

Traçages trans-synaptiques : promesses et défis pour l'étude du connectome

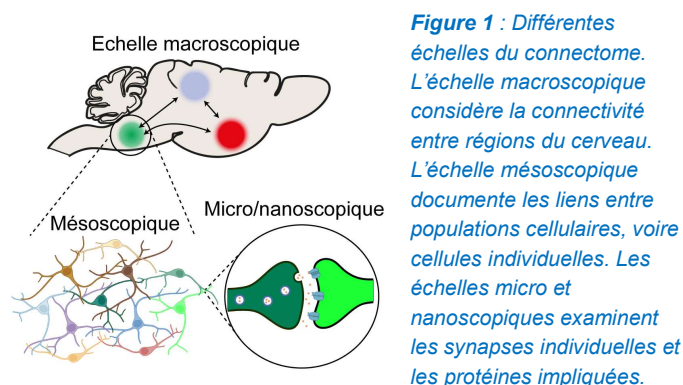
JULIEN BOUVIER & ALEXIS D'HUMIÈRES

Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, France

Introduction : cartographier la connectivité cérébrale

Le fonctionnement optimal du système nerveux repose autant sur les propriétés des neurones individuels que sur la spécificité de leurs connexions. En particulier, les informations doivent circuler et se coordonner entre régions cérébrales et types cellulaires pertinents, ce qui explique sans doute la faible capacité régénérative du système nerveux : l'absence de repousse est préférable à une régénération vers des cibles aberrantes. Ainsi, cartographier le connectome complet, c'est-à-dire établir le plan des connexions entre territoires cérébraux et entre neurones individuels, constitue un enjeu majeur. Cela permettrait de mieux comprendre le fonctionnement cérébral et de développer des thérapies ciblées, notamment face aux lésions du système nerveux. A l'échelle macroscopique (Figure 1), les circuits cérébraux sont déjà bien cartographiés. Par exemple, la rétine détecte un signal visuel et envoie l'information à des relais, comme le colliculus supérieur, capables d'interpréter ce type de message nerveux. Ces relais transmettent une commande à d'autres structures, comme la formation réticulée du tronc cérébral, elles-mêmes connectées à des neurones moteurs capables de déclencher un comportement, comme la fuite. Cependant, la plupart de ces régions ne se limitent ni à une unique fonction, ni à un

seul type cellulaire. La formation réticulée, par exemple, est un réseau diffus de neurones qui reçoit des informations de multiples zones et contrôle de nombreuses fonctions telles que la respiration, la motricité ou le cycle circadien. Elle abrite plusieurs types cellulaires souvent peu organisés spatialement. Pour autant, à cette échelle des populations cellulaires (ou mésoscopique), le connectome reste mal connu. Au-delà de la quête ambitieuse d'une cartographie exhaustive, l'étude des connectivités neuronales à l'échelle des types cellulaires est également une étape clé pour le chercheur en neurosciences. En effet, identifier les partenaires d'entrées et de sorties d'une population d'intérêt permet de formuler des hypothèses sur sa fonction. Y parvenir chez l'humain, avec ses 86 milliards de neurones possédant chacun des milliers de connexions, est encore impensable. En revanche, des connectomes complets à l'échelle mésoscopique ont été établis chez des organismes plus simples, comme le nématode *C. elegans* (1), dont les quelques 300 neurones ont facilité les traçages de connectivité (Figure 2). Les rongeurs, et principalement la souris, offrent un compromis idéal pour l'étude du connectome : leur cerveau est suffisamment complexe pour modéliser des circuits mammaliens, et est manipulable génétiquement par des outils de plus en plus sélectifs.



Les traçages de connectivité neuronale

L'étude de la connectivité neuronale repose principalement sur deux grandes approches : les traçages conventionnels, limités à un élément neuronal, et les traçages trans-neuronaux ou trans-synaptiques, capables de franchir une ou plusieurs synapses (Figure 3).

Les traçages conventionnels permettent de rendre visible l'architecture cellulaire complète d'une ou de plusieurs cellules d'intérêt, y compris les somas, axones, et boutons

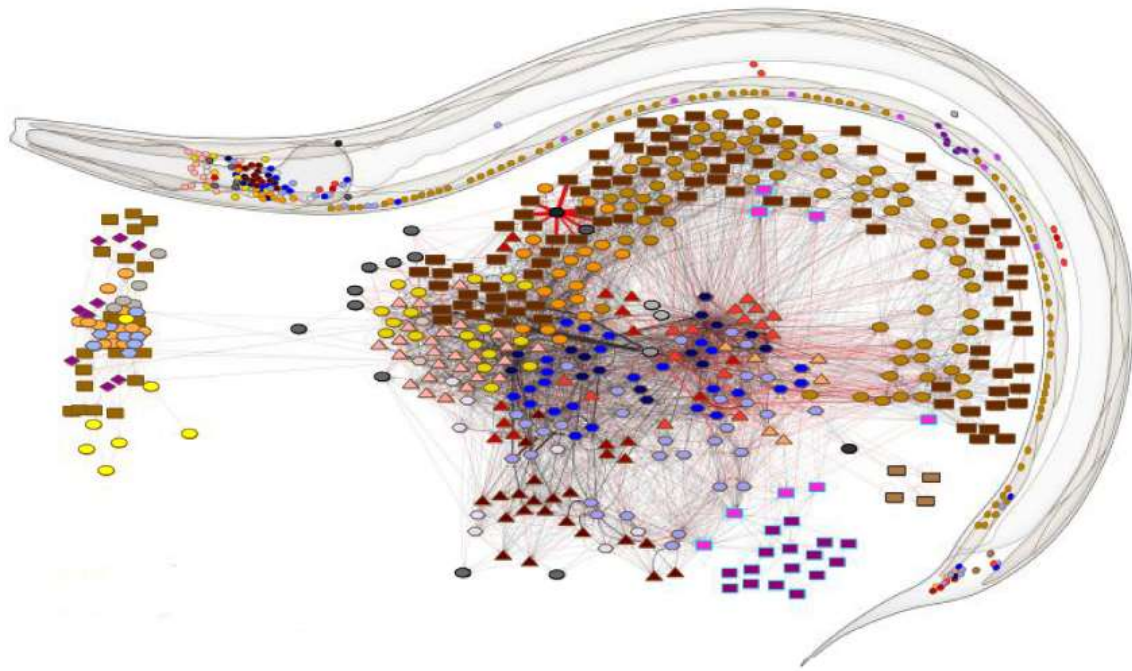


Figure 2 : Connectome neuronal complet de *C. Elegans*. Le schéma du haut représente la morphologie du ver et la localisation de ses neurones tandis que la carte interne représente toutes les connexions entre eux. Chaque type neuronal y est représenté par une forme unique. Les traits noirs ou transparents représentent les synapses chimiques et les traits rouges les jonctions communicantes. D'après Cook et al. (1)

synaptiques, et ainsi de cartographier leur distribution dans différentes régions. Historiquement, ils étaient réalisés à l'aide de molécules biologiques qui, après injection dans une zone du cerveau, sont capturées et transportées le long de l'axone de manière antérograde (dans le sens du message nerveux, comme la lectine végétale PHA-L ou les dextrans à haut poids moléculaire, Figure 3A) et/ou rétrograde (dans le sens inverse du message nerveux, tels que la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) ou le fluorogold, Figure 3B) (2). Ces molécules ont été progressivement supplantées par des vecteurs viraux recombinants, modifiés ou naturellement non pathogènes et présentant une capacité préférentielle à infecter les neurones (neurotropisme). Les plus utilisés sont les virus rabiques, adéno-associés (AAVs) et dérivés de l'herpès (HSV). Ces vecteurs sont plus efficaces, plus stables, et plus polyvalents, car ils peuvent coder pour diverses protéines fluorescentes capables de « remplir » l'intégralité de la cellule ou d'être adressées à différents compartiments cellulaires tels que les boutons synaptiques. Cela permet de discriminer les fibres de passages des contacts synaptiques dans les traçages antérogrades. Certains virus imposent même un transport exclusivement rétrograde. Enfin, leur expression peut être conditionnée génétiquement (système Cre/Lox et/ou Flp/Frt), permettant de sélectionner l'identité des cellules impliquées (2).

Ces traceurs permettent ainsi d'identifier les *régions* ciblées par une *région* d'intérêt (traçage antérograde), ou

bien les *cellules* ciblant une *région* d'intérêt (traçage rétrograde). Ils ne permettent néanmoins pas de répondre, du moins pas directement, à une question essentielle : *qui* sont les partenaires post- et pré-synaptiques ? Cela requiert des outils capables d'étendre l'adressage des marqueurs au-delà du neurone initial, donc dotés de transport trans-neuronal ou trans-synaptique. L'enjeu est ainsi de marquer directement la cellule connectée (pré- ou post-synaptique), et de la révéler par microscopie optique (par exemple en épifluorescence) sans recourir à la microscopie électronique des synapses. A notre connaissance, peu de molécules biologiques disposent d'une capacité de transport trans-synaptique fiable (voir Figure 3). Ainsi, nous focaliserons cet article sur les vecteurs viraux, qui offrent en outre l'avantage de pouvoir adresser des protéines capables de moduler l'activité des neurones transfectés.

Traçages trans-synaptiques rétrogrades

Dès la fin du XX^e siècle, les neuroscientifiques ont exploité les virus rabiques et pseudorabiques sauvages en raison i) de leur neurotropisme, ii) de leur transport rétrograde vers le soma, iii) de leur réplication massive et, surtout, iv) de la capacité des virions produits dans les cellules infectées à être relargués dans l'espace extracellulaire et à se transférer vers un élément neuronal voisin, principalement au niveau des synapses (3). Le virus rabique sauvage se propage ainsi progressivement et indéfiniment le long d'une chaîne polysynaptique

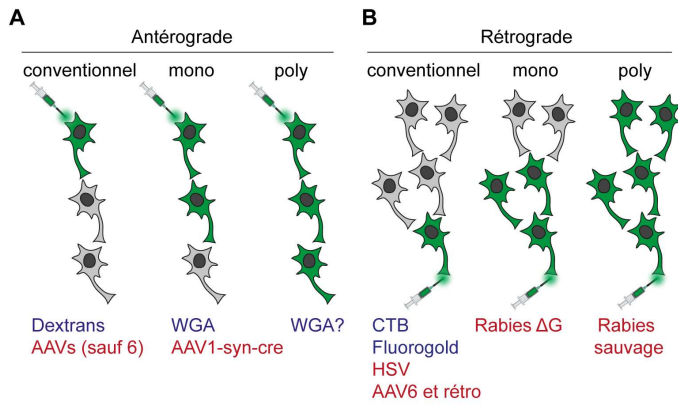


Figure 3 : Différents types et directions de tracages conventionnels ou trans-synaptiques. Des exemples de molécules biologiques (en violet) ou de vecteurs viraux (en rouge) sont donnés pour chaque approche. WGA : agglutinine du germe de blé.

(Figure 3). En réalisant des injections de virus rabiques suivies d'observations histologiques à des temps précis, il est possible d'assigner un ordre approximatif aux neurones infectés. Par exemple, après injection du virus de la rage dans les muscles de la langue sur des rats ou souris, on décèle entre 24 et 48 h post-injection les motoneurons du nerf hypoglosse. Entre 48 et 54 h, les interneurons prémoteurs, donc situés une synapse au-dessus des motoneurons, sont également marqués et détectés dans des noyaux de la formation réticulée. Enfin, au-delà de quatre jours, des neurones du cortex moteur et des régions sous-corticales sont révélées. Ainsi, cette approche a mis en évidence l'organisation hiérarchique du contrôle des muscles de la langue (3) : les motoneurons hypoglosses sont régulés par des interneurons prémoteurs du tronc cérébral, eux-mêmes contrôlés par des neurones corticaux. Néanmoins, cette propagation non-contrôlée rend l'attribution de l'ordre synaptique approximative et s'accompagne d'une forte toxicité. Pour contourner ces limites, des versions modifiées du virus rabique ont été développées au début

des années 2000. Une protéine essentielle à l'internalisation et au transfert trans-neuronal du virus est la glycoprotéine G de l'enveloppe virale. Une première modification consiste à supprimer le gène codant G du génome viral, puis à l'incorporer à la surface des particules virales (4). Ces virus rabiques ΔG , codant également une protéine fluorescente (par exemple la GFP) pour être détectés *a posteriori*, peuvent ainsi infecter les neurones grâce à la présence de G à leur surface, mais ne peuvent pas se propager entre cellules car les virions produits dans la cellule infectée ne possèdent pas G. Cette déficience peut être complétée de manière exogène, pour autoriser une propagation strictement monosynaptique, en délivrant G aux neurones primo-infectés (Figure 4A). Ces neurones primo-infectés produisent alors des virions porteurs de G à leur surface, capables de bourgeonner et de se transférer aux neurones pré-synaptiques. Dans ces derniers en revanche, l'absence de G empêche tout nouveau transfert, révélant uniquement les neurones situés une, et une seule synapse, au-dessus des neurones d'intérêt primo-infectés. Une sélectivité additionnelle peut être obtenue par la production de virus rabiques ΔG et pseudotypés, c'est-à-dire portant une autre glycoprotéine d'enveloppe, typiquement EnvA, qui reconnaît uniquement son récepteur TVA. Cela restreint la primo-infection à des neurones d'intérêt exprimant TVA (via le système Cre/Lox par exemple, Figure 4B). La combinaison de ces deux stratégies permet de cibler sélectivement des types cellulaires définis moléculairement tout en analysant uniquement leurs afférences monosynaptiques.

Un exemple d'application concerne la formation réticulée où très peu de populations neuronales ont été caractérisées. Une population de neurones appelée V2a, définie par l'expression du facteur de transcription Chx10, était connue pour être impliquée dans la locomotion, sans que l'on sache précisément dans quel contexte. Grâce à

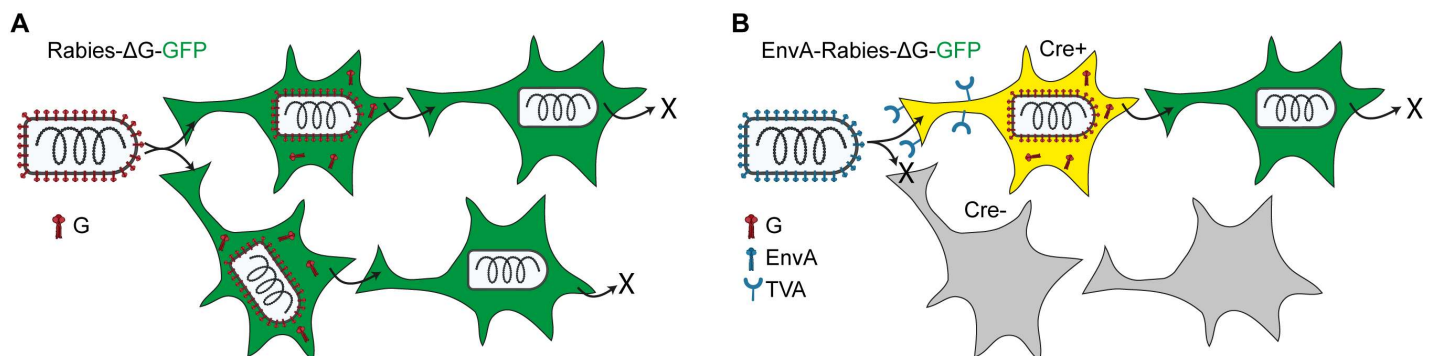


Figure 4 : Mécanismes d'infection et transfert trans-synaptique du virus rabique modifié. (A) Le virus rabique ΔG , grâce à la glycoprotéine qu'il porte à sa surface, peut infecter les neurones du site d'injection. Un apport de G à ces mêmes neurones (ex : injection préalable d'un AAV-G, non trans-synaptique), autorise le transfert aux neurones pré-synaptiques. Par contre, en l'absence de G dans ces derniers, tout nouveau transfert est impossible. (B) le virus rabique ΔG pseudotypé avec EnvA ne peut infecter que les neurones exprimant le récepteur TVA. Le transfert trans-synaptique n'est donc initié que depuis les neurones qui expriment à la fois TVA et G. Cette condition peut être sous contrôle du système Cre/Lox.

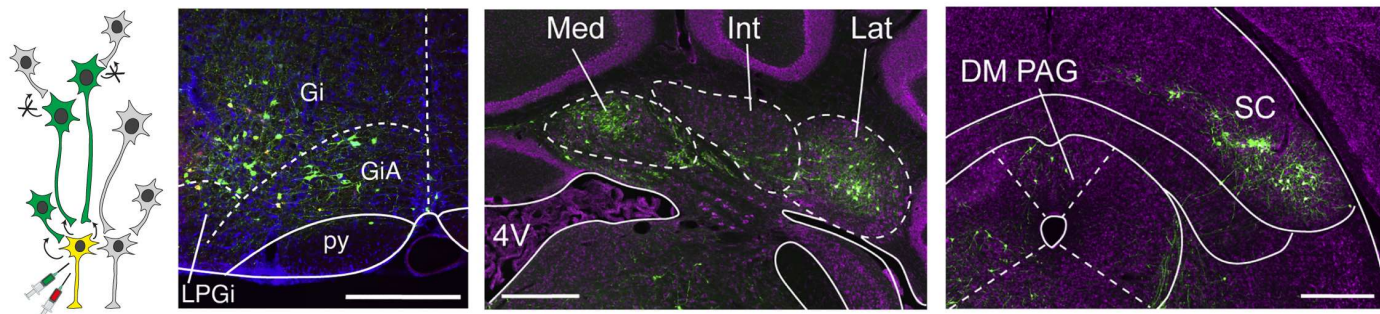


Figure 5 : Exemple d'application d'un traçage trans-synaptique rétrograde chez la souris. Les neurones V2a, exprimant *Chx10* et majoritairement localisés dans le noyau Gigantocellulaire (Gi) et le noyau paragigantocellulaire latéral (LPGi) du tronc cérébral, furent infectés par un AAV codant G, TVA et mCherry, puis par un Rabies-ΔG-EnvA-GFP, et apparaissent en jaune (image de gauche). Trois semaines plus tard, leurs partenaires neuronaux pré-synaptiques, exprimant uniquement la GFP, sont détectés dans les noyaux cérébelleux profonds comprenant le noyau fastigial (Med), interposé (Int) et dentelé (Lat, image du milieu) mais aussi au niveau du colliculus supérieur (SC, à droite) et de la substance grise périaqueducal (PAG, à droite). Adapté de Usseglio et al. (5).

ce type de traçage, nous avons établi le connectome pré-synaptique des neurones V2a, révélant que le colliculus supérieur, structure clé de l'orientation, constitue une source majeure d'entrée (Figure 5). Ces résultats ont contribué à démontrer que les neurones V2a jouent un rôle essentiel dans le contrôle des changements de trajectoire locomotrice (5).

Traçages trans-synaptiques antérogrades

Comparativement, les outils trans-synaptiques antérogrades sont encore à leurs débuts. Néanmoins, l'utilisation de l'AAV de sérotype 1 semble progressivement se généraliser. Le sérotype désigne la composition protéique de la capsid entourant le génome viral qui détermine son tropisme et son mode de transport. Récemment, il a été démontré que l'AAV1, en outre d'un transport antérograde, a aussi la capacité de transférer une fraction de virions depuis la cellule primo-infectée vers la cellule post-synaptique (6). En réalité, cette propriété est probablement partagée par d'autres sérotypes d'AAVs mais serait exacerbée pour l'AAV1, en particulier lorsqu'il est injecté à un titre élevé ($>10^{13}$ copies génomiques par mL). En pratique, l'efficacité du transfert reste souvent trop faible pour permettre la détection des cellules post-synaptiques par la seule expression d'un fluorophore. C'est d'ailleurs certainement cette faible efficacité qui confère à l'AAV1 un statut de traceur a priori uniquement monosynaptique, et non polysynaptique. Une stratégie courante consiste donc à injecter, dans une région cérébrale donnée, un AAV1 codant la recombinaise Cre (typiquement AAV1-hSyn-Cre) chez une lignée exprimant un fluorophore sous le contrôle de Cre. Ainsi, même un transfert limité de recombinaise suffit à déclencher l'expression et l'amplification du fluorophore dans les neurones post-synaptiques.

Cet outil a déjà permis des avancées importantes. Par exemple, l'injection de l'AAV1-hSyn-cre dans le noyau

parvocellulaire du tronc cérébral de souris a révélé des neurones post-synaptiques au sein d'un relais thalamique, le noyau ventro-postéromédial. Par contre, une injection dans le noyau prétectal antérieur a mis en évidence des cibles dans un relais thalamique distinct, le noyau postérieur (7). Ces deux noyaux ont des fonctions très différentes, respectivement dans la transmission de l'information sensorielle et dans l'intégration de signaux multimodaux, notamment moteurs. Ainsi, le traçage trans-synaptique antérograde ne décrit pas seulement les connexions ; il permet aussi de relier la connectivité d'une structure à sa fonction, et donc de mieux comprendre le rôle de régions cérébrales encore mal définies.

Néanmoins, cet outil ne permet pas d'initier le transfert trans-synaptique depuis une population neuronale spécifique : tous les neurones du site d'injection peuvent être source de transfert. De même, tous les neurones post-synaptiques sont marqués, quelle que soit leur nature. Il est possible de raffiner ce point en utilisant un AAV1 codant une Cre dont l'expression dépend de la recombinaise Flp. Ainsi, seuls les neurones post-synaptiques exprimant Flp (apportée par exemple par un autre AAV ou une lignée transgénique) sont révélés.

Limites et perspectives

Malgré ces avancées, plusieurs défis restent à relever. Tout d'abord, la quantification et la cartographie des cellules marquées reste complexe, surtout à l'échelle du cerveau entier. Plusieurs méthodes semi-automatisées (comme l'application Cuisto (8), Figure 6), basées sur la reconnaissance d'images et, plus récemment, sur l'intelligence artificielle, se mettent en place pour une détection robuste et standardisée des cellules marquées sur coupes. Les techniques de transparençation et d'imagerie volumétrique (9) sont également très prometteuses pour une cartographie et une reconstruction géométrique du connectome (voir l'article

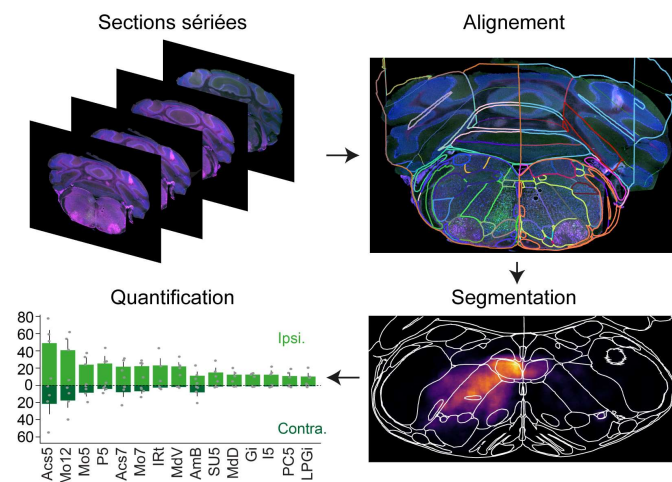


Figure 6 : Un exemple de quantification semi-automatique. Des coupes histologiques successives sont réalisées, et les cellules marquées révélées par immunohistochimie. Chaque coupe est alignée sur un atlas de référence pour annoter chaque région. Une segmentation détecte chaque élément marqué (ici des boutons synaptiques), aboutissant à une quantification précise, ici une densité de boutons synaptiques, dans chaque région cérébrale du côté ipsilatéral et contralatéral à l'injection. d'Humières et Bouvier, non-publié.

de C Chaumeton et coll dans ce numéro). Une autre limite importante concerne les caractéristiques intrinsèques des virus. Le virus rabique en particulier, même modifié, entraîne une cytopathologie progressive (3). Cela rend encore difficile son utilisation pour des expériences fonctionnelles ciblant les neurones pré-synaptiques. Pour le traçage viral antérograde, le nombre limité de cellules post-synaptiques marquées peut également restreindre l'efficacité des interventions fonctionnelles. De plus, il est vraisemblable que différents types cellulaires, ou différentes synapses, présentent une permisivit  variable au transfert trans-neuronal. Cela peut conduire à une sous-représentation de certaines populations ; une absence de marquage ne garantit souvent pas l'absence de connectivité. Des efforts constants visent ainsi à développer des vecteurs viraux plus performants. Les virus rabiques de troisième génération (2) se distinguent

par leur plus faible toxicité et par un meilleur tropisme, permettant ainsi de marquer *in vivo* un nombre plus important de neurones et ouvrant la voie à leur manipulation fonctionnelle. Si ces avancées constituent un progrès majeur pour la recherche fondamentale, peut-on les envisager dans un cadre thérapeutique ? A ce jour, aucune application clinique ne repose directement sur le traçage trans-synaptique, mais la porosité entre outils d'expérimentation animale et applications cliniques est bien réelle. Des approches de thérapie g n ique à base virale, inspirées de l'expérimentation animale, sont progressivement utilisées (10). L'optimisation de la diffusion et de la toxicité des outils trans-synaptiques leur conf rera peut-être, à terme, une place en thérapeutique. De nombreuses pathologies neurologiques, telles que l'épilepsie ou la sclérose latérale amyotrophique, affectent en effet l'ensemble d'un circuit. Ces techniques pourraient donc permettre de comprendre comment des altérations locales se propagent dans un réseau, et d'imaginer des interventions ciblées sur des circuits entiers plutôt que sur des populations neuronales isolées.

julien.bouvier@cns.fr
alexis.dhumieres@cns.fr

Références

- (1) Cook, S.J., et al. (2019) *Nature*, 571(7763): p. 63-71.
- (2) Saleeba, C., et al. (2019) *Front Neurosci*, 2019. 13: p. 897.
- (3) Ugolini, G., (1995) *J Comp Neurol*, 356(3): p. 457-80.
- (4) Wickersham, I.R., et al. (2007) *Neuron*, 2007. 53(5): p. 639-47.
- (5) Usseglio, G., et al. (2020) *Curr Biol*, 2020. 30(23): p. 4665-4681 e6.
- (6) Zingg, B., et al. (2017) *Neuron*, 2017. 93(1): p. 33-47.
- (7) Zingg, B., et al. (2022) *Curr Protoc*, 2022. 2(1): p. e339.
- (8) Le Gog, G., et al (2025) *Journal of Open Source Software*, 2025. 10(111), 7906,.
- (9) Ueda, H.R., et al. (2020) *Nat Rev Neurosci*, 2020. 21(2): p. 61-79.
- (10) Dunbar, C.E., et al. (2018) *Science*, 2018. 359(6372).