

De la cartographie classique au traçage génétique : révolution dans l'étude des réseaux neuronaux et de leurs fonctions

MARIE BARBIER

Département des Neurosciences Fondamentales, Bugnon 9, Lausanne, Suisse

La neuroanatomie d'hier à aujourd'hui : du noyau entier au neurone spécifique

L'invention de la technique de Golgi en 1873, popularisée par Ramon y Cajal, a marqué le début des neurosciences modernes en permettant de dessiner les premières cartes détaillées de l'architecture neuronale, montrant que le système nerveux est composé d'unités cellulaires distinctes connectées entre elles et formant des réseaux. Comprendre l'organisation de ces réseaux est ainsi devenu un enjeu majeur pour élucider le fonctionnement cérébral. Les premières approches notamment par injection d'acides aminés radioactifs ont apporté des résultats significatifs dans les années 1960-1970, mais c'est pendant les décennies de 1970 à 1990 que des traceurs performants sont apparus. Ces traceurs, souvent sous la forme de lectines comme le *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA-L), de toxine comme la sous-unité β de la toxine cholérique, ou encore de petites molécules fluorées (Fluorogold) peuvent être facilement combinés pour analyser les projections de structures cérébrale (1-3). Leur association avec l'immunohistochimie permet une caractérisation morphofonctionnelle efficace des circuits. Ces méthodes restent actuellement essentielles pour leur robustesse, facilité d'emploi et compatibilité histologique. Cependant, depuis une vingtaine d'années, une nouvelle révolution est en marche grâce aux approches de traçage génétique. Celles-ci sont rendues possibles par l'ingénierie des modèles de rongeurs transgéniques qui permettent le ciblage de neurones spécifiques. Grâce à des outils comme les vecteurs viraux conditionnels ou les lignées de souris génétiquement modifiées, il est désormais possible de marquer et de suivre des populations neuronales définies par leur identité génétique. Cette précision du traçage génétique ouvre la voie à une analyse fine des circuits, en révélant comment

des sous-ensembles de neurones contribuent à des fonctions cérébrales particulières.

Le traçage génétique : révolution des outils viraux pour une neuroanatomie fonctionnelle

Alors que les traceurs classiques ont permis des avancées majeures en cartographiant les projections neuronales à l'échelle de noyaux ou de régions entières, les approches de traçage génétique basées sur des vecteurs viraux ont ouvert une nouvelle ère en neuroanatomie. Ces outils offrent une spécificité cellulaire et circuit-dépendante sans précédent. Cette précision repose sur l'utilisation de promoteurs spécifiques (séquences d'ADN activant l'expression de gènes dans des types cellulaires définis), ainsi que sur des systèmes enzymatiques comme Cre et Flp. Ces enzymes, appelées recombinaisons, agissent comme des 'ciseaux moléculaires' : elles permettent d'activer ou de désactiver des gènes de manière ciblée, uniquement dans les populations neuronales d'intérêt. Par exemple, la recombinaison Cre (issue d'un bactériophage) ou Flp (issue de levure) peut être exprimée sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un type de neurone, ce qui permet de marquer ou de manipuler uniquement ces cellules, tout en laissant les autres intactes. Associées à des cassettes génétiques conditionnelles (fragments d'ADN conçus pour répondre à la présence de Cre ou Flp), ces recombinaisons rendent possible une dissection fine des circuits neuronaux, neurone par neurone. Contrairement aux méthodes histologiques traditionnelles, qui ciblent des populations neuronales de manière globale, les vecteurs viraux permettent de disséquer des sous-types cellulaires définis par leur identité moléculaire, leur connectivité ou leur activité fonctionnelle. Un autre avantage majeur réside dans leur capacité à contrôler la

direction et l'étendue du transport axonal : antérograde, rétrograde, ou trans-synaptique, avec une résolution mono- ou multisynaptique (Figure 1). De plus, ces vecteurs peuvent être couplés à des effecteurs fonctionnels (optogénétiques, chimiogénétiques, sondes calciques ou outils d'édition génétique (CRISPR)) permettant ainsi d'étudier simultanément la structure des circuits et leur dynamique fonctionnelle. Cette intégration entre anatomie et fonction représente une avancée majeure pour l'étude des réseaux neuronaux *in vivo*, en particulier chez les modèles rongeurs, où ces techniques sont largement déployées.

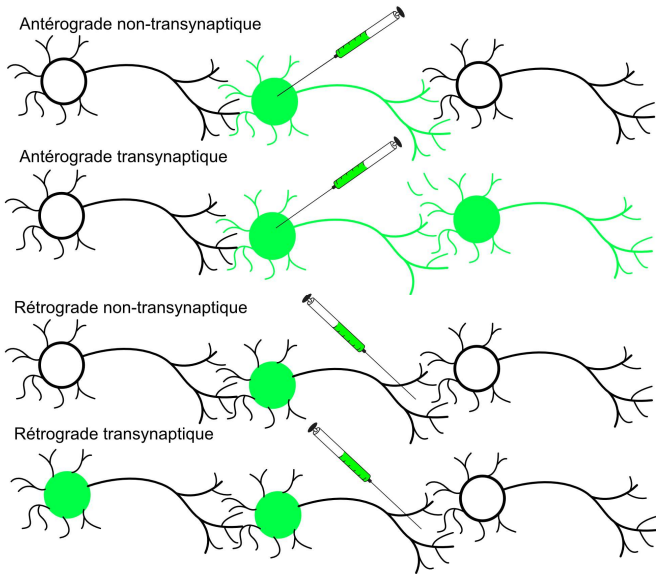


Figure 1. Modes de propagation antérograde ou rétrograde des outils viraux, selon qu'ils franchissent les synapses (transsynaptiques, mono- ou multi-synaptiques) ou non (non transsynaptiques).

Les vecteurs viraux utilisés en traçage génétique se distinguent par leur tropisme, leur directionnalité et leur compatibilité avec les outils de manipulation fonctionnelle (4). Leur choix dépend étroitement de la question biologique posée et des contraintes expérimentales. Les adénovirus associés (AAV) sont parmi les vecteurs les plus répandus, en raison de leur sécurité, de leur faible immunogénicité et de leur capacité à induire une expression génique stable et prolongée. Les différents sérotypes et variants présentent des profils de transport distincts : certains permettent une propagation trans-synaptique antérograde, tandis que d'autres sont optimisés pour un transport rétrograde après internalisation par les terminaisons axonales. Par exemple, le virus de la pseudorabie (PRV), notamment sa souche Bartha, est largement utilisé pour le traçage rétrograde multisynaptique. Des versions modifiées du PRV ont été développées pour réduire sa toxicité, amplifier l'intensité du signal fluorescent ou restreindre son infection à des sous-populations neuronales spécifiques, via des approches Cre-dépendantes. Le

virus rabique (RV) est un outil particulièrement efficace pour le traçage rétrograde monosynaptique (Figure 1). Pour ce faire, son gène codant pour la glycoprotéine, une protéine virale essentielle à sa propagation, est délété (on parle alors de virus 'delta-G'). Cette glycoprotéine est ensuite apportée séparément ('en trans') par un autre vecteur viral ou une lignée cellulaire génétiquement modifiée, ce qui permet de contrôler précisément quels neurones seront infectés.

Les lentivirus, quant à eux, ne se propagent pas naturellement d'un neurone à l'autre via les synapses. Cependant, leur enveloppe virale peut être modifiée, un processus appelé pseudotypage, par exemple en y intégrant la glycoprotéine RV-G (dérivée du virus de la rage). Cette modification leur confère un tropisme rétrograde accru et une spécificité neuronale renforcée. L'adénovirus canin de type 2 (CAV-2) se distingue par son transport rétrograde efficace, médié par le récepteur CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor), ainsi que par sa grande capacité de clonage et son expression génique durable. Enfin, les alphavirus comme le virus Sindbis (SINV) et le virus de la forêt de Semliki (SFV) sont particulièrement utiles pour des études nécessitant une expression génique rapide et intense. Cette propriété les rend idéaux pour des analyses morphologiques détaillées des neurones, par exemple pour visualiser finement leur structure ou leurs connexions en un temps limité.

L'un des atouts majeurs des vecteurs viraux réside dans leur potentiel de combinaison. Cependant, leur utilisation nécessite une adaptation rigoureuse aux objectifs de l'étude. Plusieurs critères doivent être pris en compte : la direction du transport souhaitée, le nombre de synapses à franchir, la cible cellulaire, la durée d'expression requise, et la compatibilité avec des mesures fonctionnelles, telles que l'imagerie calcique ou l'optogénétique. Ces outils ne sont pas exempts de limites. La toxicité varie selon les vecteurs, avec des risques accrus pour les virus trans-synaptiques. Par ailleurs, le tropisme des vecteurs viraux peut varier significativement selon l'espèce considérée. Par exemple, un vecteur viral optimisé pour cibler les neurones corticaux chez la souris peut s'avérer moins efficace ou spécifique chez le rat, le primate non humain, voire l'humain, en raison de différences dans l'expression des récepteurs cellulaires ou des mécanismes de défense immunitaire. De même, une région cérébrale donnée ou même l'âge de l'animal peuvent influencer l'efficacité du traçage. Ces variations imposent donc une validation systématique des outils dans chaque contexte expérimental, mais elles ouvrent aussi la voie à leur adaptation pour l'étude de cerveaux plus complexes, au-delà des modèles rongeurs classiques. Cette flexibilité est essentielle pour étendre l'application de ces méthodes à des espèces plus proches de l'homme, comme les

primates, où la cartographie des circuits neuronaux reste un défi majeur en neurosciences translationnelles. Enfin, les contraintes de biosécurité, notamment pour les virus comme le PRV, nécessitent des précautions spécifiques. Les perspectives futures incluent l'amélioration de la sécurité et de la spécificité des vecteurs, leur adaptation à l'étude de cerveaux plus complexes (comme ceux des primates), et leur intégration avec d'autres technologies émergentes, telles que les approches « omiques » (comme la transcriptomique, qui analyse l'ensemble des ARN d'une cellule, ou la protéomique, qui étudie ses protéines) ou l'imagerie haute résolution. Cette synergie permettrait de lier la connectivité anatomique des circuits à leur identité moléculaire, ouvrant la voie à une compréhension plus fine des bases cellulaires et fonctionnelles du cerveau. L'objectif est de développer des traceurs moins toxiques, plus sélectifs et compatibles avec une analyse multimodale, combinant structure, fonction et dynamique des circuits. Les avancées par ces approches ouvriront la voie à une compréhension toujours plus fine de la connectivité cérébrale, depuis les mécanismes moléculaires jusqu'à l'organisation des réseaux à grande échelle, en passant par leur dynamique fonctionnelle *in vivo*.

Le noyau parasousthalamique (PSTN) : un modèle illustrant l'évolution des approches de traçage, des méthodes classiques aux outils génétiques

Le noyau parasousthalamique (PSTN), défini par sa chémoarchitecture et ses connexions, illustre parfaitement l'importance d'une approche intégrée pour décrypter la complexité des circuits neuronaux. Identifié chez le rat en 2004 par Goto et Swanson (5), cette structure s'est rapidement imposée comme un carrefour neuroanatomique et fonctionnel, caractérisé par une signature neurochimique distincte : expression du peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP), de la calbindine, de la calrétinine, et une nature majoritairement glutamatergique. Son rôle central dans l'interface entre les systèmes autonomes et les structures limbiques, notamment via des projections bidirectionnelles avec le noyau central de l'amygdale et des afférences issues de l'insula, en fait un acteur clé dans la régulation de l'alimentation, des fonctions cardiovasculaires, et des réponses émotionnelles. Cependant, sa découverte tardive et sa petite taille ont rendu son étude particulièrement dépendante des progrès méthodologiques en traçage neuronal, illustrant comment les approches classiques et modernes se complètent pour en révéler la connectivité et la fonction.

Les premières investigations sur le PSTN ont reposé sur des techniques de traçage classique, comme l'injection

de PHA-L pour cartographier ses projections axonales. Ces méthodes ont permis de situer le PSTN au sein des réseaux des noyaux de la base en combinant traçage antérograde (pour visualiser ses efférences) et rétrograde (pour identifier ses afférences) (5–7). Par exemple, les travaux initiaux ont révélé ses connexions avec des régions impliquées dans la régulation autonome et motivationnelle, suggérant un rôle dans l'intégration des signaux intéroceptifs et émotionnels. Cependant, ces approches, bien qu'indispensables pour établir une cartographie globale, présentaient des limites majeures : elles ne permettaient pas de distinguer les sous-populations neuronales au sein du PSTN, ni de corrélérer précisément leur connectivité avec des fonctions comportementales spécifiques. Ainsi, bien que le PSTN ait été identifié comme une structure glutamatergique mais aussi tachykininergique ou encore calrétininergique, les traceurs classiques ne pouvaient isoler les contributions respectives de ces neurones dans les circuits qu'ils innervent.

L'avènement du traçage génétique a révolutionné notre compréhension du PSTN en permettant le ciblage des populations neuronales spécifiques. Par exemple, l'utilisation de souris transgéniques TAC1-Cre (exprimant la Cre recombinase sous le promoteur de la tachykinine 1) a révélé que les neurones Tac1+ du PSTN projettent de manière différentielle vers des cibles impliquées dans la néophobie et la prise alimentaire en condition de maladie (8) (Figure 2). Plus récemment, l'étude des neurones à calrétinine du PSTN a illustré comment les approches modernes permettent de décortiquer la diversité fonctionnelle au sein d'un même noyau. Ainsi l'activation optogénétique des projections des neurones à calrétinine du PSTN vers l'aire tegmentale ventrale (VTA) régule directement la vigilance liée aux comportements exploratoires (9). Via l'utilisation de sondes calciques (GCaMP) chez des souris mâles, il a aussi été montré que l'activité de ces neurones augmente lors des transitions du sommeil profond vers l'éveil ou le sommeil paradoxal ainsi qu'au cours des comportements exploratoires.

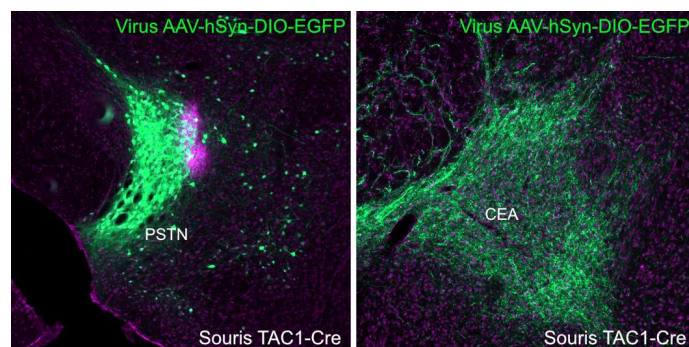


Figure 2. Illustration d'un site d'injection de virus Cre-dépendant AAV-hSyn-DIO-EGFP dans le PSTN de souris TAC1-Cre et de ses projections dans le noyau central de l'amygdale.

L'exemple du PSTN souligne donc la complémentarité des méthodes classiques et génétiques. Les premières ont permis d'identifier le noyau et ses connexions, tandis que les secondes ont révélé l'hétérogénéité fonctionnelle de ses sous-types neuronaux. Aujourd'hui, l'intégration de ces approches, couplée à des outils comme l'imagerie calcique, l'optogénétique, et le traçage trans-synaptique, offre une vision dynamique et spécifique des circuits du PSTN, depuis leur organisation anatomique jusqu'à leur rôle dans des fonctions aussi variées que l'autonomie viscérale, l'appétit ou les émotions. Ces avancées ouvrent la voie à une compréhension plus fine des dysfonctions des réseaux intéroceptifs, avec des implications potentielles pour les troubles anxieux, les désordres alimentaires, et les pathologies cardiovasculaires liées au stress.

Conclusion

Les techniques de traçage des voies nerveuses ont révolutionné notre compréhension de l'organisation du système nerveux, devenant des outils toujours plus précis et sophistiqués. Ces approches permettent non seulement de visualiser les réseaux neuronaux avec une précision sans précédent, mais aussi de les manipuler et de les étudier de manière dynamique. Si les méthodes classiques et génétiques sont souvent perçues comme distinctes, elles sont en réalité complémentaires : les premières offrent une cartographie globale et robuste des circuits, rapides et faciles à mettre en œuvre, tandis que les secondes autorisent une dissection fine et fonctionnelle des sous-populations neuronales. Leur synergie a déjà transformé notre connaissance du cerveau, notamment chez les rongeurs, modèles de choix

en neurosciences. Cependant, leur adaptation à d'autres espèces, comme les primates non humains, voire à terme l'humain, représente un enjeu majeur pour les années à venir. En surmontant les défis liés aux différences inter-espèces (tropisme viral, réponses immunitaires, complexité cérébrale), ces outils pourraient élargir leur portée bien au-delà des modèles murins, ouvrant la voie à des avancées en neurosciences translationnelles et à de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les maladies neurologiques et psychiatriques chez l'homme. Grâce à ces progrès, notre compréhension des circuits neuronaux, de leur développement et de leurs dysfonctionnements, ne cesse de s'affiner, posant les bases d'une médecine plus ciblée et personnalisée.

marie.barbier@unil.ch

Références

- (1) Kristensson K, Olsson Y. (1971) *Acta Neuropathol (Berl)*, 19(1):1-9.
- (2) Gerfen CR, Sawchenko PE. (1984). *Brain Res*, 290(2):219-38.
- (3) Brandt HM, Apkarian AV. (1992). *J Neurosci Methods*, 45(1-2):35-40.
- (4) Liu Q, et al. (2022). *Neurosci Bull*. 38(12):1508-18.
- (5) Goto M, Swanson LW. (2004). *J Comp Neurol.*, 469(4):581-607.
- (6) Barbier M, et al. (2017). *Brain Struct Funct.*, 222(7):2961-91.
- (7) Chometton S, et al. (2016). *Brain Struct Funct*, 221(4):2183-208.
- (8) Barbier M, et al. (2020). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(27):15967-76.
- (9) Guo H, et al. (2023). *Nat Commun*, 14(1):2346.