, Dani Lemmon, Bram Nuttin, Théo Lambert, Gabriel Montaldo, Alan Urban, and Karl Farrow. 2021. "Optogenetic FUSI for Brain-Wide

- Mapping of Neural Activity Mediating Collicular-Dependent Behaviors." *Neuron* 0 (0).  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.04.008>.
- Schiller, Peter H., Warren M. Slocum, Michelle C. Kwak, Geoffrey L. Kendall, and Edward J. Tehovnik. 2011. "New Methods Devised Specify the Size and Color of the Spots Monkeys See When Striate Cortex (Area V1) Is Electrically Stimulated." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (43): 17809–14.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1108337108>.
- Seabrook, Tania A., Timothy J. Burbridge, Michael C. Crair, and Andrew D. Huberman. 2017. "Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System." *Annual Review of Neuroscience* 40: 499–538. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033842>.
- Shang, Congping, Zihui Liu, Zijun Chen, Yingchao Shi, Qian Wang, Su Liu, Dapeng Li, and Peng Cao. 2015. "BRAIN CIRCUITS. A Parvalbumin-Positive Excitatory Visual Pathway to Trigger Fear Responses in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 348 (6242): 1472–77.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaa8694>.
- Shemesh, Or A., Dimitrii Tanese, Valeria Zampini, Changyang Linghu, Kiryl Piatkevich, Emiliano Ronzitti, Eirini Papagiakoumou, Edward S. Boyden, and Valentina Emiliani. 2017. "Temporally Precise Single-Cell Resolution Optogenetics." *Nature Neuroscience* 20 (12): 1796–1806.  
<https://doi.org/10.1038/s41593-017-0018-8>.
- Soloperto, Alessandro, Anna Boccaccio, Andrea Contestabile, Monica Moroni, Grace I. Hallinan, Gemma Palazzolo, John Chad, Katrin Deinhardt, Dario Carugo, and Francesco Difato. 2018. "Mechano-Sensitization of Mammalian Neuronal Networks through Expression of the Bacterial Large-Conductance Mechanosensitive Ion Channel." *Journal of Cell Science* 131 (5): jcs210393. <https://doi.org/10.1242/jcs.210393>.
- Spruston, Nelson. 2008. "Pyramidal Neurons: Dendritic Structure and Synaptic Integration." *Nature Reviews. Neuroscience* 9 (3): 206–21. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>.
- Spudich, John L. 2006. "The Multitalented Microbial Sensory Rhodopsins." *Trends in Microbiology* 14 (11): 480–87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.09.005>.
- Sridharan, Savitha, Marta A. Gajowa, Mora B. Ogando, Uday K. Jagadisan, Lamiae Abdeladim, Masato Sadahiro, Hayley A. Bounds, et al. 2022. "High-Performance Microbial Opsins for Spatially and Temporally Precise Perturbations of Large Neuronal Networks." *Neuron* 110 (7): 1139–1155.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.01.008>.
- Steinmetz, Nicholas A., Cagatay Aydin, Anna Lebedeva, Michael Okun, Marius Pachitariu, Marius Bauza, Maxime Beau, et al. 2021. "Neuropixels 2.0: A Miniaturized High-Density Probe for Stable, Long-Term Brain Recordings." *Science* 372 (6539).  
<https://doi.org/10.1126/science.abf4588>.
- Stingl, Katarina, Karl Ulrich Bartz-Schmidt, Dorothea Besch, Angelika Braun, Anna Bruckmann, Florian Gekeler, Udo Greppmaier, et al. 2013. "Artificial Vision with Wirelessly Powered Subretinal Electronic Implant Alpha-IMS." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280 (1757): 20130077. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0077>.
- Stronks, H Christiaan, and Gislin Dagnelie. 2014. "The Functional Performance of the Argus II Retinal Prosthesis." *Expert Review of Medical Devices* 11 (1): 23–30.  
<https://doi.org/10.1586/17434440.2014.862494>.
- Stujenske, Joseph M., Timothy Spellman, and Joshua A. Gordon. 2015. "Modeling the Spatiotemporal Dynamics of Light and Heat Propagation for In Vivo Optogenetics." *Cell Reports* 12 (3): 525–34. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.036>.
- Sukharev, S., M. Betanzos, C. S. Chiang, and H. R. Guy. 2001. "The Gating Mechanism of the Large Mechanosensitive Channel Mscl." *Nature* 409 (6821): 720–24.  
<https://doi.org/10.1038/35055559>.
- Takahashi, Daniel Y, Ahmed El Hady, Yisi S Zhang, Diana A Liao, Gabriel Montaldo, Alan Urban, and Asif A Ghazanfar. 2021. "Social-Vocal Brain Networks in a Non-Human Primate." Preprint. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2021.12.01.470701>.

- Tanaka, K. 1996. "Inferotemporal Cortex and Object Vision." *Annual Review of Neuroscience* 19: 109–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.000545>.
- Tchedre, Kissaou T., Subrata Batabyal, Melissa Galicia, Darryl Narcisse, Sourajit Mitra Mustafi, Ananta Ayyagari, Sai Chavala, and Samarendra K. Mohanty. 2021. "Biodistribution of Adeno-Associated Virus Type 2 Carrying Multi-Characteristic Opsin in Dogs Following Intravitreal Injection." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 25 (18): 8676–86. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16823>.
- Trapani, Ivana, Agostina Puppo, and Alberto Auricchio. 2014. "Vector Platforms for Gene Therapy of Inherited Retinopathies." *Progress in Retinal and Eye Research* 0 (November): 108–28. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.08.001>.
- Tremblay, Sébastien, Leah Acker, Arash Afraz, Daniel L. Albaugh, Hidetoshi Amita, Ariana R. Andrei, Alessandra Angelucci, et al. 2020. "An Open Resource for Non-Human Primate Optogenetics." *Neuron* 108 (6): 1075-1090.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.027>.
- Tufail, Yusuf, Alexei Matyushov, Nathan Baldwin, Monica L. Tauchmann, Joseph Georges, Anna Yoshihiro, Stephen I. Helms Tillery, and William J. Tyler. 2010. "Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates Intact Brain Circuits." *Neuron* 66 (5): 681–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.008>.
- Tufail, Yusuf, Anna Yoshihiro, Sandipan Pati, Monica M. Li, and William J. Tyler. 2011. "Ultrasonic Neuromodulation by Brain Stimulation with Transcranial Ultrasound." *Nature Protocols* 6 (9): 1453–70. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.371>.
- Tyler, William J., Yusuf Tufail, Michael Finsterwald, Monica L. Tauchmann, Emily J. Olson, and Cassandra Majestic. 2008. "Remote Excitation of Neuronal Circuits Using Low-Intensity, Low-Frequency Ultrasound." *PloS One* 3 (10): e3511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003511>.
- Urban, Alan, Clara Dussaux, Guillaume Martel, Clément Brunner, Emilie Mace, and Gabriel Montaldo. 2015. "Real-Time Imaging of Brain Activity in Freely Moving Rats Using Functional Ultrasound." *Nature Methods* 12 (9): 873–78. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3482>.
- Vaney, David I., Benjamin Sivyver, and W. Rowland Taylor. 2012. "Direction Selectivity in the Retina: Symmetry and Asymmetry in Structure and Function." *Nature Reviews. Neuroscience* 13 (3): 194–208. <https://doi.org/10.1038/nrn3165>.
- Verdera, Helena Costa, Klaudia Kuranda, and Federico Mingozzi. 2020. "AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer." *Molecular Therapy* 28 (3): 723–46. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.12.010>.
- Vinson, Joe A. 2006. "Oxidative Stress in Cataracts." *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* 13 (3): 151–62. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.006>.
- Viswanathan, Ahalya, and Ralph D. Freeman. 2007. "Neurometabolic Coupling in Cerebral Cortex Reflects Synaptic More than Spiking Activity." *Nature Neuroscience* 10 (10): 1308–12. <https://doi.org/10.1038/nn1977>.
- Walton, Troy A., Chinenye A. Idigo, Nadia Herrera, and Douglas C. Rees. 2015. "Mscl: Channeling Membrane Tension." *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 467 (1): 15–25. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1535-x>.
- Wässle, H., U. Grünert, J. Röhrenbeck, and B. B. Boycott. 1990. "Retinal Ganglion Cell Density and Cortical Magnification Factor in the Primate." *Vision Research* 30 (11): 1897–1911. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(90\)90166-i](https://doi.org/10.1016/0042-6989(90)90166-i).
- Wei, Pengfei, Nan Liu, Zhijian Zhang, Xuemei Liu, Yongqiang Tang, Xiaobin He, Bifeng Wu, et al. 2015. "Processing of Visually Evoked Innate Fear by a Non-Canonical Thalamic Pathway." *Nature Communications* 6 (April): 6756. <https://doi.org/10.1038/ncomms7756>.
- Weinreb, Robert N., Tin Aung, and Felipe A. Medeiros. 2014. "The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma." *JAMA* 311 (18): 1901–11. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192>.

- Wright, Alan F., Christina F. Chakarova, Mai M. Abd El-Aziz, and Shomi S. Bhattacharya. 2010. "Photoreceptor Degeneration: Genetic and Mechanistic Dissection of a Complex Trait." *Nature Reviews Genetics* 11 (4): 273–84. <https://doi.org/10.1038/nrg2717>.
- Wu, Chun-Yao, Ching-Hsiang Fan, Nai-Hua Chiu, Yi-Ju Ho, Yu-Chun Lin, and Chih-Kuang Yeh. 2020. "Targeted Delivery of Engineered Auditory Sensing Protein for Ultrasound Neuromodulation in the Brain." *Theranostics* 10 (8): 3546–61. <https://doi.org/10.7150/thno.39786>.
- Wurtz, R. H., and J. E. Albano. 1980. "Visual-Motor Function of the Primate Superior Colliculus." *Annual Review of Neuroscience* 3: 189–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.03.030180.001201>.
- Wyk, Michiel van, Justyna Pielecka-Fortuna, Siegrid Löwel, and Sonja Kleinlogel. 2015. "Restoring the ON Switch in Blind Retinas: Opto-MGluR6, a Next-Generation, Cell-Tailored Optogenetic Tool." *PLoS Biology* 13 (5): e1002143. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002143>.
- Xu, Hong-ping, Moran Furman, Yann S. Mineur, Hui Chen, Sarah L. King, David Zenisek, Z. Jimmy Zhou, et al. 2011. "An Instructive Role for Patterned Spontaneous Retinal Activity in Mouse Visual Map Development." *Neuron* 70 (6): 1115–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.028>.
- Yang, Yaoheng, Christopher Pham Pacia, Dezhuang Ye, Lifei Zhu, Hongchae Baek, Yimei Yue, Jinyun Yuan, et al. 2020. "Sonogenetics for Noninvasive and Cellular-Level Neuromodulation in Rodent Brain." *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.01.28.919910>.
- Ye, Jia, Siyang Tang, Long Meng, Xia Li, Xiaoxu Wen, Sihan Chen, Lili Niu, et al. 2018. "Ultrasonic Control of Neural Activity through Activation of the Mechanosensitive Channel MscL." *Nano Letters* 18 (7): 4148–55. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00935>.
- Zhang, Feng, Johannes Vierock, Ofer Yizhar, Lief E. Fenno, Satoshi Tsunoda, Arash Kianianmomeni, Matthias Prigge, et al. 2011. "The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools." *Cell* 147 (7): 1446–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.004>.
- Zhao, Xinyu, Mingna Liu, and Jianhua Cang. 2014. "Visual Cortex Modulates the Magnitude but Not the Selectivity of Looming-Evoked Responses in the Superior Colliculus of Awake Mice." *Neuron* 84 (1): 202–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.037>.
- Zhou, Wei, Eric R. Muir, Kundandeep S. Nagi, Steven Chalfin, Pavel Rodriguez, and Timothy Q. Duong. 2017. "Retinotopic fMRI Reveals Visual Dysfunction and Functional Reorganization in the Visual Cortex of Mild to Moderate Glaucoma Patients." *Journal of Glaucoma* 26 (5): 430–37. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000641>.
- Zrenner, Eberhart. 2013. "Fighting Blindness with Microelectronics." *Science Translational Medicine* 5 (210): 210ps16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007399>.
- Zrenner, Eberhart, Karl Ulrich Bartz-Schmidt, Heval Benav, Dorothea Besch, Anna Bruckmann, Veit-Peter Gabel, Florian Gekeler, et al. 2011. "Subretinal Electronic Chips Allow Blind Patients to Read Letters and Combine Them to Words." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1711): 1489–97. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1747>.

---

## **ANNEXE**

---

# Revue de la littérature

# Vision Restoration by Optogenetic Therapy and Developments Toward Sonogenetic Therapy

Matthieu Provansal<sup>1</sup>, Katia Marazova<sup>1</sup>, José Alain Sahel<sup>1-3</sup>, and Serge Picaud<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, The University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

<sup>3</sup> Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des XV-XX, Paris, France

**Correspondence:** Serge Picaud, Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France.

e-mail: [serge.picaud@inserm.fr](mailto:serge.picaud@inserm.fr)

José Alain Sahel, Department of Ophthalmology, The University of Pittsburgh School of Medicine, 3550 Terrace Street, Pittsburgh, PA 15213, USA.

e-mail: [sahelja@upmc.edu](mailto:sahelja@upmc.edu).

**Received:** December 22, 2021

**Accepted:** December 22, 2021

**Published:** January 13, 2022

**Keywords:** vision; restoration; optogenetic; sonogenetic

**Citation:** Provansal M, Marazova K, Sahel JA, Picaud S. Vision restoration by optogenetic therapy and developments toward sonogenetic therapy. *Transl Vis Sci Technol.* 2022;11(1):18,

<https://doi.org/10.1167/tvst.11.1.18>

After revolutionizing neuroscience, optogenetic therapy has entered successfully in clinical trials for restoring vision to blind people with degenerative eye diseases, such as retinitis pigmentosa. These clinical trials still have to evaluate the visual acuity achieved by patients and to determine if it reaches its theoretical limit extrapolated from *ex vivo* experiments. Different strategies are developed in parallel to reduce required light levels and improve information processing by targeting various cell types. For patients with vision loss due to optic atrophy, as in the case of glaucoma, optogenetic cortical stimulation is hampered by light absorption and scattering by the brain tissue. By contrast, ultrasound waves can diffuse widely through the dura mater and the brain tissue as indicated by ultrasound imaging. Based on our recent results in rodents, we propose the sonogenetic therapy relying on activation of the mechanosensitive channel as a very promising vision restoration strategy with a suitable spatiotemporal resolution. Genomic approaches may thus provide efficient brain machine interfaces for sight restoration.

## Introduction

Optogenetics is a recent technique to control or to monitor neural activity with light that can be achieved by the genetic introduction of light-sensitive proteins into the targeted cells.<sup>1-3</sup> This concept of optogenetics has followed the initial discovery of optogenetic actuators like channelrhodopsin (ChR),<sup>4-6</sup> halorhodopsin,<sup>7</sup> and archaerhodopsin (Arch),<sup>8</sup> which can modify the membrane potential of excitable cells and thus the activity of neurons. Similarly, sonogenetic therapy has been proposed to control neuronal activity by ultrasound

waves following the genetic expression of an ultrasound-sensitive protein in neurons.<sup>9,10</sup> Although optogenetics has already revolutionized the field of neurosciences, sonogenetic neuromodulation has only recently emerged. This review will focus on optogenetic and sonogenetic therapies as approaches for vision restoration in blind people. Optogenetic therapy was recently assessed in a blind patient, providing the first evidence for partial functional recovery of vision through this novel strategy,<sup>11</sup> whereas sonogenetic therapy was only tested in rodents.<sup>12</sup> However, both therapies offer great hopes for restoring some useful sight addressing different types of blindness.

## Optogenetic Vision Restoration at Retinal Level

In the past 2 decades, retinal prostheses have made great steps ahead from the perception of light to rendering the possibility to read. The retinal prosthesis PRIMA (Pixium Vision, Paris, France) provides today the best restored visual acuity in blind patients. This retinal prosthesis has been tested in patients affected by dry age-related macular degeneration allowing a prosthetic visual acuity between 20/460 and 20/565 in 4 patients with the ability to fuse the central infrared artificial vision and the natural peripheral vision.<sup>13,14</sup> Despite potential improvements in this technology, it will be very difficult to reach a single cell resolution. By contrast, optogenetic therapy could allow a cellular resolution by rendering residual neurons in the retina sensitive to light. This alternative solution was first proposed by the team of Zhao Pan. They first showed that channelrhodopsin2 (ChR2) can be expressed in the retinal ganglion cells of *rd1* mouse after the complete loss of photoreceptors, allowing retinal ganglion cells to respond to light.<sup>15</sup> Studies in dystrophic Royal College of Surgeons (RCS) rats also confirmed that light sensitivity can be restored through expression of ChR2 in retinal ganglion cells after complete photoreceptor degeneration.<sup>16,17</sup> Subsequently, this approach was applied to marmoset retina with success<sup>18</sup> and immediately translated to the clinical trial NCT02556736. No result has yet been published since the project started in 2015.

Following these initial studies, we have evaluated the possibility to express the microbial opsin with improved light sensitivity CatCh<sup>19</sup> in retinal ganglion cells of non-human primates and demonstrated the advantages of a selective promoter.<sup>20</sup> This optogenetic tool could potentially restore a theoretical visual acuity of 20/72.<sup>21</sup> However, because microbial opsins require very high light intensities, we were concerned about using either ChR2 or its derived protein, CaTCh, which are both blue light sensitive. Indeed, we recently showed that neurons, such as photoreceptors, can be destroyed by blue light, likely due to the blue light absorption of porphyrins in their mitochondria.<sup>22</sup> We therefore assessed the efficacy of two different red-shifted opsins, ReachR and ChrimsonR, to activate retinal ganglion cells.<sup>23,24</sup> We finally opted for ChrimsonR, which is the most red-shifted opsin<sup>25</sup> and selected the optimal AAV2-7m8 viral vector to optimize its expression in primates.<sup>24</sup> Surprisingly, our study showed that the highest efficacy and likely highest protein expression was obtained for the fused protein with a red fluorescent reporter gene, ChrimsonR-tdTomato.<sup>24</sup> We then demonstrated that in vivo optogenetic activation of retinal ganglion cells expressing

ChrimsonR-tdTomato can activate the primate visual cortex,<sup>26</sup> whereas others reported the in vivo activation of the primate retinal ganglion cells at the retinal level.<sup>27</sup> Following these non-human primate studies, this strategy was brought into the clinical trial (NCT03326336) aiming at evaluating the safety and tolerability of ChrimsonR-tdTomato delivered by the AAV2-7m8 vector in subjects with retinitis pigmentosa. It has recently been shown that, after 14 years of blindness, a patient affected by retinitis pigmentosa recovered some partial vision.<sup>11</sup> More patients participating in this clinical trial were now found to have some partially restored vision with this optogenetic strategy relying on the GS030 product from the company GenSight Biologics. Patients are wearing goggles to convert the visual scene into a 600 nm image using an asynchronous camera, which enabled us to model at a millisecond precision the activity of the retinal ganglion cells.<sup>28</sup>

Others have similarly created an image converter<sup>29</sup> to enter into a clinical trial (NCT04278131) with another microbial opsin named Chronos,<sup>25</sup> a strategy developed by the company Bionic Sight LLC. Another approach has combined several microbial opsins (ChR2, ReaCh, and C1V1) to generate the multicharacteristic opsin (MCO1) with a white light sensitivity and apparently the need for lower light levels.<sup>30–32</sup> This approach was assessed in a dog<sup>32</sup> prior to the recent development of a clinical trial with the company Nanoscope Therapeutics (NCT04945772).

Retinal ganglion cells are characterized by a large anatomic and functional diversity resulting in different light responses, which cannot be reproduced simultaneously and individually in each cell type by optogenetics. All retinal ganglion cells become ON cell types indifferently from their original cell types. To offer more variability, several strategies were proposed to target cells at a higher level in the retinal information processing sequence. For instance, bipolar cells were targeted to express ChR2 using a specific promoter<sup>33</sup> through adeno-associated viral vector (AAV) delivery.<sup>34</sup> We<sup>35</sup> and others<sup>36</sup> observed that optogenetic activation of bipolar cells could restore the ON and OFF responses in retinal ganglion cells using ChR2 and CatCh, respectively. The optimal strategy would be to reactivate “dormant” cone photoreceptors when they remain despite a loss of their natural photosensitivity.<sup>37,38</sup> Complex information processing can be restored in such conditions but a limited number of patients affected by retinal dystrophies retain such dormant non-photosensitive photoreceptors.<sup>37</sup>

As microbial opsins require very high light intensities and they could potentially induce a negative immune response, various laboratories have expressed mammalian opsin ectopically to restore vision.



Melanopsin was the first opsin to be targeted in retinal ganglion cells because this opsin is already present in a small population of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells with non-visual functions.<sup>39</sup> This opsin rendered all transfected retinal ganglion cells intrinsically sensitive to light but such melanopsin-expressing cells acquired light responses similar to those of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells that are lasting for minutes, a dynamic incompatible for vision. Then, rhodopsin was expressed in residual neurons of the inner retina providing light responses at very low light levels but with a light onset developing over seconds.<sup>40,41</sup> Cone opsin provided faster kinetics as cone response kinetics are also faster than those of rods.<sup>42</sup> The later project will be developed by Novartis after its acquisition of the start-up, Vedere Bio. These surprising studies relying on such ectopically expressed mammalian opsins demonstrated that they can hijack metabolic pathways of other G proteins leading to ionic channel activation. Aside from natural mammalian opsins, ON-bipolar cells were also targeted for expressing Opto-GluR6, a chimeric protein combining an opsin to the metabotropic glutamatergic receptor.<sup>43</sup> This strategy is now followed by Novartis after acquiring the start-up Arcos Medical. Another engineered photoactivatable G-protein coupled receptor, SNAG-mGluR2, evoked OFF responses in retinal ganglion cells of the blind retina.<sup>44</sup> Combined expression of two engineered proteins, SNAG-mGluR2 and LiGluR, generated both ON and OFF responses in different retinal ganglion cells.<sup>44</sup>

Finally, optogenetic gene therapy was also combined with cell therapy because photoreceptors generated from induced pluripotent stem cells are not yet able to generate active photosensitive outer segments. This strategy is appealing as it enabled us to transplant active photoreceptors in advanced states of retinal degeneration. Transplantation of engineered photoreceptors expressing inhibitory microbial opsins restored visual responses and behavior in blind animals.<sup>45,46</sup>

## Cortical Visual Restoration

For diseases leading to blindness following the loss of the optic nerve, cortical visual prostheses were developed in the 1960s by Brindley and Lewin with success in eliciting phosphenes in the visual field<sup>47</sup> allowing Braille reading.<sup>48,49</sup> However, the recovered sight tended to fade away in many patients. More recently, the novel cortical prosthesis, Orion from the company 2nd Sight, showed form recognition by sequential stimulation of the visual cortex with surface electrodes (500  $\mu\text{m}$ ) spaced every 2 mm.<sup>50</sup> In parallel, other

studies have shown that smaller currents are needed for stimulating the cortex in depth.<sup>51</sup> As a consequence, the penetrating electrodes of the Utah arrays enabled primates to recognize letters in a more dynamic way.<sup>52</sup> These experimental investigations were confirmed in a clinical trial with blind patients.<sup>53</sup> Nonetheless, such penetrating electrodes have also been shown to lose their stimulation efficacy with time.<sup>54</sup> These results on cortical visual prostheses have justified the search for a distant non-contact neuronal activation of cortical neurons.

Optogenetic therapy appeared as an obvious non-contact alternative for the distant activation of cortical neurons from the brain surface. Expression of a microbial opsin in the visual cortex was found to activate cortical neurons even in the cortex depth following surface illumination of the brain.<sup>55–57</sup> In non-human primates, this cortical activation produced visual saccades toward the corresponding point in the visual field<sup>55,56,58</sup> and was able to elicit activity in other visual areas as indicated by functional magnetic resonance imaging (fMRI).<sup>58</sup> More subtle changes were described, such as an increased sensitivity to the stimulus orientation, only when the optogenetic stimulation was applied on a column with an orientation selectivity close to that of the stimulus.<sup>59,60</sup> Furthermore, optogenetic activation of single ocular dominance columns generated preferential activation of nearby same-eye columns.<sup>60</sup> Neuronal inhibition using ArchT opsin led instead to the partial suppression of visually-evoked responses and shifted the psychometric curves associated with the discrimination of visual stimuli based on their luminance.<sup>61</sup> Again, the psychometric curves were shifted only when the location of the visual stimuli matched the receptive field of the stimulation.

For future clinical applications, it should be considered that deep brain optogenetic stimulation is difficult due to light absorption and scattering in the brain tissue,<sup>62</sup> thus rendering optogenetic applications to non-human primates uncommon compared with rodents.<sup>63</sup> In addition, complex visual tasks require at least 600 pixels, as demonstrated for locomotion, face recognition, and text reading.<sup>64–66</sup> A pioneering study demonstrated the feasibility to use a chronically implanted surface LED array as a light source in nonhuman primates.<sup>61</sup> Other investigators have proposed invasive light guide or penetrating LED arrays.<sup>67–70</sup> These optical devices become highly invasive losing thereby the promise of optogenetics for distant non-contact activation of neurons.

In a recent study, we have proposed to use ultrasound waves instead of light to activate

cortical neurons following targeted expression of a mechanosensitive ionic channel. This strategy of ultrasound activation of neurons was named sonogenetics, as it relies on the genetic expression of a mechanosensitive protein coupled to the ultrasound stimulation. Ultrasound waves are well known to propagate into the tissue depth and even deep into the non-human primate visual cortex, as it has been demonstrated in our study by brain cortical functional ultrasound imaging.<sup>71</sup> Some neurons can be naturally sensitive to ultrasound waves and ultrasound neuromodulation was developed by different laboratories.<sup>72–78</sup> This ultrasound sensitivity appears to rely on different proteins from the two-pore-domain potassium channel family expressed in neurons,<sup>79</sup> namely the MEC-4 ionic channel in *Caenorhabditis elegans*<sup>80</sup> and the mechanosensitive ionic channel Piezo1.<sup>81</sup> Unfortunately, these ultrasound stimulations can generate refractory periods<sup>78</sup> and hemorrhages due to the required high ultrasound energies.<sup>82</sup> To reduce these unwanted effects, various proteins have been expressed ectopically in neurons to render them ultrasound sensitive. These ultrasound sensitive proteins include the auditory-sensing Prestin protein,<sup>83,84</sup> the TRP-4 ionic channel,<sup>85</sup> the TRPV1 ionic channel,<sup>86</sup> and the mechanosensitive large conductance ionic channel MscL.<sup>87–89</sup> All the in vivo studies using these proteins showed temporal resolution requiring several hundred milliseconds to a second for developing the response, which is too slow for visual restoration.<sup>83–86,89</sup> We therefore investigated if a mechanosensitive protein can generate a sonogenetic activation with a spatiotemporal resolution compatible with visual restoration. We have shown that the G22S mutated version of the MscL ionic channel displaying an increased sensitivity to ultrasound stimulation can be reliably expressed in neurons of the visual cortex providing a millisecond temporal resolution and a spatial resolution in the 100  $\mu\text{m}$  range when applying 15 MHz ultrasound waves at safe energies.<sup>12</sup> We have also observed in a behavioral test that the ultrasound sonogenetic activation of the visual cortex is perceived as a light flash.<sup>12</sup> These original results provide the first evidence that sonogenetic therapy could provide a safe strategy for restoring partial sight in blind patients following optic atrophy in diseases like glaucoma or diabetic retinopathy. Sonogenetic therapy may thus become a brain machine interface for restoring vision and other neuronal applications with a stimulation of distant deep brain structure realized without contact from a device standing above the dura mater following a local AAV injection to target the MscL expression in a selected neuronal population based on a specific cell promoter.

## Conclusions

Genomic strategies based on gene therapy expressing ectopically photosensitive and mechanosensitive ionic channels may provide high resolution brain-machine interfaces. Optogenetics is already in clinical trials with results demonstrating restored partial vision in patients affected by retinitis pigmentosa. Further analyses are needed to assess if patients can reach the theoretical visual acuity (20/72) estimated in ex vivo studies on the non-human primate retina. The results of ongoing clinical trials will thus decide if optogenetics can provide a convincing alternative to retinal prostheses for restoring vision. Similarly, sonogenetic therapy offers an alternative to cortical prostheses for a deep non-contact cortical stimulation from above the dura mater. Further studies are needed to evaluate the safety and efficacy of this strategy prior to launching clinical trials. Despite these current limitations, the results of our study suggest that sonogenetics holds great hope for a novel generation of brain machine interface for cortical visual restoration and other neurological applications.

## Acknowledgments

Supported by the European Research Council (ERC) Synergy Grant Scheme (holistic evaluation of light and multiwave applications to high-resolution imaging in ophthalmic translational research revisiting the Helmholtzian synergies, ERC Grant Agreement #610110, by the Foundation Fighting Blindness, *la Fédération des Aveugles de France*, Optic 2000, the City of Paris, *Région ile de France*, the Fondation pour la Recherche Médicale, the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR BrainOptoSight), and French state funds managed by the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) within *Programme Investissements d'Avenir*, *Laboratoire d'Excellence* (LABEX) LIFESENSES (ANR-10-LABX-0065), and *Institut Hospitalo-Universitaire* FOReSIGHT (ANR-18-IAHU-0001). Supported by the NIH CORE Grant P30 EY08098 to the Department of Ophthalmology, the Eye and Ear Foundation of Pittsburgh, and from an unrestricted grant from Research to Prevent Blindness, New York, NY.

Disclosure: **M. Provansal**, None; **K. Marazova**, None; **J.A. Sahel**, Gensight biologics (F), Pixium vision (F), retinal prosthesis (P), optogenetic therapy (P), sonogenetic therapy (P); **S. Picaud** Gensight biologics (F), Pixium vision (F), retinal prosthesis (P), optogenetic therapy (P), sonogenetic therapy (P)

## References

- Herlitze S, Landmesser LT. New optical tools for controlling neuronal activity. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17:87–94.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 2005;8:1263–1268.
- Rost BR, Schneider-Warme F, Schmitz D, Hegemann P. Optogenetic Tools for Subcellular Applications in Neuroscience. *Neuron.* 2017;96:572–603.
- Deisseroth K, Hegemann P. The form and function of channelrhodopsin. *Science (New York, NY).* 2017;357:eaan5544.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:13940–13945.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, et al. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science (New York, NY).* 2002;296:2395–2398.
- Schobert B, Lanyi JK. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem.* 1982;257:10306–10313.
- Mukohata Y, Sugiyama Y, Ihara K, Yoshida M. An Australian halobacterium contains a novel proton pump retinal protein: archaerhodopsin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;151:1339–1345.
- Maresca D, Lakshmanan A, Abedi M, et al. Biomolecular Ultrasound and Sonogenetics. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2018;9:229–252.
- Wang S, Meng W, Ren Z, et al. Ultrasonic Neuro-modulation and Sonogenetics: A New Era for Neural Modulation. *Front Physiol.* 2020;11:787.
- Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C, et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nature Medicine.* 2021;27:1223–1229.
- Cadoni S, Demene C, Provansal M, et al. Sonogenetic stimulation of the brain at a spatiotemporal resolution suitable for vision restoration. *BioRxiv preprint*, <https://doi.org/10.1101/2021.1111.1107.467597>.
- Palanker D, Le Mer Y, Mohand-Said S, Sahel JA. Simultaneous Perception of Prosthetic and Natural Vision in AMD Patients. *Research Square*, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-141505/v1>.
- Palanker D, Le Mer Y, Mohand-Said S, Muqit M, Sahel JA. Photovoltaic Restoration of Central Vision in Atrophic Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2020;127:1097–1104.
- Bi A, Cui J, Ma YP, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron.* 2006;50:23–33.
- Tomita H, Sugano E, Yawo H, et al. Restoration of visual response in aged dystrophic RCS rats using AAV-mediated channelrhodopsin-2 gene transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3821–3826.
- Tomita H, Sugano E, Isago H, et al. Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp Eye Res.* 2010;90:429–436.
- Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH, Troilo D. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:5288–5296.
- Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE, et al. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca(2)+-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci.* 2011;14:513–518.
- Chaffiol A, Caplette R, Jaillard C, et al. A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina. *Mol Ther.* 2017;25:2546–2560.
- Ferrari U, Deny S, Sengupta A, et al. Towards optogenetic vision restoration with high resolution. *PLoS Comput Biol.* 2020;16:e1007857.
- Marie M, Forster V, Fouquet S, et al. Phototoxic damage to cone photoreceptors can be independent of the visual pigment: the porphyrin hypothesis. *Cell Death Dis.* 2020;11:711.
- Sengupta A, Chaffiol A, Mace E, et al. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol Med.* 2016;8(11):1248–1264.
- Gauvain G, Akolkar H, Chaffiol A, et al. Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern discrimination compatible with vision restoration in non-human primates. *Commun Biol.* 2021;4:125.
- Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods.* 2014;11:338–346.
- Chaffiol A, Provansal M, Joffrois C, et al. In vivo optogenetic stimulation of the primate retina activates the visual cortex after long-term transduction. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021;24:1–10.
- McGregor JE, Godat T, Dhakal KR, et al. Optogenetic restoration of retinal ganglion cell activity in the living primate. *Nat Commun.* 2020;11:1703.



28. Lorach H, Benosman R, Marre O, Jeng SH, Sahel JA, Picaud S. Artificial retina : The multichannel processing of the mammalian retina achieved with a neuromorphic asynchronous light acquisition device. *J Neural Eng.* 2012;9:066004.
29. Nirenberg S, Pandarinath C. Retinal prosthetic strategy with the capacity to restore normal vision. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:15012–15017.
30. Batabyal S, Kim S, Wright W, Mohanty S. Laser-assisted targeted gene delivery to degenerated retina improves retinal function. *J Biophotonics.* 2021;14:e202000234.
31. Wright W, Gajjerman S, Batabyal S, et al. Restoring vision in mice with retinal degeneration using multicharacteristic opsin. *Neurophotonics.* 2017;4:041505.
32. Tchedre KT, Batabyal S, Galicia M, et al. Biodistribution of adeno-associated virus type 2 carrying multi-characteristic opsin in dogs following intravitreal injection. *J Cell Mol Med.* 2021;25:8676–8686.
33. Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nature Neurosci.* 2008;11:667–675.
34. Doroudchi MM, Greenberg KP, Liu J, et al. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol Ther.* 2011;19:1220–1229.
35. Mace E, Caplette R, Marre O, et al. Targeting Channelrhodopsin-2 to ON-bipolar Cells With Vitreally Administered AAV Restores ON and OFF Visual Responses in Blind Mice. *Mol Ther.* 2015;23:7–16.
36. Cronin T, Vandenbergh LH, Hantz P, et al. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter. *EMBO Mol Med.* 2014;6:1175–1190.
37. Busskamp V, Duebel J, Balya D, et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science (New York, NY).* 2010;329:413–417.
38. Khabou H, Garita-Hernandez M, Chaffiol A, et al. Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. *JCI Insight.* 2018;3:e96029.
39. Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16009–16014.
40. Cehajic-Kapetanovic J, Eleftheriou C, Allen AE, et al. Restoration of Vision with Ectopic Expression of Human Rod Opsin. *Curr Biol.* 2015;25:2111–2122.
41. Gaub BM, Berry MH, Holt AE, Isacoff EY, Flanery JG. Optogenetic Vision Restoration Using Rhodopsin for Enhanced Sensitivity. *Mol Ther.* 2015;23:1562–1571.
42. Berry MH, Holt A, Salari A, et al. Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin. *Nat Commun.* 2019;10:1221.
43. van Wyk M, Pielecka-Fortuna J, Lowel S, Kleinlogel S. Restoring the ON Switch in Blind Retinas: Opto-mGluR6, a Next-Generation, Cell-Tailored Optogenetic Tool. *PLoS Biology.* 2015;13:e1002143.
44. Berry MH, Holt A, Levitz J, et al. Restoration of patterned vision with an engineered photoactivatable G protein-coupled receptor. *Nat Commun.* 2017;8:1862.
45. Garita-Hernandez M, Chaffiol A, Guibbal L, et al. Control of Microbial Opsin Expression in Stem Cell Derived Cones for Improved Outcomes in Cell Therapy. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:648210.
46. Garita-Hernandez M, Lampic M, Chaffiol A, et al. Restoration of visual function by transplantation of optogenetically engineered photoreceptors. *Nat Commun.* 2019;10:4524.
47. Brindley GS, Lewin WS. The sensations produced by electrical stimulation of the visual cortex. *J Physiol.* 1968;196:479–493.
48. Dobbelle WH, Mladejovsky MG, Evans JR, Roberts TS, Girvin JP. “Braille” reading by a blind volunteer by visual cortex stimulation. *Nature.* 1976;259:111–112.
49. Dobbelle WH. Artificial vision for the blind by connecting a television camera to the visual cortex. *Asaio J.* 2000;46:3–9.
50. Beauchamp MS, Oswald D, Sun P, et al. Dynamic Stimulation of Visual Cortex Produces Form Vision in Sighted and Blind Humans. *Cell.* 2020;181:774–783.e775.
51. Tehovnik EJ, Slocum WM. Phosphene induction by microstimulation of macaque V1. *Brain Res Rev.* 2007;53:337–343.
52. Chen X, Wang F, Fernandez E, Roelfsema PR. Shape perception via a high-channel-count neuroprosthesis in monkey visual cortex. *Science (New York, NY).* 2020;370:1191–1196.
53. Fernandez E, Alfaro A, Soto-Sanchez C, et al. Visual percepts evoked with an Intracortical 96-channel microelectrode array inserted in human occipital cortex. *J Clin Invest.* 2021;131:e151331.
54. Fernandez E, Greger B, House PA, et al. Acute human brain responses to intracortical

- microelectrode arrays: challenges and future prospects. *Front Neuroeng.* 2014;7:24.
55. Jazayeri M, Lindbloom-Brown Z, Horwitz GD. Saccadic eye movements evoked by optogenetic activation of primate V1. *Nat Neurosci.* 2012;15:1368–1370.
  56. Ju N, Jiang R, Macknik SL, Martinez-Conde S, Tang S. Long-term all-optical interrogation of cortical neurons in awake-behaving nonhuman primates. *PLoS Biology.* 2018;16:e2005839.
  57. Provansal M, Labernede G, Joffrois C, et al. Functional ultrasound imaging of the spreading activity following optogenetic stimulation of the rat visual cortex. *Sci Rep.* 2021;11:12603.
  58. Ortiz-Rios M, Agayby B, Balezeau F, Haag M, Rima S, Schmid MC. Optogenetic stimulation of primate V1 reveals local laminar and large-scale cortical networks related to perceptual phosphenes. *BiorRxiv preprint*, <https://doi.org/10.1101/2021.06.01.446505>.
  59. Andrei AR, Pojoga S, Janz R, Dragoi V. Integration of cortical population signals for visual perception. *Nat Commun.* 2019;10:3832.
  60. Chernov MM, Friedman RM, Chen G, Stoner GR, Roe AW. Functionally specific optogenetic modulation in primate visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:10505–10510.
  61. Rajalingham R, Sorenson M, Azadi R, Bohn S, DiCarlo JJ, Afraz A. Chronically implantable LED arrays for behavioral optogenetics in primates. *Nature Methods.* 2021;18:1112–1116.
  62. Stujenske JM, Spellman T, Gordon JA. Modeling the Spatiotemporal Dynamics of Light and Heat Propagation for In Vivo Optogenetics. *Cell Rep.* 2015;12:525–534.
  63. El-Shamayleh Y, Horwitz GD. Primate optogenetics: Progress and prognosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116:26195–26203.
  64. Cha K, Horch KW, Normann RA. Mobility performance with a pixelized vision system. *Vis Res.* 1992;32:1367–1372.
  65. Cha K, Horch KW, Normann RA, Boman DK. Reading speed with a pixelized vision system. *J Opt Soc Am A.* 1992;9:673–677.
  66. Sommerhalder J, Rappaz B, de Haller R, Fornos AP, Safran AB, Pelizzone M. Simulation of artificial vision: II. Eccentric reading of full-page text and the learning of this task. *Vis Res.* 2004;44:1693–1706.
  67. McAlinden N, Gu E, Dawson MD, Sakata S, Mathieson K. Optogenetic activation of neocortical neurons in vivo with a sapphire-based microscale LED probe. *Front Neural Circuits.* 2015;9:25.
  68. McAlinden N, Cheng Y, Scharf R, et al. Multi-site microLED optrode array for neural interfacing. *Neurophotonics.* 2019;6:035010.
  69. Scharf R, Tsunematsu T, McAlinden N, Dawson MD, Sakata S, Mathieson K. Depth-specific optogenetic control in vivo with a scalable, high-density muLED neural probe. *Sci Rep.* 2016;6:28381.
  70. Zhao H, Soltan A, Maaskant P, Dong N, Sun X, Degenaar P. A Scalable Optoelectronic Neural Probe Architecture With Self-Diagnostic Capability. *IEEE Trans Circuits Syst I Regul Pap.* 2018;65:2431–2442.
  71. Blaize K, Arcizet F, Gesnik M, et al. Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117:14453–14463.
  72. Deffieux T, Younan Y, Wattiez N, Tanter M, Pouget P, Aubry JF. Low-intensity focused ultrasound modulates monkey visuomotor behavior. *Curr Biol.* 2013;23:2430–2433.
  73. Tufail Y, Yoshihiro A, Pati S, Li MM, Tyler WJ. Ultrasonic neuromodulation by brain stimulation with transcranial ultrasound. *Nat Protoc.* 2011;6:1453–1470.
  74. Tufail Y, Matyushov A, Baldwin N, et al. Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits. *Neuron.* 2010;66:681–694.
  75. Legon W, Sato TF, Opitz A, et al. Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans. *Nat Neurosci.* 2014;17:322–329.
  76. Tyler WJ, Tufail Y, Finsterwald M, Tauchmann ML, Olson EJ, Majestic C. Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. *PLoS One.* 2008;3:e3511.
  77. Fomenko A, Neudorfer C, Dallapiazza RF, Kalia SK, Lozano AM. Low-intensity ultrasound neuromodulation: An overview of mechanisms and emerging human applications. *Brain Stimul.* 2018;11:1209–1217.
  78. Gulick DW, Li T, Kleim JA, Towe BC. Comparison of Electrical and Ultrasound Neurostimulation in Rat Motor Cortex. *Ultrasound Med Biol.* 2017;43:2824–2833.
  79. Kubanek J, Shi J, Marsh J, Chen D, Deng C, Cui J. Ultrasound modulates ion channel currents. *Sci Rep.* 2016;6:24170.
  80. Kubanek J, Shukla P, Das A, Baccus SA, Goodman MB. Ultrasound Elicits Behavioral Responses through Mechanical Effects on Neurons and Ion Channels in a Simple Nervous System. *J Neurosci.* 2018;38:3081–3091.
  81. Qiu Z, Guo J, Kala S, et al. The Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Significantly Mediates In

- Vitro Ultrasonic Stimulation of Neurons. *iScience*. 2019;21:448–457.
82. Lee W, Lee SD, Park MY, et al. Image-Guided Focused Ultrasound-Mediated Regional Brain Stimulation in Sheep. *Ultrasound Med Biol*. 2016;42:459–470.
  83. Wu CY, Fan CH, Chiu NH, Ho YJ, Lin YC, Yeh CK. Targeted delivery of engineered auditory sensing protein for ultrasound neuromodulation in the brain. *Theranostics*. 2020;10:3546–3561.
  84. Huang YS, Fan CH, Hsu N, et al. Sonogenetic Modulation of Cellular Activities Using an Engineered Auditory-Sensing Protein. *Nano Lett*. 2020;20:1089–1100.
  85. Ibsen S, Tong A, Schutt C, Esener S, Chalasani SH. Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*. 2015;6:8264.
  86. Yang Y, Pham Pacia C, Ye D, et al. Sonogenetics for noninvasive and cellular-level neuromodulation in rodent brain. *bioRxiv preprint*, <https://doi.org/10.1101/2020.01.28.919910>.
  87. Soloperto A, Boccaccio A, Contestabile A, et al. Mechano-sensitization of mammalian neuronal networks through expression of the bacterial large-conductance mechanosensitive ion channel. *J Cell Sci*. 2018;131:jcs210393.
  88. Ye J, Tang S, Meng L, et al. Ultrasonic Control of Neural Activity through Activation of the Mechanosensitive Channel MscL. *Nano Lett*. 2018;18:4148–4155.
  89. Qiu Z, Kala S, Guo J, et al. Targeted Neurostimulation in Mouse Brains with Non-invasive Ultrasound. *Cell Rep*. 2020;32:108033.

## Article scientifique

# *In vivo* optogenetic stimulation of the primate retina activates the visual cortex after long-term transduction

Antoine Chaffiol,<sup>1</sup> Matthieu Provansal,<sup>1</sup> Corentin Joffrois,<sup>1</sup> Kévin Blaize,<sup>2</sup> Guillaume Labernede,<sup>1</sup> Ruben Goulet,<sup>1</sup> Emma Burban,<sup>1</sup> Elena Brazhnikova,<sup>1</sup> Jens Duebel,<sup>1,4</sup> Pierre Pouget,<sup>3</sup> José Alain Sahel,<sup>1,5</sup> Serge Picaud,<sup>1</sup> Fabrice Arcizet,<sup>1,6</sup> and Gregory Gauvain<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France; <sup>2</sup>Institut de Neurosciences de la Timone, UMR 7289 Centre National de la Recherche Scientifique and Aix-Marseille Université, 13385 Marseille Cedex 05, France; <sup>3</sup>INSERM 1127, CNRS 7225, Institut du Cerveau et de la Moelle Épineière, Sorbonne Université, 75013 Paris, France; <sup>4</sup>Department of Ophthalmology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany; <sup>5</sup>Department of Ophthalmology, The University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA

**Over the last 15 years, optogenetics has changed fundamental research in neuroscience and is now reaching toward therapeutic applications. Vision restoration strategies using optogenetics are now at the forefront of these new clinical opportunities. But applications to human patients suffering from retinal diseases leading to blindness raise important concerns on the long-term functional expression of optogenes and the efficient signal transmission to higher visual centers. Here, we demonstrate in non-human primates continued expression and functionality at the retina level ~20 months after delivery of our construct. We also performed *in vivo* recordings of visually evoked potentials in the primary visual cortex of anesthetized animals. Using synaptic blockers, we isolated the *in vivo* cortical activation resulting from the direct optogenetic stimulation of primate retina. In conclusion, our work indicates long-term transgene expression and transmission of the signal generated in the macaque retina to the visual cortex, two important features for future clinical applications.**

## INTRODUCTION

Repairing sensory impairments has always been an overarching goal in medicine. In the particular case of vision loss, considerable progress has been achieved in recent years through the development of various therapeutic strategies, such as retinal prostheses,<sup>1–4</sup> stem cell transplantation,<sup>5–8</sup> and optogenetic therapies.<sup>9–21</sup> All these approaches aspire to restore retinal visual information. Microbial opsin-based optogenetics is one of the most promising of these approaches. It involves the expression of light-sensitive ion channels in preserved inner retinal neurons, restoring the intrinsic light sensitivity of the pathological retina in several types of ocular disease.

In inherited forms of retinal degeneration, such as retinitis pigmentosa (RP), the retinal degeneration is progressive, beginning with retinal pigment epithelium (RPE) or photoreceptors dysfunction, and possibly causing complete blindness.<sup>22</sup> The choice of target cell

type in the retinal circuit should take into account the potential for translation into clinical applications and uses in patients. The accessibility of the targeted cell population and the maintenance of its structure and integrity after the onset of retinal degeneration are key features. Since the first use of optogenetics to restore vision in blind mice through the expression of channelrhodopsin-2 (ChR2) in retinal ganglion cells (RGCs),<sup>10</sup> many other studies have been conducted, targeting different cell types in the retina: photoreceptors,<sup>14,23</sup> bipolar cells,<sup>18,19</sup> or RGCs.<sup>9,10,15,17,20</sup> Importantly, in diseases such as age-related macular degeneration and RP, the RGCs remain well-preserved during the process of retinal degeneration, even at late stages of the disease, after the death of the photoreceptors.<sup>24</sup> Various models, including rodents, non-human primates (NHPs), postmortem human retina, and human induced pluripotent stem cells, have been used for investigations of optogenetic approaches, with promising results.<sup>7,10,17,23</sup>

Primates are a pertinent animal model for preclinical validation of optogenetic therapeutic approaches<sup>25</sup> because they share essential anatomical features and a similar organization of visual pathways with humans. However, few studies to date have used this animal model for investigations of the potential of optogenetic therapy for the retina. For example, several opsins targeting RGCs have been tested in *ex vivo* preparations, including the microbial opsin channelrhodopsin-2 in marmosets<sup>9</sup> and CatCh, ReaChr, and ChR-tdT in macaques.<sup>11,15,17</sup> All these opsins were found to be functional in

Received 21 September 2021; accepted 19 November 2021;  
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.11.009>.

<sup>6</sup>These authors contributed equally

**Correspondence:** Antoine Chaffiol, PhD, Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France.

**E-mail:** [antoine.chaffiol@inserm.fr](mailto:antoine.chaffiol@inserm.fr)

**Correspondence:** Fabrice Arcizet, PhD, Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France.

**E-mail:** [fabrice.arcizet@inserm.fr](mailto:fabrice.arcizet@inserm.fr)





RGCs. Furthermore, the optogenetic responses of RGCs *in vivo* have been recorded with calcium imaging after photoablation of the photoreceptors in the macaque foveal region.<sup>20</sup> However, none of these studies has shown that the propagation of optogenetic activation from RGCs to higher visual centers, such as the primary visual cortex, was possible. Such experiments on retinal optogenetic approaches have been performed only in rodents and have shown that the optogenetic activation of transduced retinæ induces specific visual evoked responses (VEPs) in the visual cortex.<sup>14,15,18,26,27</sup> Moreover, specific cortical responses were recorded following the activation of RGCs by photovoltaic subretinal implants in rats.<sup>28</sup> A recent study on primates fitted with subretinal implants showed that these prostheses induced some behavioral responses.<sup>2</sup> However, to our knowledge, no study to date has demonstrated the transmission of information to higher visual areas following activation of the optogenetically transduced retina in primates. But a recent study in human patients with Leber congenital amaurosis associated with RPE65 gene deficiency and treated with subretinal injection of an adeno-associated virus (AAV) vector has shown cortical activation along visual pathways during fMRI analysis.<sup>29</sup>

Using this approach to optogenetic therapy, we targeted the RGCs in primate retinas through the *in vivo* expression of an ectopic light-sensitive ion channel, ChrimsonR, coupled to the fluorescent reporter tdTomato.<sup>17</sup> The possible application of this strategy to blind patients suffering from retinal dystrophies raises important concerns about long-term functional expression to ensure efficient signal transmission to higher brain centers<sup>30</sup> (i.e., the visual cortex). We previously showed that the transduced retina 2 or 6 months after injection displays a high degree of spatiotemporal resolution *ex vivo*, compatible with the perception of highly dynamic visual scenes at light levels suitable for use in humans.<sup>17</sup> Here, we demonstrate, in NHPs, sustained functional efficacy ~20 months after the delivery of an AAV2.7m8-ChrimsonR-tdTomato vector similar to that currently undergoing clinical evaluation. Our results reveal a persistence of expression in the perifovea, mediating information transfer to higher brain centers. Indeed, we recorded visual evoked potentials (VEPs) in the primary visual cortex of anesthetized primates in response to optogenetic retinal activation. We used an intravitreal injection of synaptic blockers to isolate the cortical component resulting from the *in vivo* optogenetic stimulation of primate RGCs. Our findings demonstrate the long-term functional efficacy of optogenetic therapy to restore information transfer from the retina to the brain *in vivo*.

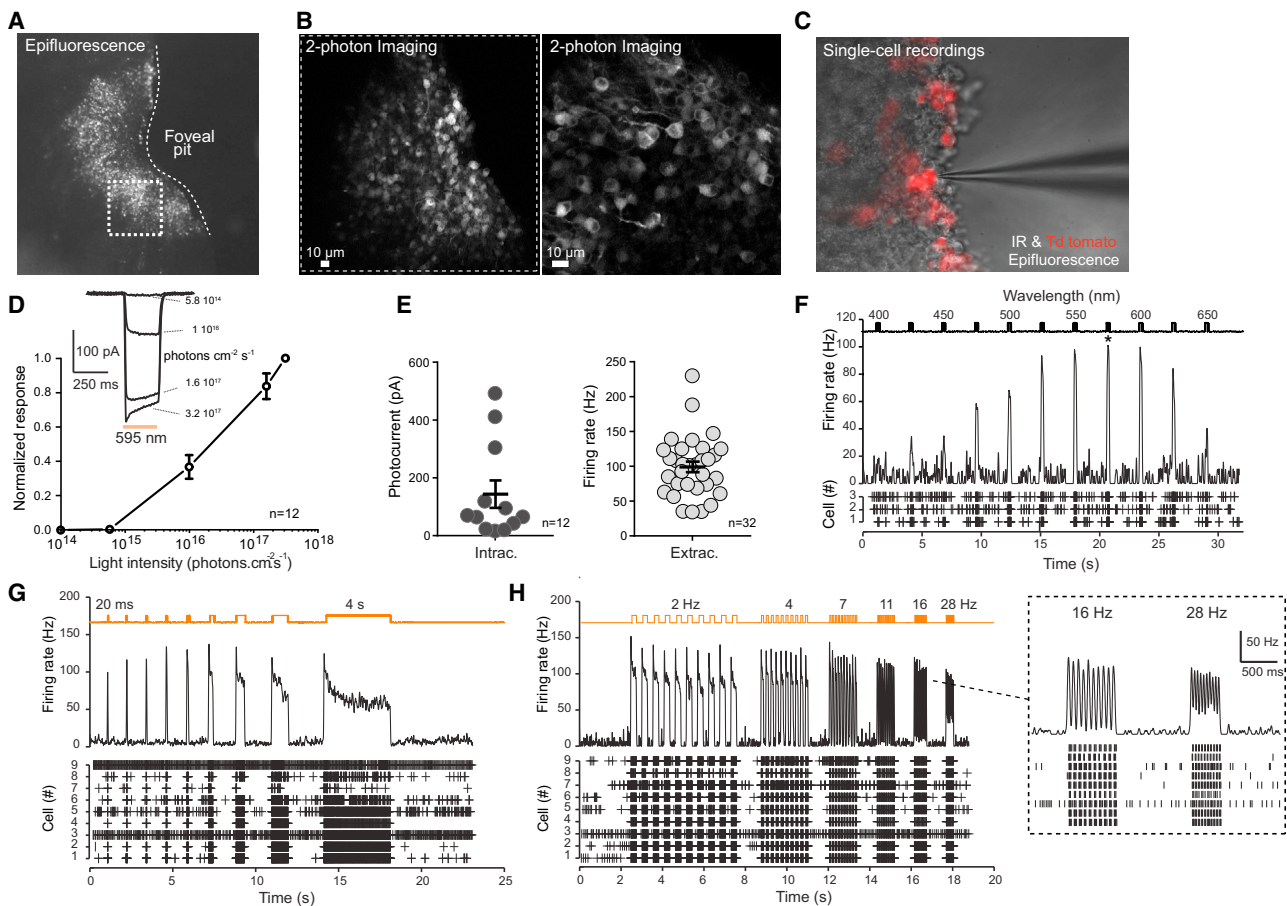
## RESULTS

The experiments were conducted on three monkeys (*Macaca fascicularis*), each of them receiving, in one eye, a single intra-vitreous injection of AAV2.7m8-ChR-tdT at a dose of  $5 \times 10^{11}$  vg/eye, the other eye being kept as a control. More than 20 months later, we performed *in vivo* cortical experiments to record VEPs to the retinal optogenetic stimulation. Subsequently, ~24 h after the euthanasia, we measured directly optogenetic responses on *ex vivo* retinal foveal explants. For every eye treated with ChR-tdT, half of the retina was used for single-cell RGC recordings and two-photon imaging, whereas the

other half was used for multi-electrode array (MEA) RGC population recordings and later histology.

The long-term functional expression of ChrimsonR-tdTomato (ChR-tdT) was assessed in the primate retina by *ex vivo* retinal recordings in the presence of glutamate receptor antagonists (see [materials and methods](#)), which were added to the bath solution to suppress any natural light response. Live epifluorescence images revealed a high density of transfected cells localized in the perifoveolar region, forming a torus shape ([Figure 1A](#)), mostly in the retinal ganglion cell layer ([Figures 1B and Video S1](#)). On some of these transfected RGCs, using two-photon live imaging, we observed small dendritic arbors, suggesting that at least some foveal midsize RGCs responsible for high-acuity vision<sup>31</sup> were expressing ChR-tdT ([Video S1](#)). Light sensitivity and temporal dynamics were measured, at the single-cell level, with the two-photon guided patch-clamp technique, on ChR-tdT-positive cells ([Figure 1C](#)). We found that the mean normalized photocurrent response increased significantly with increasing light intensity ([Figure 1D](#), top), reaching a value of  $143.6 \pm 47.4$  pA ( $n = 12$ ) at a light intensity of  $3 \times 10^{17}$  photons.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. In the loose-patch recording configuration, firing rate displayed a similar dependence on light level ( $99.03 \pm 7.59$  Hz,  $n = 32$  cells), also peaking at a light intensity of  $3 \times 10^{17}$  photons.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> ([Figure 1E](#), right). We then showed that the highest frequency responses were obtained for light stimuli at 575 nm ([Figure 1F](#)), corresponding to the excitation peak of ChrimsonR (590 nm).<sup>32</sup> We obtained reliable firing bursts with fast dynamics during the measurement of RGC responses to stimuli of increasing durations (20 ms–4 s,  $n = 9$ ; [Figure 1G](#)) or various flicker frequencies (10 repeats in full duty cycle) up to 28 Hz ( $n = 9$ ; [Figure 1H](#)). These results demonstrate the ability of these engineered cells to follow and resolve short, long, and fast light stimulations accurately up to frequencies very similar to the video-rate frequencies (~25 Hz) required for fluid movement perception and compatible with the limits for flicker perception reported for humans.<sup>33</sup>

In parallel, we used MEA recordings to investigate the responsiveness of the cell population in the transfected area ([Figures 2 and S2](#)). A large proportion of the perifovea contained a high density of ChR-tdT-expressing cells, as indicated by counting tdTomato-positive cells on projections of confocal stacks ([Figures 2A and 2B](#)). The MEA chip ([Figure 2C](#), top left) covered a large area of the hemifoveal retina flat mounts, making it possible to take recordings for a large proportion of the transfected RGCs ([Figure 2C](#), bottom left; [Figure S2A](#)). [Figures 2C](#) (right) and [S2C](#) show the global recorded activity for RGCs, represented as the firing rate of 256 sites over a period of 4 s in response to a 2-s flash of light. We performed 10 recordings in total, at a wavelength of 595 nm and a light intensity of  $7 \times 10^{16}$  photons.cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> ([Figure 2C](#), right). A large proportion of the recording sites were responsive, and the response observed was correlated to the degree of optogene expression, as determined by measuring tdTomato reporter fluorescence. Overall, in the two retinas for which we were able to obtain spontaneous activity, 45.5% of all active recording sites were also responsive to light stimulation (172 of 378 active sites; [Figure 2D](#)). We performed MEA recordings as a function of light



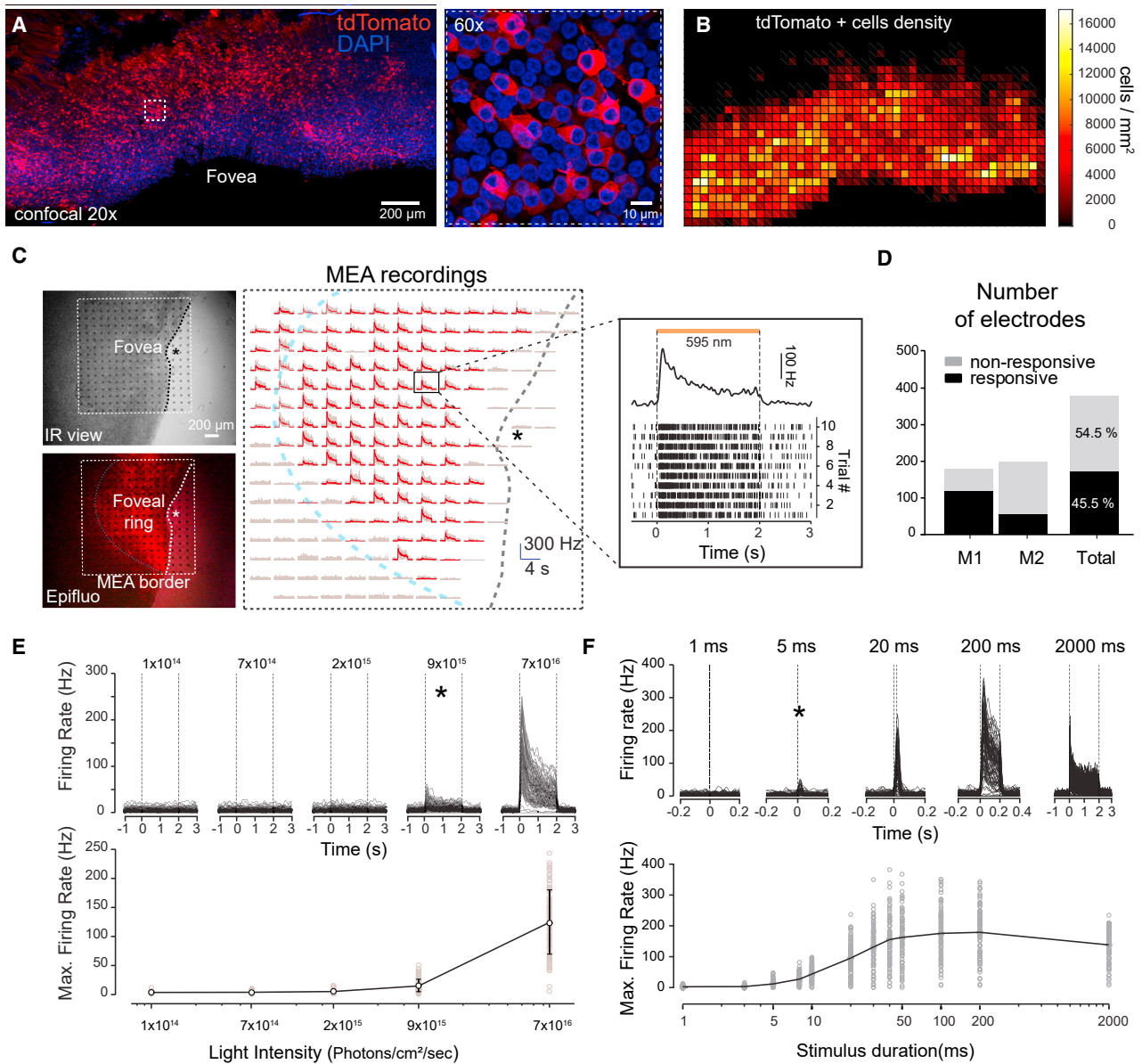
**Figure 1. Long-lasting expression of the optogene in the macaque perfoveal ring and two-photon guided single-cell recordings**

(A) Epifluorescence image of an *ex vivo* primate hemifovea expressing tdTomato-ChrimsonR (perfoveal ring) 20 months after the injection of AAV2.7m8-ChR-tdT at a dose of  $5 \times 10^{11}$  vg/eye. (B) Examples of two-photon images of tdTomato-positive cells in the retinal ganglion cell layer; the left panel represents the retinal area taken in the dotted square shown in (A), while the right panel shows an example from another transduced retina at higher magnification. (C) Combined infrared and epifluorescence image of tdTomato-expressing fluorescent cells during single-cell recordings with a glass electrode (patch-clamp or extracellular recordings). (D) Photocurrent response as a function of the intensity of the light stimulus in transfected retinal ganglion cells 20 months post injection, and comparison with earlier time points. Example of photocurrents (top) recorded in cells stimulated with light at 595 nm for 250 ms at intensities of  $5.8 \times 10^{14}$  to  $3.2 \times 10^{17}$  photons. $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Normalized intensity curve (bottom) for 12 patched cells. (E) Peak responses for photocurrent (left, patch-clamp data,  $n = 12$  cells) and firing rate (right, extracellular recordings,  $n = 32$  cells) recorded in RGCs for a light stimulus at a wavelength of 595 nm and an intensity of  $3.2 \times 10^{17}$  photons. $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Long horizontal black lines represent the mean  $\pm$  SEM. (F) Spectral tuning. RGC response (raster plot and firing rate) as a function of the stimulus wavelength tested, for wavelengths between 400 and 650 nm ( $n = 3$  cells). The peak response (asterisk) was observed at 575 nm. The black curve represents the mean cell response. (G) RGC response as a function of stimulus duration. Raster plot (bottom) for nine cells and firing rate (top), with stimuli of increasing duration, from 20 ms to 4 s. The black curve represents the mean cell response. (H) Temporal resolution. RGC activity as a function of stimulation frequency, represented as a raster plot (bottom) and firing rate (top), for 10 flicker repeats at frequencies from 2 Hz to 28 Hz ( $n = 9$  cells). The black curve represents the mean cell response.

intensity (Figure 2E). The results obtained were very similar to those obtained with the single-cell technique (Figures 1D and 1E). Indeed, the threshold light intensity for a response was found to be  $9 \times 10^{15}$  photons. $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . We then analyzed MEA responses as a function of stimulus duration (Figure 2F), at an intensity of  $7 \times 10^{16}$  photons. $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . In the two retinas tested, cells responded to stimuli with a duration of at least 5 ms, but not to stimuli of shorter duration.

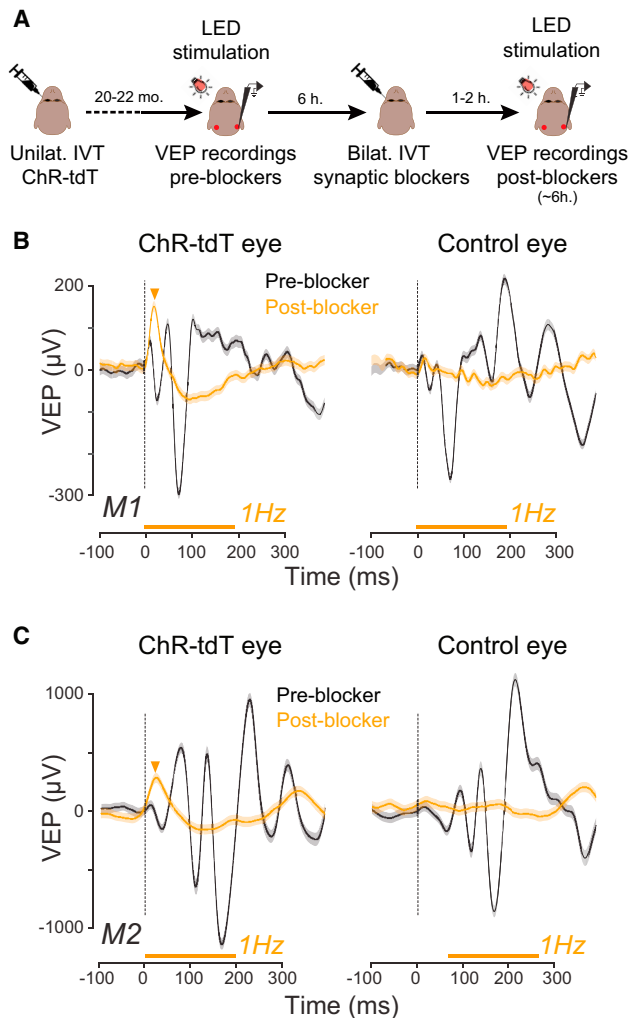
In living animals, we then investigated whether the optogenetic stimulation of these transfected RGCs could activate the visual pathway

*in vivo*. To this end, we recorded VEPs in response to different visual stimuli presented to the anesthetized animals during short-term experiments (Figure 3A). In this way, we were able to compare VEP responses before and after the intravitreal injection of synaptic blockers (2,3-piperidine dicarboxylic acid [PDA] and L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid [L-AP4]) into both eyes (Figure 3B) to block natural retinal responses to light.<sup>34</sup> The kinetic of action for the two blockers was first determined by a control electro-retinogram (ERG) experiment on a naive animal (Figure S3) that showed a complete suppression of the ERG's b-wave in 40 min that lasted 24 h.



**Figure 2. Expression and functionality: Multi-electrode array recordings**

(A) Projection of confocal stack stitches (20 $\times$  objective) showing the perifoveal area of M1 retina 20 months after treatment with a vector dose of  $5 \times 10^{11}$  vg/eye (left). ChR-tdT-expressing cells are shown in red, and the nuclei (in blue) are stained with DAPI. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ . (Right) higher magnification image (60 $\times$  objective). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Density map of ChR-tdT-positive RGCs for the hemifovea shown in (A). (C) Hemifovea RGC population recordings with an MEA (monkey M1). *Top left*, infrared view of the hemifovea with a 256-site MEA placed on the side of the RGC layer. *Bottom left*, epifluorescence image of the same retina showing tdTomato-ChrimsonR fluorescence. *Right*, global representation of the recorded RGC activity (firing rate) of the 256 sites during a 4-s period, with the application of a 2-s flash of light (at a wavelength of 595 nm). *Right, inset*, raster plot (bottom) and spike density function (top) of a representative recording site with 10 repeats. The dotted squares represent the MEA borders, the blue curves represent the approximate limits of ChrimsonR-tdTomato expression (half-donut shape), and the asterisks represent the center of the fovea. (D) Proportion of responsive versus non-responsive MEA electrodes for the retinas of the two primates (NHPs M1 and M2). (E) Firing rate (top) of 118 responsive electrodes (monkey M1 shown as an example) as a function of light stimulus intensity (black curves) and mean response intensity curve for these neurons (bottom). The asterisk represents the threshold light intensity for the elicitation of light responses. Light intensities of between  $1 \times 10^{14}$  and  $7 \times 10^{16}$  photons. $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  were tested. (F) Firing rate (top) of RGCs shown in (F) as a function of stimulus duration (black curves), and the mean population response curve (bottom). The asterisk represents the threshold light duration required to elicit light responses. Stimulus duration ranged from 1 ms to 2000 ms.



**Figure 3. Cortical responses after retinal ChrimsonR optogenetic stimulation**

(A) Experimental setup. Both animals received injections of AAV-ChrimsonR-TdTomato into one eye. We recorded VEP responses 20–22 months after the injection, following various protocols of LED flash stimulation of the anesthetized animals during ~6 h. We then injected intravitreally synaptic blockers (PDA + L-AP4) to block photoreceptor transmission. Finally, after a gap of 1–2 h, we recorded VEP responses for the same LED flash stimulation protocols during ~6 h. (B) VEP responses to the orange LED before (black curves) and after (orange curves) the injection of synaptic blocker for monkey M1. The left panel shows VEP responses following stimulation of the ChR-tdT eye, and the right panel shows the response to stimulation of the control eye. Orange triangles indicate the peak latencies of VEP responses after treatment with a synapse blocker. (C) VEP responses for monkey M2 (same representation as in [B]). The dashed vertical lines indicate the onset of the light stimulation, and orange horizontal solid lines the duration of the stimulations.

With the synaptic block, light stimulation directly activates the engineered cells rather than the normal retinal pathway. In monkey M1, before the injection of the blocker, both VEP responses (black curves) were similar after stimulation of the ChR-tdT-expressing eye with an orange LED (595 nm, ChR-tdT eye, left panel) and for stimulation of

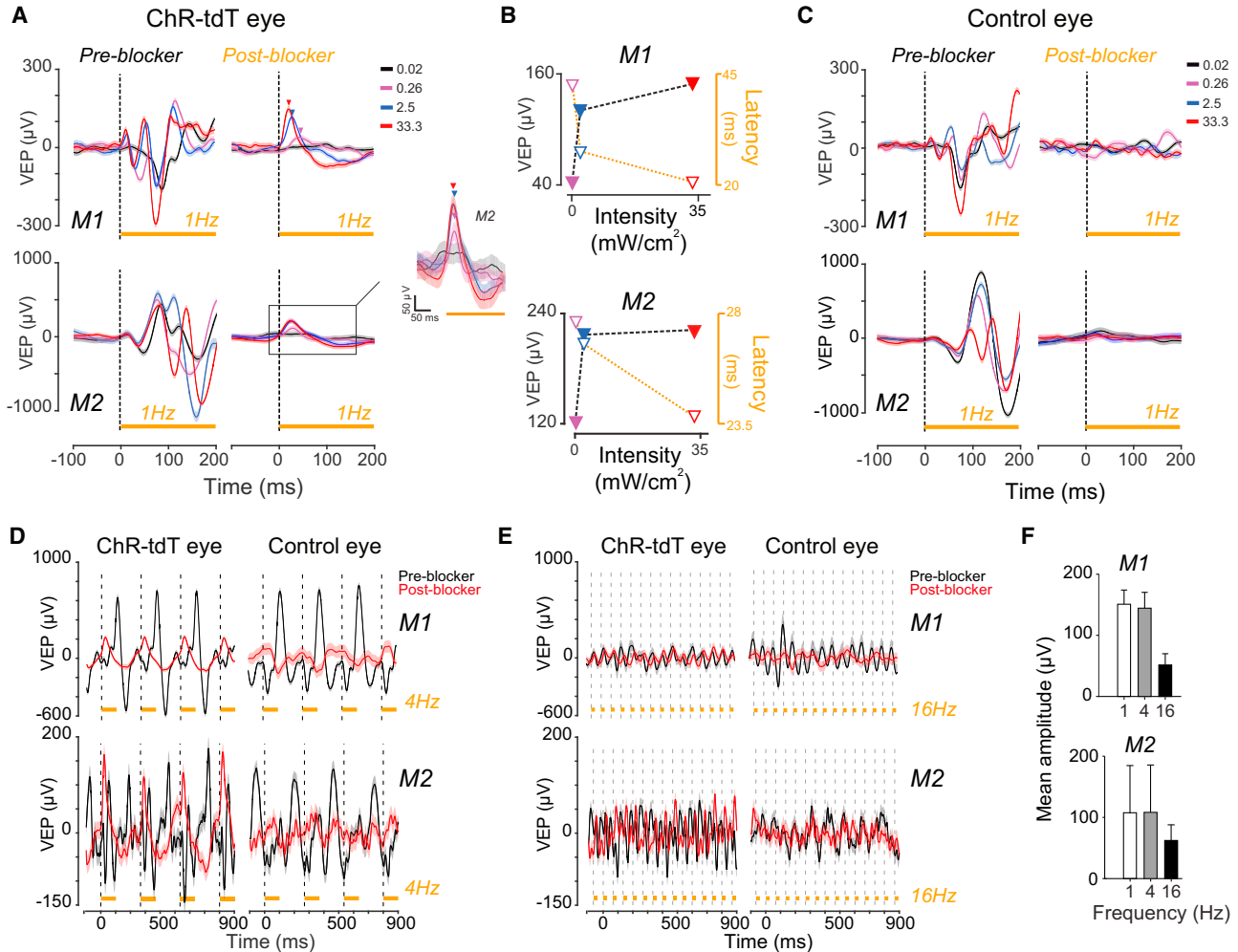
the control eye (right panel), confirming that the sequence of orange flashes in both eyes activated the visual pathway naturally. After the intravitreal injection of synaptic blockers and stimulation of the eye with the same orange LED, we noted major changes in the shape of the recorded VEP. The VEP responses of the ChR-tdT-expressing eye (Figure 3B, orange traces) were characterized by an early positive phase (21 ms, orange arrow) and a late, sustained negative phase. Interestingly, stimulation of the control eye resulted in a stable recording, with no early positive or subsequent negative phase. Similar results were obtained with a second animal (monkey M2; Figure 3C), with an early peak response at 24 ms. The latency of the first positive peak was 21–24 ms for both animals, which is much shorter than the latencies classically reported for natural VEP components (positive components occur at 50–81 ms) and observed here. These data are consistent with the notion that these VEP responses in the visual cortex were elicited by the direct activation of ChR-tdT-expressing RGCs.

We then investigated the effects of several parameters, such as the light intensity and frequency of the orange LED, on VEP responses for both treated and control eyes (Figure 4). The amplitude of positive peak responses increased proportionally to light intensity (from 43 to 152  $\mu$ V for monkey M1 and from 121 to 221  $\mu$ V for monkey M2), and the peak latencies of these responses decreased with increasing light intensity (Figure 4B); from 82 to 24 ms for monkey M1 and 28 to 24 ms for monkey M2). No significant VEP response was recorded for the control eye (Figure 4C; post-blocker condition), even at maximal light intensity, confirming that the glutamate receptor antagonists used effectively abolished the natural light response. We then recorded VEP responses in response to an orange LED flashed at a frequency of 4 Hz (Figure 4D) and 16 Hz (Figure 4E) to confirm that activation occurred earlier after the optogenetic stimulation of RGCs. VEP peaks occurred more rapidly after blocker administration (orange traces) than in the absence of blocker (black traces), with similar time periods observed for stimulation at 4 Hz and at 1 Hz (30–37 ms for monkey M1; Figure 3B). For monkey M2, the difference in time to VEP peak was larger at 4 Hz (82–84 ms) than at 1 Hz (~58 ms). After stimulation at 16 Hz, VEP traces followed the train of pulses both before and after the injection of synaptic blocker. Although mean amplitudes of VEP responses were similar for stimulations at 1 Hz and 4 Hz, they decreased drastically after stimulation at 16 Hz for both animals (Figure 4F). No such activation was observed following stimulation of the control eye, in either of the animals studied (Figures 4D and 4E; control eyes). These results demonstrate that optogenetic activation of the retina can trigger a transfer of information to higher visual centers, providing additional support for the potential of ChR-tdT for future therapeutic applications.

## DISCUSSION

We previously showed that a single intravitreal injection of AAV2.7m8.CAG.ChrimsonR-tdT can efficiently target the foveal region of the retina, especially foveal midjet RGCs,<sup>17</sup> which are responsible for high-acuity vision.<sup>31</sup> Using *ex vivo* live imaging and histology, we show here that expression persists in cells in the perifovea





**Figure 4. Cortical responses as a function of stimulus intensity and frequency**

(A) VEP responses to stimulation of the ChR-tdT eye with different light intensities before and after injection of blockers. We tested four different intensities at a frequency of 1 Hz (33.3, 2.5, 0.26, and 0.02  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ), as indicated by the color code. *Top row*, VEP responses for monkey M1. *Bottom row*, VEP responses for monkey M2. Each curve represents the mean VEP response and the SEM. The insert represents a magnification of monkey M2 post-blocker responses. Colored arrowheads indicate the maximum response amplitude detected at each light intensity in post-blocker condition. (B) Quantification of VEP responses peak amplitude and latency, as a function of light intensity in monkeys M1 (*top*) and M2 (*bottom*). Black dashed line with solid arrowheads represent response amplitudes, while orange dotted line with open arrowheads shows response latencies. (C) VEP responses in control eyes (same representation as in [A]). (D and E) VEP responses pre-blocker (black curves) and post-blocker (orange curves) for different light stimulation frequencies in treated or control eyes for both animals. Two different light frequencies (4 Hz in [D] and 16 Hz in [E]) were tested with a light intensity of 33.3  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . (F) Mean amplitudes of positive phases of VEP responses for different light frequencies (1, 4, and 16 Hz) for monkey 1 (*top*, M1) and monkey 2 (*bottom*, M2). Errors bars indicate SEM. The dashed vertical lines indicate the onset of the light stimulation, and orange solid horizontal lines the duration of the stimulations (200 ms for 1 Hz, 125 ms for 4 Hz, and 32 ms for 16 Hz).

region more than 20 months after the injection, and we demonstrate, with electrophysiological recordings, that these transfected RGCs remain functional, displaying rapid, robust responses. Previous studies based on *ex vivo* retinal recordings in NHP models have demonstrated efficient optogene expression for up to 6 months,<sup>9,15,17</sup> and a study based on retinal imaging *in vivo* extended this functional window up to 14 months.<sup>20</sup> This maintenance of activity so long after the injection is consistent with the notion that gene therapy can lead to long-term gene expression. Furthermore, despite the absence of

immunohistopathological results in our dataset, it provides additional evidence that the microbial opsin ChR-tdT does not induce an immune response that might eventually destroy the engineered RGCs. Indeed, the RGC responses were in a range similar to that recorded in our initial experiments,<sup>17</sup> and transfected cell density was also at similar levels. However, given the small number of replicates in this study and the considerable inter-subject variability previously observed after 2 or 6 months, it is difficult to make quantitative comparisons with earlier expression time points.

We demonstrate here, through *in vivo* VEP recordings, that the selective stimulation of transfected RGCs induces specific cortical responses. Based on our retinal observations, we can interpret these VEP recordings as reflecting the activation of cortical neurons due to the direct functional optogenetic activation of RGCs, leading to the synaptic transfer of information to cortical neurons. All previous studies on optogenetic RGC activation in the primate retina were performed on RGCs either *ex vitro*<sup>9,15,17</sup> or *in vivo*.<sup>20</sup> The recorded rates of RGC firing activity and the reported increases in calcium indicator fluorescence were highly suggestive of potential information transfer to the higher visual centers, but no experimental demonstration for the existence of this communication was provided. While our pharmacological blockers treatment does not recapitulate the extent of retinal degeneration diseases (i.e., cell loss and aberrant neuronal connectivity), it does cancel VEP recorded in control eyes and reveals the specific VEP responses elicited by direct optogenetic activation of RGCs in treated eyes. Here, by blocking the glutamatergic synaptic transmission in the retina, the optogenetic VEP responses had an earlier peak response than in normal VEPs. Such early cortical responses were recorded in blind rodents during optogenetic activation of either the dormant cones,<sup>14</sup> the bipolar cells,<sup>18,19</sup> or the RGCs.<sup>15,27</sup> This short VEP latency, recorded in absence of the photoreceptors signal transmission, does not fit with intrinsically photosensitive RGC (ipRGC) kinetic characteristics. Indeed, melanopsin-driven RGC light responses are consistently slower.<sup>34</sup> Although we cannot exclude a potential contribution of ipRGCs in our recordings, since blockers should not have a significant impact on these cells,<sup>35</sup> the short VEP response latencies observed are most likely the signature of direct optogenetic stimulation within the inner retina. The optogenetic activation would occur more rapidly than natural responses, due to the relative slowness of the phototransduction cascade and of synaptic information transfer between the different retinal layers. We showed that cortical VEP responses increased with light intensity. This result is highly consistent with the RGC spike recording on the isolated retina, with a clear relationship between RGC activity and light intensity. Given the high light levels used in our VEP experiments, the observed increases in VEP peak amplitudes with increasing light intensity are consistent with an optogenetic origin, because any residual natural light responses would be fully saturated at such light intensities. Finally, these VEP recordings show that optogenetic responses can follow frequencies of at least 16 Hz, as expected from the high temporal resolution achieved with RGCs in *ex vivo* single-cell recordings (Figure 1H). All these VEP recordings validate the therapeutic potential of ChR-tdT for restoring vision in blind patients.

If the recorded signal in the cortex is most probably of optogenetic origin, it is hard to estimate the degree of information it carries. The waveform of the signal is very different from the control recording and shows a simpler dynamic and lower amplitude. The simple biphasic response obtained after blockade might be explained by the functional bypass of outer retina circuitry that converts all the RGCs expressing the optogene into ON cells, independently of their actual type. Importantly, this also occurs with retinal electrical im-

plants restoration strategies that produce RGC excitations.<sup>1</sup> While deeply changing the activity output of the retina, these implants have been shown to elicit visual responses, nonetheless.<sup>2</sup> Concerning the variation in VEP response amplitudes, only a portion of the fovea RGCs are expressing ChrimsonR; as such, only a fraction of total retinal cells contribute to the VEPs isolated under synaptic blockade compared to pre-blocker conditions. In this regard, the decrease in signal amplitude to light flashes under blockers in ChR-tdT eyes compared to pre-blocker recordings is not surprising.

In conclusion, this study describes the cortical effect of an optogenetic stimulation of the primate retina and raises hopes of long-term functionality for optogenetic approaches in blind patients, who may benefit from this therapy.<sup>36</sup> It also opens up new avenues of research into the neural integration and computations occurring at the cortical level in NHPs, with a view to restoring the sensitivity of sensory organs through optogenetics.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Data were collected for three captive-born macaques (*Macaca fascicularis*; two males, monkey M1, monkey M2, weighing 3.2, and 3.9 kg, respectively; one female, monkey M0, 4.1 kg). Monkeys were housed in pairs and handled in strict accordance with the recommendations of the Weatherall Report on good animal practice. Monkey housing conditions, surgical procedures and experimental protocols were performed in strict accordance with the National Institutes of Health Guidelines (1996) and after validation of the European Council Directive (2010/63/EU), and the study was approved by the French government and institutional and regional committees for animal care (Committee C. Darwin, registration #9013). Our routine laboratory procedures included an environmental enrichment program, in which the monkeys were allowed visual, auditory, and olfactory contact with other animals and, when appropriate, could touch and groom each other.

### AAV production

ChrimsonR-tdTomato was inserted into an AAV backbone plasmid. The construct included a woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element and bovine growth hormone poly(A) sequences. Recombinant AAVs were produced by the plasmid cotransfection method,<sup>34</sup> and the resulting lysates were purified by iodixanol gradient ultracentrifugation, as previously described. Briefly, the 40% iodixanol fraction was concentrated and subjected to buffer exchange with Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units. Vector stocks were then titered for DNase-resistant vector genomes by real-time PCR relative to a standard.<sup>37</sup>

### Gene delivery

Primates were anesthetized with 10:1 mg/kg mixture of ketamine and xylazine. We injected 100  $\mu$ L of viral vector suspension into the vitreous of one eye in each animal. Following the injection, an ophthalmic steroid and an antibiotic ointment were applied to the cornea. Experiments were conducted 21, 20, and 22 months after injection for M0, M1, and

M2, respectively. None of the treated animals displayed any sign of photophobia or vision-related behavioral changes during housing.

### Recording of VEPs

We performed *in vivo* VEP recordings 20 to 22 months after AAV injection, during a terminal experiment in two animals (M1 and M2). Briefly, anesthesia was induced with ketamine (0.2 mg/kg, intramuscular [i.m.]) and dexmedetomidine (0.015 mg/kg, i.m.) and maintained with alfaxan (0.1 mg/kg, min, i.v.). The monkey was placed in a stereotaxic frame, and heart rate, temperature, respiration and peripheral oxygen saturation were monitored throughout the experiment. Eye drops were used to dilate the pupils (0.5% tropicamide). Lubrithal eye gel was used to maintain good corneal moisture. We placed four electrodes in subcutaneous positions: two at each temple and two at each occipital operculum (left and right), and we set the high- and low-pass filters to 50 Hz and 0.05 Hz, respectively, on an RZ-2 amplifier (Tucker Davis, Alachua, FL, USA). Light stimuli were generated with an orange LED (M595L3 from Thorlab, 595 nm) equipped with a plano-convex lens for collimation (LA1805-A-ML, Thorlabs). The LED was positioned 3 cm away from the eye, and the light spot was centered on the dilated pupil. VEP responses were recorded before and after the intravitreal injection of synaptic blockers—PDA and L-AP4—used to block natural light responses.<sup>38</sup> We injected intravitreally 100  $\mu$ L of a PBS solution containing PDA (200mM) and L-AP4 (40mM). The fascicularis eyeball has a 2.1-mL volume of aqueous humor,<sup>39</sup> leading, at full dilution, to a final concentration of 10 mM PDA and 2 mM L-AP4. The two eyes were injected at the same time (inside a 7-min window), and we started recording VEPs in response to light flashes at 1–2 h post injection and finished acquisition at +7 to +8 h. For both animals, we started recordings responses on the control eye and then on the injected eye (+1 or +2 to ~5 h control eye, ~5 to +7 or +8 h treated eye). The eyes of the monkeys were subjected to flash stimuli at various intensities (from 0.02 to 33.3 mW/cm<sup>2</sup>) and frequencies (1, 4, and 16 Hz). The duration of the stimuli was 200, 125, and 32 ms for frequencies of 1, 4, and 16 Hz, respectively. We made 300 consecutive recordings of each VEP response and then averaged response waveforms for each VEP measurement. VEP responses were similar for the ipsilateral and contralateral electrodes. We therefore present VEP responses for the electrode contralateral to the injected eye only.

### Primate retina isolation and preservation

After the *in vivo* VEP recordings, the primates received a lethal dose of pentobarbital. Their eyeballs were removed, perforated with a sterile 20-gauge needle and placed in sealed bags with CO<sub>2</sub> independent medium (Thermo Fisher scientific) for transport. The retinae were isolated, and the RPE was removed and stored as retinal explants in an incubator for ~24 h before recording. Hemifoveal retina fragments were transferred to Neurobasal + B27 medium in polycarbonate Transwell microporous membrane inserts (Corning) for conservation in the cell culture incubator. These hemifoveal regions were subsequently used for simultaneous single-cell and MEA recordings. We abolished all natural responses entirely, by applying pharmacological blockers (see below).

### Two-photon live imaging and single-cell electrophysiological recordings

A custom-built two-photon microscope equipped with a 25 $\times$  water immersion objective (XLPLN25xWMP, NA: 1.05, Olympus) with a pulsed femtosecond laser (InSight DeepSee, Newport Corporation) was used for imaging ChR-tdT-positive RGCs. AAV-treated macaque retinae were imaged in oxygenized (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Ames medium (Sigma-Aldrich). For live two-photon imaging, whole-mount retinae (without the RPE attached) were placed in the recording chamber of the microscope (ganglion cell layer side up), and images and *z* stacks were acquired with the excitation laser at a wavelength of 1,050 nm. Images were processed offline with ImageJ.

We used an Axon Multiclamp 700B amplifier for whole-cell patch-clamp and cell-attached recordings. Patch electrodes were made from borosilicate glass (BF100-50-10, Sutter Instruments) and pulled to 7–9 M $\Omega$ . Pipettes were filled with 115 mM potassium gluconate, 10 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, and 4 mM ATP-Na<sub>2</sub> (pH 7.2). We clamped the cells at a potential of –60 mV, to isolate excitatory currents. Recordings were also performed in the loose-patch configuration with the pipettes filled with Ames medium, to record spiking activity. The retinae were dark-adapted for at least 30 min in the recording chamber before recordings. AMPA/kainate glutamate receptor antagonist, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 25  $\mu$ M, Sigma-Aldrich), NMDA glutamate receptor antagonist, [3H]3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP, 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich), and a selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4, 50  $\mu$ M, Tocris Bioscience, Bristol, UK) were diluted to the appropriate concentration from stock solutions and added to the Ames medium before recordings.

### MEA

MEA recordings were obtained for retinal fragments (without the RPE attached) placed on a cellulose membrane that had been incubated with polylysine (0.1%, Sigma) overnight. Once on the micromanipulator, the piece of retina was gently pressed against an MEA (MEA256 100/30 iR-ITO; Multi-Channel Systems, Reutlingen, Germany), with the RGCs toward the electrodes. We measured tdTomato fluorescence to check that the retina was correctly positioned before making recordings under a Nikon Eclipse Ti inverted microscope (Nikon, Dusseldorf, Germany) with the MEA system mounted on the stage. The retina was continuously perfused with Ames medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at 34°C, at a rate of 1–2 mL/min during experiments. AMPA/kainate glutamate receptor antagonist, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 25  $\mu$ M, Sigma-Aldrich), NMDA glutamate receptor antagonist, [3H]3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP, 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich), and a selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4, 50  $\mu$ M, Tocris Bioscience, Bristol, UK) were diluted to the appropriate concentration from stock solutions and added to the bath through the perfusion system for 10 min before recordings. Action potentials were identified on

the filtered electrode signal (second-order high-pass Butterworth, cutoff frequency 200 Hz), with a threshold of 4 times the SD of the signal. Spike density function was calculated, averaged over repeat stimulations, and used to determine the maximal firing rate over a time window corresponding to the duration of the stimulus plus 50 ms. In comparisons of responses between light intensities, we calculated, for each electrode, the added firing rate as the maximal firing rate minus the spontaneous firing rate for the electrode concerned, which was calculated as the mean firing rate in the 2 s before stimulation.

### Photostimulation for ex vivo experiments

For single-cell electrophysiological recordings, full-field photostimulation was performed with a Polychrome V monochromator (Olympus, Hamburg, Germany) set to 595 nm ( $\pm 10$  nm), and output light intensities were calibrated and ranged from  $5.8 \times 10^{14}$  to  $3.15 \times 10^{17}$  photons.cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. For spectral sensitivity experiments, stimulation wavelengths between 400 and 650 nm were tested, in 25-nm steps. For flicker stimulation, 10 repeats were used in full duty cycle, at frequencies ranging from 2 Hz to 28 Hz. For MEA recordings, full-field light stimuli were applied with another Polychrome V monochromator set to 595 nm ( $\pm 10$ nm), driven by a STG2008 stimulus generator (MCS). Output light intensities were calibrated and ranged from  $1.37 \times 10^{14}$  to  $6.78 \times 10^{16}$  photons.cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. For intensity curves, we used 2-s flashes at five intensities ( $1.37 \times 10^{14}$ ,  $6.56 \times 10^{14}$ ,  $2.34 \times 10^{15}$ ,  $8.82 \times 10^{15}$ ,  $6.78 \times 10^{16}$  photons.cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), each repeated 10 times, with a 5-s interval between stimuli. For the duration of stimulation assay, we used 12 different durations (ranging from 1 to 2000 ms), each repeated 10 times, with a 5-s interval between stimuli. Calibrations were performed with a spectrophotometer (USB2000+, Ocean Optics, Dunedin, FL).

### Confocal imaging and quantification

After MEA experiments, the tissue was recovered and fixed by incubation with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature, rinsed with PBS, and stored at 4°C in sodium azide solution. Hemifoveas were then mounted in Vectashield containing DAPI (H-1000, Vector Laboratories) on slides and covered with a coverslip (18 × 18 mm, Biosigma), using a 100- $\mu$ m spacer (Secure-seal space S24735, Thermo Fisher Scientific), which was sealed with nail polish. The retinas were imaged on an inverted confocal microscope (Fluoview 1200, Olympus), with a 20 $\times$  objective (UPLSAPO 20XO, NA: 0.85, Olympus), voxel sizes of 0.265–0.388  $\mu$ m/pixel in the *x* and *y* directions and 1.64  $\mu$ m/pixel in the *z* direction. For each hemifovea, we recorded multiple stacks and reconstituted an automatic stitch (10% overlap). Using Td-tomato fluorescence, we performed manual 3D counts of the transfected cells in ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) with the cell counter plugin. The results were then processed with custom-developed MATLAB analysis software for the calculation of *local density*.

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.11.009>.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Morgane Weissenburger, Estelle Chavret-Reculon, Lucile Aubree, Corina Dussaud, and Benedicte Daboval for their superb animal care. We thank Valérie Fradot for technical assistance with primate tissue preparation. This project was supported by Bpifrance (grant reference 2014-PRSP-15), Gensight Biologics, Foundation Fighting Blindness, Fédération des Aveugles de France, and by French state funds managed by the Agence Nationale de la Recherche within the *Investissements d'Avenir* program, RHU LIGHT4DEAF [ANR-15-RHU-0001], LABEX LIFESENSES [ANR-10-LABX-65], IHU FOReSIGHT [ANR-18-IAHU-0001], [ANR-11-IDEX-0004-02].

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, A.C., S.P., F.A. and G.G.; methodology and performance of experiments, A.C., M.P., C.J., K.B., G.L., R.G., E.Bu., E.Br., F.A., and G.G.; formal analysis, A.C., C.J., G.G., and F.A.; writing – original draft, A.C., F.A., G.G., and S.P.; writing – review & editing, A.C., F.A., G.G., P.P., and S.P.; supervision and funding, J-A.S., S.P., F.A., and G.G.

### DECLARATION OF INTERESTS

S.P. is a consultant for *Gensight Biologics*; J-A.S. and S.P. have financial interests in *Gensight Biologics*. G.G., J-A.S., and S.P. have filed a patent application relating to the gene therapy construct presented here.

### REFERENCES

- Palanker, D., Le Mer, Y., Mohand-Said, S., Muqit, M., and Sahel, J.A. (2020). Photovoltaic restoration of central vision in atrophic age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 127, 1097–1104.
- Prévo, P.H., Gehe, K., Arcizet, F., Akolkar, H., Khoei, M.A., Blaize, K., Oubari, O., Daye, P., Lanoë, M., Valet, M., et al. (2020). Behavioural responses to a photovoltaic subretinal prosthesis implanted in non-human primates. *Nat. Biomed. Eng.* 4, 172–180.
- Stingl, K., Schippert, R., Bartz-Schmidt, K.U., Besch, D., Cottrill, C.L., Edwards, T.L., Gekeler, F., Greppmaier, U., Kiel, K., Koitschev, A., et al. (2017). Interim results of a multicenter trial with the new electronic subretinal implant alpha AMS in 15 patients blind from inherited retinal degenerations. *Front. Neurosci.* 11, 445.
- da Cruz, L., Dorn, J.D., Humayun, M.S., Dagnelie, G., Handa, J., Barale, P.O., Sahel, J.A., Stanga, P.E., Hafezi, F., Safran, A.B., et al. (2016). Five-year safety and performance results from the argus II retinal prosthesis system clinical trial. *Ophthalmology* 123, 2248–2254.
- Shirai, H., Mandai, M., Matsushita, K., Kuwahara, A., Yonemura, S., Nakano, T., Assawachananont, J., Kimura, T., Saito, K., Terasaki, H., et al. (2016). Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, E81–E90.
- Barnea-Cramer, A.O., Wang, W., Lu, S.J., Singh, M.S., Luo, C., Huo, H., McClements, M.E., Barnard, A.R., MacLaren, R.E., and Lanza, R. (2016). Function of human pluripotent stem cell-derived photoreceptor progenitors in blind mice. *Sci. Rep.* 6, 1–15.
- Garita-Hernandez, M., Lampič, M., Chaffiol, A., Guibbal, L., Routet, F., Santos-Ferreira, T., Gasparini, S., Borsch, O., Gagliardi, G., Reichman, S., et al. (2019). Restoration of visual function by transplantation of optogenetically engineered photoreceptors. *Nat. Commun.* 10, 1–13.
- Gagliardi, G., Ben M'Barek, K., and Goureau, O. (2019). Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: a pluripotent stem cell-based approach. *Prog. Retin. Eye Res.* 71, 1–25.



9. Ivanova, E., Hwang, G.S., Pan, Z.H., and Troilo, D. (2010). Evaluation of AAV-mediated expression of chop2-GFP in the marmoset retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 5288–5296.
10. Bi, A., Cui, J., Ma, Y.P., Olshevskaya, E., Pu, M., Dizhoor, A.M., and Pan, Z.H. (2006). Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* *50*, 23–33.
11. Gaub, B.M., Berry, M.H., Holt, A.E., Isacoff, E.Y., and Flannery, J.G. (2015). Optogenetic vision restoration using rhodopsin for enhanced sensitivity. *Mol. Ther.* *23*, 1562–1571.
12. Cehajic-Kapetanovic, J., Eleftheriou, C., Allen, A.E., Milosavljevic, N., Pienaar, A., Bedford, R., Davis, K.E., Bishop, P.N., and Lucas, R.J. (2015). Restoration of vision with ectopic expression of human rod opsin. *Curr. Biol.* *25*, 2111–2122.
13. Berry, M.H., Holt, A., Salari, A., Veit, J., Visel, M., Levitz, J., Aghi, K., Gaub, B.M., Sivyer, B., Flannery, J.G., et al. (2019). Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin. *Nat. Commun.* *10*, 1–12.
14. Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siegert, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., Seeliger, M., et al. (2010). Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* *329*, 413–417.
15. Chaffiol, A., Caplette, R., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Desrosiers, M., Dubus, E., Duhamel, L., Macé, E., Marre, O., Benoit, P., et al. (2017). A new promoter allows optogenetic vision restoration with enhanced sensitivity in macaque retina. *Mol. Ther.* *25*, 2546–2560.
16. Gaub, B.M., Berry, M.H., Holt, A.E., Reiner, A., Kienzler, M.A., Dolgova, N., Nikonov, S., Aguirre, G.D., Beltran, W.A., Flannery, J.G., et al. (2014). Restoration of visual function by expression of a light-gated mammalian ion channel in retinal ganglion cells or ON-bipolar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *111*, E5574–E5583.
17. Gauvain, G., Akolkar, H., Chaffiol, A., Arcizet, F., Khoei, M.A., Desrosiers, M., Jaillard, C., Caplette, R., Marre, O., Bertin, S., et al. (2021). Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern discrimination compatible with vision restoration in non-human primates. *Commun. Biol.* *4*, 1–15.
18. Lagali, P.S., Balya, D., Awatramani, G.B., Münch, T.A., Kim, D.S., Busskamp, V., Cepko, C.L., and Roska, B. (2008). Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat. Neurosci.* *11*, 667–675.
19. Macé, E., Caplette, R., Marre, O., Sengupta, A., Chaffiol, A., Barbe, P., Desrosiers, M., Bamberg, E., Sahel, J.A., Picaud, S., et al. (2015). Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores on and off visual responses in blind mice. *Mol. Ther.* *23*, 7–16.
20. McGregor, J.E., Godat, T., Dhakal, K.R., Parkins, K., Strazzeri, J.M., Bateman, B.A., Fischer, W.S., Williams, D.R., and Merigan, W.H. (2020). Optogenetic restoration of retinal ganglion cell activity in the living primate. *Nat. Commun.* *11*, 1–9.
21. Lin, B., Koizumi, A., Tanaka, N., Panda, S., and Masland, R.H. (2008). Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *105*, 16009–16014.
22. Wright, A.F., Chakarova, C.F., Abd El-Aziz, M.M., and Bhattacharya, S.S. (2010). Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 273–284.
23. Khabou, H., Garita-Hernandez, M., Chaffiol, A., Reichman, S., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Bertin, S., Forster, V., Desrosiers, M., Winckler, C., et al. (2018). Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. *JCI Insight* *3*, e96029.
24. Jacobson, S.G., Sumaroka, A., Luo, X., and Cideciyan, A.V. (2013). Retinal optogenetic therapies: clinical criteria for candidacy. *Clin. Genet.* *84*, 175–182.
25. Picaud, S., Dalkara, D., Marazova, K., Goureaux, O., Roska, B., and Sahel, J.A. (2019). The primate model for understanding and restoring vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *116*, 26280–26287.
26. Isago, H., Sugano, E., Wang, Z., Murayama, N., Koyanagi, E., Tamai, M., and Tomita, H. (2012). Age-dependent differences in recovered visual responses in Royal College of Surgeons rats transduced with the Channelrhodopsin-2 gene. *J. Mol. Neurosci.* *46*, 393–400.
27. Sato, M., Sugano, E., Tabata, K., Sannohe, K., Watanabe, Y., Ozaki, T., Tamai, M., and Tomita, H. (2017). Visual responses of photoreceptor-degenerated rats expressing two different types of channelrhodopsin genes. *Sci. Rep.* *7*, 1–10.
28. Arens-Arad, T., Farah, N., Lender, R., Moshkovitz, A., Flores, T., Palanker, D., and Mandel, Y. (2020). Cortical interactions between prosthetic and natural vision. *Curr. Biol.* *30*, 176–182.e2.
29. Le Meur, G., Lebranchu, P., Billaud, F., Adjali, O., Schmitt, S., Béziau, S., Péréon, Y., Valabregue, R., Ivan, C., Darmon, C., et al. (2018). Safety and long-term efficacy of AAV4 gene therapy in patients with RPE65 leber congenital amaurosis. *Mol. Ther.* *26*, 256–268.
30. Gauvain, G., and Murphy, G.J. (2015). Projection-specific characteristics of retinal input to the brain. *J. Neurosci.* *35*, 6575–6583.
31. Dacey, D.M., and Petersen, M.R. (1992). Dendritic field size and morphology of midganglion and parasol ganglion cells of the human retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *89*, 9666–9670.
32. Klapoetke, N.C., Murata, Y., Kim, S.S., Pulver, S.R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y.K., Morimoto, T.K., Chuong, A.S., Carpenter, E.J., Tian, Z., et al. (2014). Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat. Methods* *11*, 338–346.
33. Hecht, S., and Verrijp, C.D. (1933). The influence of intensity, color and retinal location on the fusion frequency of intermittent illumination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *19*, 522–535.
34. Mure, L.S. (2021). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells of the human retina. *Front. Neurol.* *12*, 1–10.
35. Gamlin, P.D.R., McDougal, D.H., Pokorny, J., Smith, V.C., Yau, K.W., and Dacey, D.M. (2007). Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vis. Res.* *47*, 946–954.
36. Sahel, J.A., Boulanger-Scemama, E., Pagot, C., Arleo, A., Galluppi, F., Martel, J.N., Esposti, S.D., Delaux, A., de Saint Aubert, J.B., de Montleau, C., et al. (2021). Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat. Med.* *27*, 1223–1229.
37. Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A., et al. (2012). Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods* *23*, 18–28.
38. Sieving, P.A., Murayama, K., and Naarendorp, F. (1994). Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Vis. Neurosci.* *11*, 519–532.
39. Missel, P.J. (2012). Simulating intravitreal injections in anatomically accurate models for rabbit, monkey, and human eyes. *Pharm. Res.* *29*, 3251–3272.

**Supplemental information**

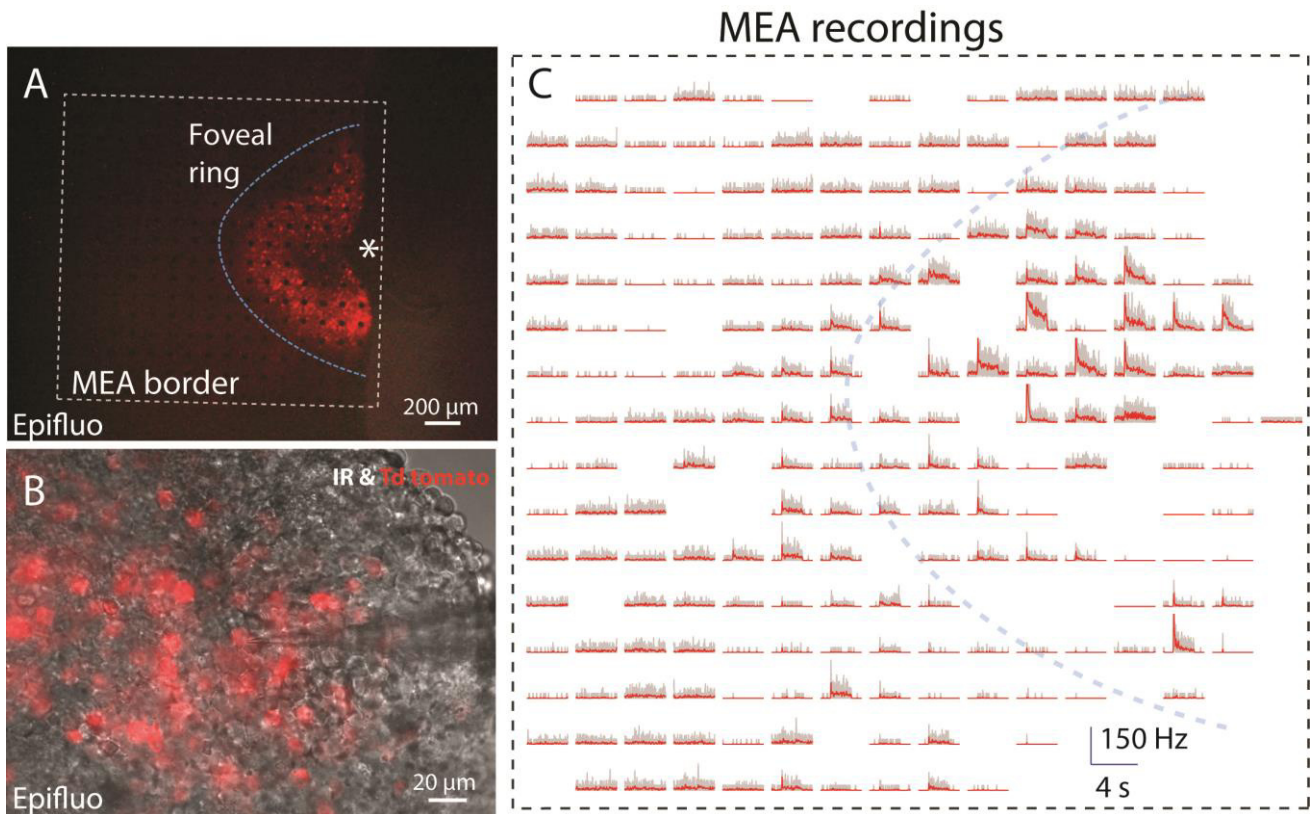
***In vivo* optogenetic stimulation  
of the primate retina activates the visual  
cortex after long-term transduction**

**Antoine Chaffiol, Matthieu Provansal, Corentin Joffrois, Kévin Blaize, Guillaume Labernede, Ruben Goulet, Emma Burban, Elena Brazhnikova, Jens Duebel, Pierre Pouget, José Alain Sahel, Serge Picaud, Fabrice Arcizet, and Gregory Gauvain**

## Supplementary Data

**Fig. S1. Movie. 2-Photon live imaging examples: large volume of M1 hemifovea, followed by a smaller volume at higher magnification of M2 hemifovea.**

A 500 x 500 x 150  $\mu\text{m}$  volume of M1 retina or a 250 x 250 x 100  $\mu\text{m}$  volume of M2 retina were imaged at an excitation wavelength of 1050 nm to visualize cells expressing the fluorescent reporter TdTomato. ImageJ and the 3Dviewer plugin were used to create a video of the two imaged areas, revealing a high density of fluorescent cells in the RGC layer (M1). Small dendritic trees arborizations belonging to putative midget ganglion cells are discernible (M2).

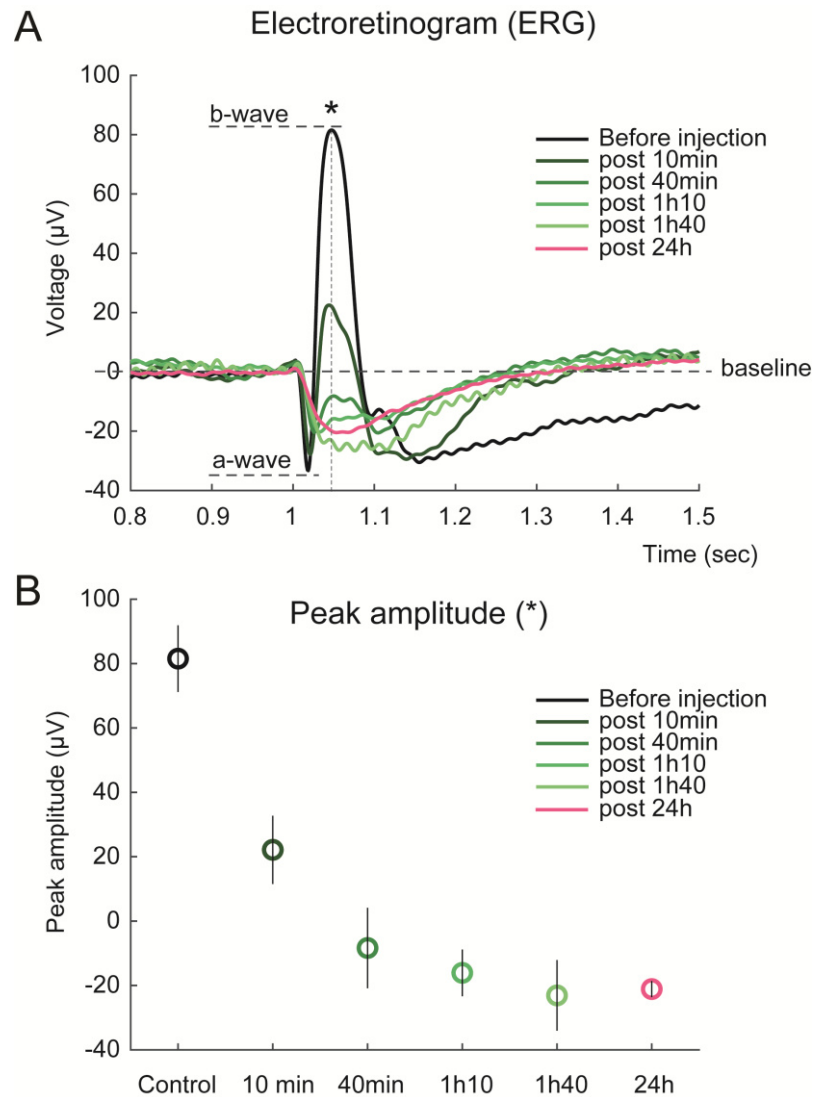


**Fig. S2. Expression and functionality: monkey M2.**

(A) Epifluorescence image of monkey M2 hemifovea showing ChrimsonR-tdTomato fluorescence with a 256-site MEA placed against the RGC layer.

(B) Combined infrared and epifluorescence image of tdTomato fluorescent cells during single-cell recordings with a glass electrode (patch-clamp or extracellular recordings). Images were acquired from the second hemifovea.

(C) Global representation of the recorded RGC activity (firing rate) for the 256 MEA recording sites shown in (A) over a period of 4 s, with the application of a 2 s flash of light (at a wavelength of 595 nm). The dotted squares represent the MEA borders, the blue curves represent the approximate limits of ChrimsonR-tdTomato expression (half-taurus shape) and the asterisk represents the center of the fovea.



**Fig. S3. Electroretinograms: Pharmacological blockade of photoreceptors input.**

ERG recordings were performed using Tucker Davis RZ-2 amplifier. The control animal was anesthetized as describe in the VEP recording methods section. Clip retractable electrode was positioned at the limbus of the recorded eye (as described in Rosolen et al. 2005, see complete reference below). A needle electrode placed subcutaneously in the cheek served as reference and a needle electrode placed in the jaw served as earth. Recordings started 30 min after anesthesia while under normal room lighting. Light stimuli were delivered with the same amber LED (595 nm) as VEP recordings, at a light intensity of 2.5 mW/cm<sup>2</sup>.

(A) Electroretinograms (ERGs) recorded from the same eye before (black curve) and after intravitreal injection of the blockers (colored curves) at different time points (10min, 40min, 1h10 min, 1h40min and 24h post-injection).

(B) Amplitude measured from (A) at a fixed time point corresponding to the b-wave peak value before injection (\* and vertical dotted line). The b wave is totally eliminated approximately 40 minutes after the blockers injection.

Rosolen, S. G., Rigaudière, F., Le Gargasson, J. F., & Brigell, M. G. (2005). Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Documenta Ophthalmologica*, 110(1), 57–66.