



La lettre.

La Lettre des Neurosciences
Bulletin de la Société des Neurosciences

Printemps - Été 2009 N°36

Sommaire

Éditorial	p. 2
Histoire des Neurosciences	p. 3
• Le syndrome de Wernike-Korsakoff : un premier pas vers l'anatomie.	
Clubs	p. 8
• Évolution du club de la BHE et naissance de la Société d'Étude des interfaces entre le sang et le cerveau	
Dossier	p. 9
• La transgénèse au secours de la neuroanatomie	
Jeunes chercheurs	p. 15
• Les soutiens de la Société des Neurosciences aux jeunes chercheurs	
Colloques thématiques de la Société des Neurosciences	p. 21
• Brain Diseases and Molecular Machines 2008 : spotlights from evolution, development and Network biology	
• NeuroComp08	
• Programming and epigenetics	
Brèves	p. 22

La transgénèse au secours de la neuroanatomie

par Luc Dupuis



Introduction

À l'aide d'instruments et de techniques rudimentaires comparées à ceux dont nous disposons aujourd'hui, Ramon y Cajal a décrit au XIX^e siècle la diversité des cellules du système nerveux central (SNC) avec une finesse et une précision absolument remarquable. Malgré une somme de connaissances et de travail colossal depuis ces travaux fondateurs, les successeurs de Ramon y Cajal sont, toujours, confrontés aux mêmes problèmes pour décrire l'anatomie du système nerveux.

Il y a deux niveaux de complexité principaux dans la description du SNC (*figure 1*). Le premier d'entre eux est la grande diversité, sans doute encore largement sous-estimée, des types cellulaires présents dans notre cerveau. Les très nombreux types de neurones possèdent chacun des caractéristiques uniques, comme leur équipement en récepteur(s) ou leur expression de neurotransmetteurs, qui permettent d'expliquer leurs particularités fonctionnelles. Dans certains cas, il est aisé d'identifier un type neuronal par sa morphologie, sa taille ou sa position anatomique. Ainsi, les motoneurones inférieurs sont facilement identifiables dans la corne antérieure de la moelle épinière grâce à leur très grande taille. Cependant, les critères de localisation et de morphologie ne sont pas toujours suffisants. Par exemple, des neurones apparemment similaires peuvent avoir des fonctions complètement différentes. C'est le cas des neurones épineux du striatum qui sont de deux types différents, D1 et D2, en fonction du récepteur à la dopamine qu'ils expriment.

Ces deux types de neurones sont impliqués dans des circuits neuronaux différents et ne remplissent pas les mêmes fonctions. Pourtant, leur morphologie ou leur localisation sont identiques et il est nécessaire d'utiliser des marqueurs moléculaires pour les distinguer. Cette diversité cellulaire ne se restreint pas aux neurones et il existe sans aucun doute de très nombreux types de cellules gliales. Cependant, leur étude, plus récente, n'a pas encore dévoilé complètement leur probable diversité. Dans le cas des astrocytes, on sait déjà que les astrocytes de la moelle épinière expriment des marqueurs distincts en fonction de leur position[1] et qu'il existe donc probablement des sous types astrocytaires susceptibles d'être impliqués dans des fonctions différentes. Le phénotypage des différentes populations cellulaires du SNC n'est donc encore que très imparfait.

Cette hétérogénéité des types cellulaires du SNC n'est que le premier niveau de sa complexité. En effet, en plus d'être très diverses, les cellules du SNC sont extrêmement interconnectées : chaque neurone est susceptible de recevoir de très nombreux influx et est lui-même capable d'innervier plusieurs autres cellules. De façon évidente, les connexions que font (ou ne font pas) les neurones entre eux conditionnent leur(s) fonction(s). Une description complète du système nerveux central ne devrait donc pas se limiter à une énumération des différents types cellulaires, mais être complétée par une cartographie extensive des connexions anatomiques entre ces différentes cellules (*figure 1*) pour comprendre leurs interrelations. Une telle description permettrait sans aucun doute de mieux comprendre la physiologie du SNC, mais elles auraient des répercussions importantes dans la compréhension que nous avons des pathologies nerveuses.

Certains développements récents dans la description du système nerveux central ont été amenés par la création de nouvelles lignées de souris transgéniques. Grâce à ces nouveaux outils, nous pouvons espérer accéder à une description la plus précise possible de notre cerveau. L'objet de ce dossier est de présenter plus en détail deux avancées technologiques dans ce domaine. La technique TRAP permet de mieux caractériser la diversité cellulaire du SNC tandis que les souris Brainbow aideront à une cartographie des connexions neuronales.

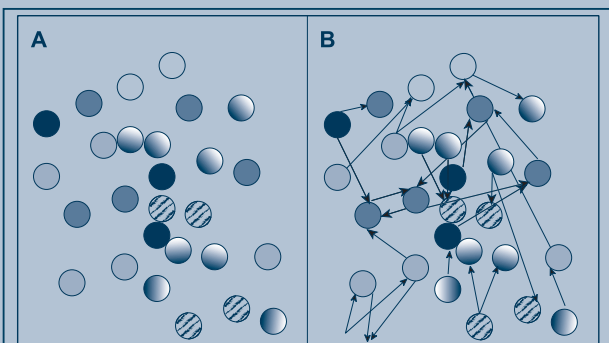


Figure 1 : deux problèmes pour décrire le SNC
A : le SNC comporte de très nombreux types cellulaires de localisation et morphologie proches bien que de fonctions très différentes.
B : ces types cellulaires sont de plus très interconnectés.

Les techniques actuelles de description du SNC

La description de la diversité des types cellulaires du système nerveux central nécessite, expérimentalement, de purifier sélectivement ces types cellulaires ou leurs composants. Pour cela, la technique la plus simple consiste en une dissection, la plus précise possible du type cellulaire considéré. Les microdissecteurs laser permettent ainsi de séparer différentes parties de tissu et de les analyser biochimiquement séparément. Dans certains cas, cette approche a permis des résultats significatifs. Par exemple, les équipes d'Ann Kato et de Don Cleveland ont microdisséqué des corps cellulaires de motoneurons spinaux au sein de la corne ventrale de la moelle épinière [2-4]. En combinant microdissection et transcriptomique, ces équipes ont pu caractériser les gènes exprimés par ce type cellulaire à l'âge adulte, mais aussi, en parallèle, isoler certains gènes dont l'expression est modifiée au cours des maladies du motoneurone. Obtenir une telle information sur des moelles épinières entières aurait été impossible car les motoneurons ne représentent qu'une toute petite fraction des cellules de ce tissu.

Ce qui est simple pour les motoneurons, des neurones très grands et morphologiquement identifiables, l'est beaucoup moins pour d'autres que l'on ne peut pas distinguer des neurones voisins. On peut ainsi imaginer combiner la microdissection avec des techniques d'identification du type cellulaire par des marqueurs immunologiques. Dans d'autres cas, il est possible d'utiliser une particularité anatomique, comme leur zone de projection. Cette technique a été utilisée avec succès par l'équipe de Jeffrey Macklis et Paola Arlotta pour caractériser les neurones moteurs corticospinaux [5,6]. Cette population neuronale était très mal définie, malgré une grande importance dans le contrôle de la motricité et dans le développement des maladies du motoneurone. Cette équipe a tout d'abord marqué ces cellules par traçage rétrograde, grâce à un traceur fluorescent, puis isolé les cellules fluorescentes dans la région d'intérêt par tri cellulaire. Le transcriptome des cellules isolées a ensuite été déterminé. Ces travaux ont abouti à la découverte de plusieurs marqueurs de ces neurones moteurs corticospinaux qui peuvent être maintenant étudiés directement par immunohistochimie.

Ces approches de microdissection ou de tri cellulaire ont plusieurs limites intrinsèques. Tout d'abord, la quantité de matériel obtenu est très faible et nécessite, le plus souvent de passer par des étapes d'amplification. Cela limite la sensibilité des techniques et il est donc probable que certains marqueurs moléculaires, peu exprimés, mais néanmoins significatifs du point de vue fonctionnel, soient en dessous du seuil de détection. Ces techniques

sont aussi peu spécifiques car il est difficile d'obtenir une résolution cellulaire par microdissection. Enfin, il ne peut être exclu que ces techniques soient soumises à des artefacts biologiques, comme le stress induit par la dissociation nécessaire au tri cellulaire, ou techniques, liés par exemple à l'extraction d'ARN de tissus précédemment fixés.

Le deuxième niveau de complexité de l'anatomie du SNC réside dans la description des circuits neuronaux. Ces études sont classiquement basées sur les techniques de coloration sélective et sur des protocoles de traçage utilisant un marqueur transporté ou diffusé à partir d'un site d'injection donné. Les techniques de coloration comme le marquage de Golgi ont permis les travaux initiaux de Ramon y Cajal mais ont plusieurs inconvénients. En particulier, quand de très nombreux axones sont marqués, il devient impossible de les tracer individuellement. De plus, cette technique ne permet que la reconstruction de réseaux locaux. L'utilisation de traceurs rétrogrades ou antérogrades a permis de nombreuses avancées dans la cartographie du cerveau, mais cette technique a, elle aussi, de nombreuses limites. En particulier, l'introduction du traceur est la plupart du temps chirurgicale, ce qui risque d'altérer le système étudié. De plus, l'ensemble d'un tractus est marqué de façon uniforme, ce qui permet de déterminer un réseau global, mais ne permet pas de tracer la connexion individuelle d'un neurone. Enfin, il existe des possibilités d'artefacts liés, par exemple à une fuite du traceur hors du site d'injection.

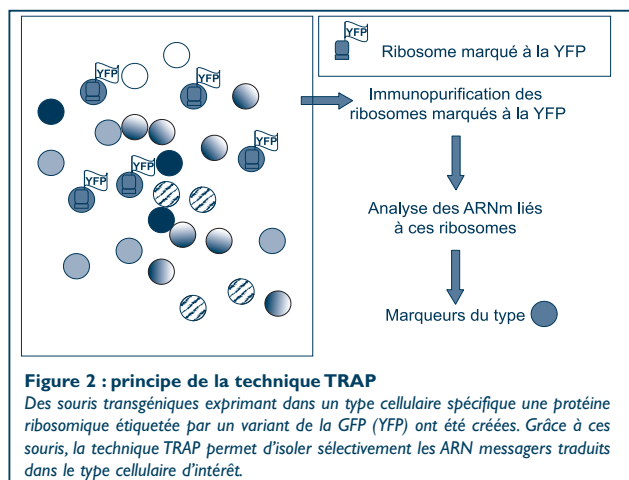
Au cours des dix dernières années, les techniques de traçage ont été améliorées grâce à la création de souris génétiquement modifiées exprimant des variants de la GFP (green fluorescent protein), une protéine initialement découverte dans une espèce de méduse. La découverte de la GFP et la mise au point de ces variants spectraux ont été récompensées par le prix Nobel de chimie en 2008. La GFP vaut surtout pour la multiplicité de ses applications en génie génétique. En effet, il s'agit d'une petite protéine qui peut être introduite par des techniques de biologie moléculaire classiques dans de très nombreux types cellulaires. Son expression dans une cellule eucaryote crée un marquage vital, observable à l'aide de microscopes à épifluorescence ou confocaux classiques. Au cours des dix dernières années, une dizaine de variants de la GFP ont été créés par mutagenèse dirigée et aléatoire, ce qui permet d'avoir accès à des protéines fluorescentes bleues, jaunes, rouges, oranges ou vertes. La diversité de variants spectraux existants permet d'envisager d'exprimer une protéine fluorescente verte dans un type cellulaire et une rouge dans un autre, et d'observer l'expression dans des cellules vivantes, ce qui facilite énormément d'études, en particulier dans le systè-

me nerveux central (SNC). Une première application de la GFP dans la caractérisation du SNC adulte a été fournie par Feng et collaborateurs en 2000[7]. Ces auteurs ont créé une série de lignées transgéniques exprimant des variants spectraux de la GFP dans différents sous types neuronaux. Ces lignées ont notamment révolutionné l'analyse de la jonction neuromusculaire, en permettant une coloration vitale des fibres nerveuses. Un peu plus récemment, Bareyre et collaborateurs [8] ont mis au point une lignée de souris transgéniques où l'expression de la GFP est limitée aux neurones corticospinaux. Une telle lignée transgénique permettra de faciliter l'étude de la régénération axonale suite à des lésions de la moelle épinière. Dans le même ordre d'idée, un développement passionnant concerne la mise au point de traceurs génétiques trans-synaptiques. Deux équipes ont mis au point en 1999 des souris transgéniques exprimant des marqueurs transsynaptiques, basées sur des lectines de plantes comme la "wheat germ haemagglutinin" [9-11]. En principe, de telles lignées permettraient de déterminer l'ensemble des neurones innervant un sous type de neurones. Il semble cependant que les résultats obtenus par l'utilisation de ces lignées soient peu fiables. Ainsi, le laboratoire de Linda Buck avait généré une lignée de souris transgéniques exprimant un marqueur transneuronal sous le contrôle du promoteur d'un récepteur olfactif. En théorie, cette lignée de souris devait permettre de déterminer les neurones corticaux recevant les informations olfactives d'un type donné de récepteur. Dans une première étude, le laboratoire de Linda Buck avait utilisé cette lignée transgénique pour déterminer la cartographie du cortex olfactif mais, malheureusement, l'ensemble de l'étude a été rétracté car les auteurs n'arrivent pas à reproduire leurs résultats initiaux. À l'heure actuelle, l'utilisation de marqueurs transneuronaux fluorescents, très élégante en théorie, reste donc limitée en pratique. En conclusion, la création de souris exprimant des variants de GFP dans les différents sous types de neurones a facilité, mais pas bouleversé, la description des circuits neuronaux.

La technique TRAP : une nouvelle façon d'appréhender la diversité des types cellulaires du SNC

La caractérisation des types cellulaires du SNC adultes repose actuellement sur des techniques de microdissection, de tri cellulaire et d'histologie. Comme exposé précédemment, ces techniques ont des limites et des inconvénients assez importants. Récemment, l'équipe de Nathaniel Heintz a mis au point une nouvelle technique appelée TRAP ("translating ribosome affinity purification") qui apporte une réponse élégante à ces problèmes

[12,13]. Le TRAP consiste en un étiquetage sélectif des ribosomes du type d'intérêt. Les auteurs ont d'abord rendu fluorescente l'une des protéines constituant le ribosome par addition d'un variant de la GFP à cette protéine. La protéine fluorescente, incorporée dans le ribosome, n'interfère pas avec l'efficacité de la traduction. Pour caractériser les gènes exprimés dans un type cellulaire donné, ces auteurs ont exprimé dans ce type cellulaire la protéine ribosomique fluorescente par transgénèse. Ils ont ensuite purifié les ribosomes de ce type cellulaire en immunoprécipitant la GFP à partir d'extraits tissulaires des souris transgéniques. Les ARN en cours de traduction dans les cellules d'intérêt sont co-purifiés et analysés par des techniques de biologie moléculaire classique, notamment transcriptomique (figure 2). Les auteurs ont pu démontrer que cette technique, qui évite les étapes de microdissection, était beaucoup plus sensible que les techniques classiques et permettait de découvrir des mécanismes importants physiologiquement. Par exemple, en comparant les résultats obtenus entre une lignée exprimant la construction TRAP dans les neurones D1 du striatum avec une autre lignée exprimant la même construction dans les neurones D2, l'équipe de Heintz a montré que les neurones D2 du striatum, mais pas les D1, expriment Grp6, le récepteur à la sphingosine 1 phosphate (SIP), et étaient sensibles à l'addition de SIP. De même, en utilisant les mêmes lignées TRAP, cette équipe a montré que la cocaïne altérait la signalisation GABAergique dans les neurones D1 du striatum. La technique TRAP permet donc d'identifier des mécanismes nouveaux, grâce à sa grande sensibilité et permettra de mieux caractériser les différents types cellulaires du SNC. En effet, ce principe est potentiellement utilisable pour tous les types cellulaires, et l'équipe de Heintz a d'ailleurs déjà développé une vingtaine de lignées transgéniques exprimant la protéine ribosomale marquée dans de très



nombreux types de neurones et cellules gliales. À partir de ces lignées transgéniques, les auteurs ont réalisé une analyse comparée de 24 types cellulaires du SNC qui a permis de découvrir de nouveaux marqueurs de nombreux types cellulaires et a révélé une extrême diversité des profils d'expression des sous types neuronaux [12,13]. Cette technique, ou d'autres, similaires, permettront de caractériser de façon extensive la diversité des types cellulaires du système nerveux central.

Les souris Brainbow : une nouvelle façon de décrire la connectique du SNC

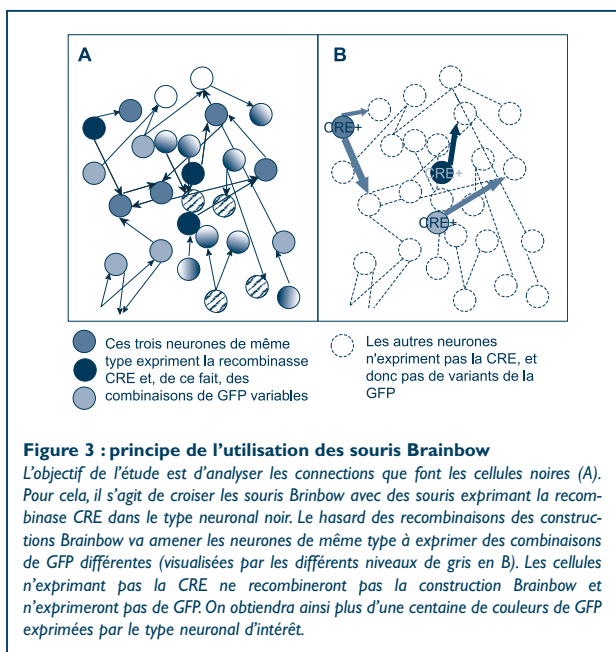
En dépit de leurs très nombreux intérêts, les lignées de souris surexprimant la GFP ou ses variants de façon restreinte ne permettent pas d'obtenir plus d'informations que les techniques de traçage classique. Le marquage relativement uniforme obtenu ne permet ainsi pas de tracer un axone individuellement. Pour ce faire, il serait nécessaire de marquer génétiquement individuellement chaque axone. Comment arriver à un tel résultat ? Pour cela, il faut s'en remettre au hasard. C'est ce qu'a réalisé le laboratoire de Jeff Lichtman. Ils ont mis au point une série de constructions génétiques appelées Brainbow (de brain et rainbow) basées sur une combinaison entre différents variants spectraux de la GFP et des événements de recombinaison par la recombinaison CRE [14]. Quand une cellule exprime une construction Brainbow et la recombinaison CRE, plusieurs événements de recombinaison, de probabilité identique, mais mutuellement exclusifs, peuvent se produire. Chacun d'entre eux permet la

production d'une GFP différente (bleue, verte ou rouge). Ainsi, le hasard détermine l'événement de recombinaison ayant lieu et la GFP produite, un peu comme un dé moléculaire. La conséquence est que deux neurones voisins, identiques, pourront exprimer une GFP différente. Les souris Brainbow, créées par Livet et collaborateurs [14] expriment ces constructions brainbow en copies multiples dans les neurones. Ces multiples copies, en présence de la recombinaison CRE, aboutissent à plusieurs événements de recombinaison indépendants (plusieurs lancers de dé), et donc à la production de combinaisons de GFP variables. Le résultat : Livet et collaborateurs ont pu dénombrer plus d'une centaine de couleurs différentes produites dans les souris brainbow. Quel est l'intérêt de ces souris ? Pour déterminer de façon fine les connexions d'un type de neurone donné, il suffira de croiser les souris brainbow avec une souris transgénique exprimant la CRE dans le type neuronal d'intérêt. Les souris double transgéniques verront le type neuronal d'intérêt exprimer différents variants de GFP, ce qui permettra des reconstructions quasi individuelles et à longue distance des connexions de ce type de neurone. Étant donné que de très nombreuses souches de souris exprimant la CRE de façon spécifique dans les différents types de neurones sont actuellement disponibles [15], on peut espérer obtenir des cartes de connexions beaucoup plus fines que celles disponibles actuellement. Lichtman estime ainsi que l'utilisation de Brainbow permet de gagner un ordre de grandeur en terme de temps nécessaire pour établir une cartographie précise des motoneurones innervant un muscle. On peut espérer que cet outil, à terme nous permettra de définir beaucoup plus finement l'architecture des connexions synaptiques de nombreux types de neurones.

Conclusion : des applications multiples, de la recherche fondamentale à la préclinique

Les outils transgéniques disponibles permettent de plus en plus d'augmenter la résolution de notre connaissance du système nerveux central. À ce titre, les souris Brainbow ou TRAP sont des outils précieux pour la recherche fondamentale. Leur création va cependant avoir des répercussions importantes dans des domaines des neurosciences plus proches de la clinique. La connaissance des altérations spécifiques de certains types cellulaires ou la caractérisation des dysfonctionnements de réseaux neuronaux typiques de certaines maladies neurologiques seront grandement améliorées par l'utilisation de ces outils. ■

ldupuis@neurochem.u-strasbg.fr



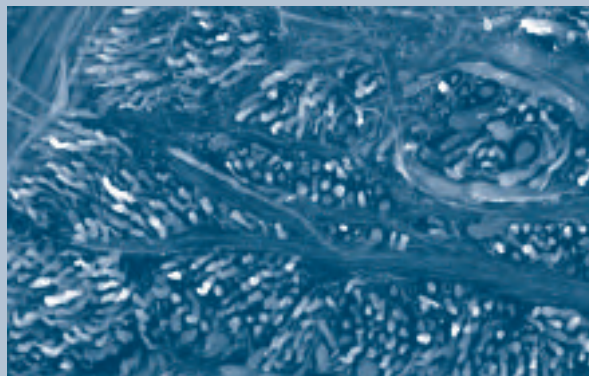
Un exemple d'utilisation des souris Brainbow : reconstruire les circuits neuronaux et visualiser les interactions cellulaires

Par Jean Livet

Les circuits neuronaux du cerveau sont formés par un agencement extraordinairement complexe de cellules nerveuses interconnectées. Une tendance émerge aujourd'hui en neurosciences: reconstruire le plus complètement possible, voire intégralement cette architecture cellulaire chez les mammifères. Le but de cette approche "connectomique" est triple : mieux comprendre le fonctionnement des circuits, les principes qui régissent leur organisation et comment ils peuvent être affectés par des pathologies. Cependant, accéder au connectome représente un challenge technologique considérable. Dans la continuité des études pionnières réalisées chez le ver *C. elegans* [16], une première stratégie pour relever ce défi utilise la microscopie électronique sériée [17], tandis qu'une autre approche se base sur la microscopie optique [18]. Dans les deux cas, un problème majeur est l'impossibilité de vérifier l'identité des neurones tracés, et donc l'exactitude de la reconstruction.

La mosaïque de couleurs générée par les transgènes Brainbow offre un moyen aisé de distinguer des neurones adjacents. De plus la couleur de chaque cellule peut être utilisée pour identifier cette dernière à différents niveaux d'un échantillon. Dans le laboratoire, nous développons une approche de reconstruction de circuits basée sur le marquage Brainbow. À partir d'images obtenues par microscopie confocale sur des coupes sériées de cerveaux de souris Brainbow, nous traçons le contour des objets cellulaires (neurites, corps cellulaires) présents dans l'échantillon. Plusieurs difficultés techniques doivent être résolues : acquisition des données sans perte d'information entre deux coupes, stockage des images, automatisation partielle ou complète du processus de segmentation, perte du signal de fluorescence en profondeur... Deux restrictions importantes font pour l'instant obstacle à une application générale de cette méthode. En premier lieu, la résolution est limitée, comme pour toute méthode optique, par la diffraction de la lumière. On peut contourner ce problème si l'on se contente de marquer une fraction des neurones (marquage épars). Pour nous en affranchir complètement, nous tentons en ce moment de reconstruire un circuit présentant des axones de diamètre largement supérieur à la limite de la diffraction : le circuit binaural du système auditif et ses synapses géantes appelées calices de Held. Dans un futur proche, le problème de la résolution pourrait être résolu grâce aux méthodes émergentes de nanoscopie qui se développent actuellement à un rythme rapide. La deuxième limite des souris Brainbow actuelles est que le promoteur *Thy1* utilisé pour exprimer les protéines fluorescentes ne marque pas également toutes les populations neuronales. Nous cherchons donc à développer des souris présentant une forte expression des transgènes Brainbow dans plusieurs types neuronaux jusqu'ici mal marqués, notamment les interneurons inhibiteurs ou les neurones de la circuiterie rétinienne. Au-delà de la seule reconstruction de circuits, il est clair que la stratégie Brainbow peut être employée pour marquer tout type cellulaire (neuronal ou non neuronal). Une application très simple de ce marquage se trouve dans l'étude de contacts entre cellules neuronales (synapses, situations de compétition entre axones pour une même cible post-synaptique) ou non-neuronales (zones de contacts entre cellules adjacentes, étude du "tiling" d'un tissu par un type cellulaire donné). Certaines lignées Brainbow présentant un marquage dans des cellules non-neuronales (glie de Bergmann ou de Müller) sont déjà disponibles pour ce type d'étude. Nous cherchons à en générer d'autres en utilisant des promoteurs spécifiques, en particulier, en collaboration avec l'équipe d'Alain Chédotal, pour marquer les oligodendrocytes responsables de la myélinisation des axones centraux.

Signalons aussi une dernière possibilité en principe offerte par l'approche Brainbow : accélérer l'analyse du lignage cellulaire en marquant simultanément plusieurs clones de cellules dans un même animal avec des couleurs différentes. Sous réserve de disposer d'un promoteur fort permettant une bonne expression dans les types cellulaires d'intérêt, la stratégie Brainbow apparaît donc utile pour observer les interactions cellulaires dans de nombreuses situations : traçage des circuits, visualisation des contacts intercellulaires, analyse clonale.



Axones du tronc cérébral. Coupe parasagittale d'une souris Brainbow. Les axones géants du circuit binaural, vus ici en coupe au microscope confocal, sont marqués avec une multitude de combinaisons de couleurs.

jean.livet@inserm.fr

Références

1. Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q, Anderson DJ (2008) Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 133: 510-522.
2. Perrin FE, Boisset G, Lathuilière A, Kato AC (2006) Cell death pathways differ in several mouse models with motoneuron disease: analysis of pure motoneuron populations at a presymptomatic age. *J Neurochem* 98: 1959-1972.
3. Perrin FE, Boisset G, Docquier M, Schaad O, Descombes P, et al. (2005) No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Hum Mol Genet* 14: 3309-3320.
4. Lobsiger CS, Boillee S, Cleveland DW (2007) Toxicity from different SOD1 mutants dysregulates the complement system and the neuronal regenerative response in ALS motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7319-7326.
5. Molyneaux BJ, Arlotta P, Hirata T, Hibi M, Macklis JD (2005) Fez1 is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 47: 817-831.
6. Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R, et al. (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45: 207-221.
7. Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, et al. (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28: 41-51.
8. Bareyre FM, Kerschensteiner M, Misgeld T, Sanes JR (2005) Transgenic labeling of the corticospinal tract for monitoring axonal responses to spinal cord injury. *Nat Med* 11: 1355-1360.
9. Horowitz LF, Montmayeur JP, Echelard Y, Buck LB (1999) A genetic approach to trace neural circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3194-3199.
10. Yoshihara Y, Mizuno T, Nakahira M, Kawasaki M, Watanabe Y, et al. (1999) A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. *Neuron* 22: 33-41.
11. Maskos U, Kissa K, St Clément C, Brulet P (2002) Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10120-10125.
12. Doyle JP, Dougherty JD, Heiman M, Schmidt EF, Stevens TR, et al. (2008) Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135: 749-762.
13. Heiman M, Schaefer A, Gong S, Peterson JD, Day M, et al. (2008) A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135: 738-748.
14. Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, et al. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450: 56-62.
15. Gong S, Doughty M, Harbaugh CR, Cummins A, Hatten ME, et al. (2007) Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J Neurosci* 27: 9817-9823.
16. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1976) The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275: 327-348.
17. Briggman KL, Denk W (2006) Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Curr Opin Neurobiol* 16: 562-570.
18. Lu J, Tapia JC, White OL, Lichtman JW (2009) The Interscutularis Muscle Connectome. *PLoS Biol* 7: e32.