

> «l'allumage» ou l'excitation du neurone suivant. Une synapse peut aussi se situer près du corps cellulaire du neurone (où se trouve le noyau) ou, au contraire, à l'extrémité des prolongements neuronaux. Et certains neurones n'ont qu'une seule connexion avec le neurone suivant, tandis que d'autres projettent des centaines de connexions. Cette hétérogénéité implique que le virus met plus ou moins de temps pour voyager d'un neurone à l'autre, ce qui complique encore l'analyse de son trajet.

Pour contourner cette difficulté, les scientifiques ont reconfiguré le virus de la rage. Les biologistes moléculaires savent depuis longtemps manipuler l'ADN: modifier le génome se fait désormais en routine dans les laboratoires. Certes, le virus de la rage n'est pas fait d'ADN, mais d'ARN. Peu importe: l'avènement de la génétique inverse, une technique qui a offert la possibilité de modifier des molécules d'ARN en manipulant leurs copies d'ADN complémentaire, a permis de franchir cet obstacle. En 1994 déjà, Matthias Schnell et Karl-Klaus Conzelmann, au Centre fédéral de recherche pour les maladies virales des animaux, à Tübingen, en Allemagne, ont réussi à fabriquer des virus fonctionnels à partir d'ADN et à en modifier le génome, c'est-à-dire le brin d'ARN qui code leurs fonctions particulières.

Cette technique de manipulation du génome a permis de mieux comprendre comment les différents gènes du virus contribuent à ses aptitudes. Ainsi, un seul gène est responsable du déplacement entre neurones, et c'est justement celui qui code les glycoprotéines. Retirez ce gène et le virus est encore capable d'infecter une cellule hôte, mais il y reste prisonnier. Cette découverte a fait entrer le virus de la rage dans le champ des neurosciences.

RECONFIGURER LE VIRUS POUR SUIVRE SON TRAJET

Ainsi, en 2007, les neuroscientifiques Ian Wickersham et Edward Callaway, alors à l'institut Salk d'études biologiques, à La Jolla, en Californie, conjointement avec Karl-Klaus Conzelmann et Stefan Finke, virologue de l'institut Friedrich-Loeffler, en Allemagne, ont mis au point une technique de cartographie des réseaux de neurones innovante. Première étape: remplacer le gène des glycoprotéines par celui d'un marqueur fluorescent. Le virus ainsi génétiquement modifié ne synthétise plus de glycoprotéines, mais des copies d'ARN de la protéine fluorescente (et de ses autres protéines virales). De sorte que les cellules infectées brillent de la couleur choisie par les chercheurs.

Deuxième étape: fournir au virus «fluorescent» les glycoprotéines manquantes par une autre voie biologique, afin que les nouvelles particules synthétisées dans les cellules hôtes puissent se vêtir de leur indispensable



UN VIRUS MANIPULATEUR

Le virus de la rage est capable d'augmenter la quantité de salive produite, où il est présent en grande quantité, et modifie le comportement de son hôte: l'animal alors «enragé», en mordant une cible, permet la transmission du virus.

enveloppe et sauter vers un autre neurone, mais une seule fois – pas plus. Pour ce faire, les chercheurs ont utilisé un autre type de virus, très simple, appelé virus adénoassocié (AAV), car on le trouve souvent associé à des virus plus gros nommés adénovirus. Les AAV contiennent non pas de l'ARN, mais une petite molécule d'ADN. Les chercheurs ont inséré dans son ADN le gène codant les glycoprotéines du virus de la rage. Ainsi, dans la cellule hôte qui a reçu les deux virus, le virus de la rage fluorescent redevient capable de traverser une synapse grâce aux glycoprotéines synthétisées par l'AAV. En revanche, il est incapable d'intégrer le gène des glycoprotéines dans son propre génome, car il est constitué d'ADN et non d'ARN. De sorte qu'une fois la synapse franchie, le virus de la rage est à nouveau bloqué. Les images révèlent ainsi les populations de cellules infectées une seule fois, et donc connectées au neurone cible.

Toutefois, une autre difficulté persistait: l'administration du virus de la rage directement dans le cerveau des animaux de laboratoire infectait tous les neurones dont les prolongements étaient en contact avec le site d'injection. Sans la possibilité de contenir cette infection initiale à un nombre restreint de neurones, les



chercheurs étaient incapables de différencier les neurones contaminés par l'injection de ceux infectés après que le virus a sauté à travers une synapse. La solution est venue d'un autre champ de recherche en virologie: l'étude des virus spécifiques des oiseaux.

AVEC L'AIDE DES AGENTS INFECTIEUX DES OISEAUX

En effet, dans la nature, on a découvert des familles entières de virus qui n'infectent que certains groupes d'animaux. Par exemple, le virus de la leucose du sarcome aviaire (ASLV) provoque souvent des cancers chez les poulets, mais est en général incapable d'infecter les cellules de mammifères. Comme le virus de la rage, cet ASLV est recouvert d'une enveloppe de glycoprotéines. Toutefois, ces molécules ont différentes configurations, et chaque sous-type se lie à un récepteur spécifique. Par exemple, la glycoprotéine EnvA («Env» pour enveloppe et «A» pour caractériser le sous-type) se fixe uniquement au récepteur TVA (pour *avian tumor receptor virus A*). De sorte que si une cellule ne porte pas à sa surface de récepteur TVA, elle ne peut pas être infectée par un virus à glycoprotéines EnvA.

Cette sélectivité a permis aux chercheurs de restreindre l'infection initiale par le virus de la rage à un type de neurones. Comment? Grâce à une technique nommée pseudotypage: en injectant le gène de la glycoprotéine EnvA dans des cellules en culture infectées par le virus de la rage fluorescent (qui ne produisait donc plus ses glycoprotéines), Ian Wickersham, Edward Callaway et leurs collègues ont produit des virions de la rage dont l'enveloppe portait des glycoprotéines EnvA issues du virus aviaire (et toujours aucune de leurs glycoprotéines d'origine). Le virus de la rage était ainsi incapable de pénétrer des cellules de mammifères. Sauf si l'on dotait le neurone cible, logé dans le cerveau d'une souris, d'un récepteur TVA. C'est

ce qu'ont fait les chercheurs, s'assurant ainsi que le virus de la rage n'infecterait que ce neurone, et pas un autre.

Puis le neurone portant le récepteur TVA (en réalité, il s'agit d'un petit groupe de neurones identiques) a aussi reçu un virus AAV contenant le gène des glycoprotéines du virus de la rage. Une fois à l'intérieur de la cellule cible, le virus de la rage a perdu son déguisement de poulet – son enveloppe de EnvA –, récupéré des glycoprotéines normales apportées par l'AAV et sauté au neurone suivant. En contraignant les virus de la rage à infecter un seul groupe de neurones de départ bien défini, les chercheurs ont ainsi obtenu une image précise des connexions cérébrales.

Cette technique, simple et élégante, que ses inventeurs ont nommée ΔG en référence aux glycoprotéines altérées, a vite conquis la communauté des neuroscientifiques. Grâce à elle, les chercheurs ont observé quels neurones communiquent entre eux. Mais, comme toutes les innovations, la méthode a ses limites: parfois, le nombre de connexions «allumées» n'est pas significatif – en moyenne, dix pour un neurone de départ infecté.

En 2015, quand Thomas Reardon, Thomas Jessell, Attila Losonczy et moi-même travaillions à l'université Columbia, à New York, nous avons utilisé cette technique pour explorer les circuits neuronaux responsables des commandes motrices, qui contrôlent nos muscles. Or, devant le faible nombre de connexions observées dans la moelle épinière ou dans le cerveau, nous avons suspecté que nous avions là une image très incomplète des circuits moteurs. Mais pourquoi? Nous avons découvert un phénomène de neurotoxicité: une fois le virus dans la cellule, celle-ci commençait à perdre de sa vitalité et mourait dans les deux semaines. Le virus perturbait le fonctionnement des neurones, de sorte qu'il nous était compliqué d'interpréter correctement nos résultats.

Nous avons donc demandé de l'aide à Matthias Schnell et Christoph Wirblich, de l'université Thomas-Jefferson, à Philadelphie, spécialistes de la biologie du virus de la rage. Ils ont immédiatement compris l'origine du problème: nous utilisons la mauvaise souche de virus. Elle avait été développée pour la fabrication de vaccins antirabiques. Or ces derniers incorporent des souches spéciales de particules virales sélectionnées pour leur capacité à se reproduire anormalement vite: les nouveaux virions détruisent ainsi les cellules cibles et sont libérés, si bien qu'ils alertent le système immunitaire très tôt, quand il n'est pas encore trop tard. Et comme nous travaillions avec des souris, nos nouveaux collègues ont suggéré que nous devions utiliser une autre souche virale, délaissée depuis de nombreuses années, mais qui infectait les neurones de rongeurs.

Un seul gène est responsable du déplacement du virus entre les neurones

Le virus à l'origine de cette souche avait été isolé dans la nature puis «fixé» en laboratoire, c'est-à-dire introduit plusieurs fois dans le cerveau de souris ou dans des lignées de cellules murines, afin qu'il évolue et se spécialise pour le système nerveux de souris. Ainsi, avec cette nouvelle souche et la technique ΔG de traçage neuronal, nous avons visualisé un nombre beaucoup plus important de connexions que celles observées précédemment pour les circuits du contrôle moteur; les protéines virales n'ont pas alerté le système immunitaire des souris et leurs neurones sont restés suffisamment fonctionnels.

Nous sommes alors passés à l'étape suivante: nous avons modifié la technique ΔG en remplaçant, dans les virus de la rage, le gène de la protéine fluorescente par celui d'une protéine photosensible, la canal-rhodopsine, découverte initialement dans une variété d'algue verte. Quand de la lumière bleue active cette protéine, un canal situé en son centre s'ouvre et permet l'entrée d'ions chargés positivement dans le neurone cible, lequel émet alors un signal électrique (ce neurone continuait néanmoins à briller, car nous avons en fait utilisé une version de la canal-rhodopsine qui contenait aussi une protéine fluorescente). Résultat: nous avons observé l'excitation de circuits neuronaux pendant que les souris effectuaient certaines tâches, et nous avons pu «allumer» et «éteindre» ces circuits à notre convenance (en stimulant la canal-rhodopsine avec un laser bleu), jusqu'à un mois après l'infection. De quoi envisager, pour l'avenir, des tests permettant d'identifier les groupes de neurones responsables de certains comportements.

LA RAGE EXPLIQUE COMMENT FONCTIONNE NOTRE SYSTÈME VISUEL!

D'autres équipes de neuroscientifiques ont travaillé avec différentes versions du système ΔG et cartographié des réseaux de neurones pour comprendre comment ils contribuent aux perceptions et aux comportements des animaux. Prenons l'exemple du système visuel. Quand la lumière entre dans l'œil, les neurones logés derrière la rétine, appelés cellules ganglionnaires, transmettent des signaux au cerveau. Jusque-là, les scientifiques pensaient que l'information passait par différents relais cérébraux avant d'être traitée dans le cortex cérébral. L'équipe suisse de Botond Roska, de l'institut Friedrich-Miescher pour la recherche médicale, a utilisé le système ΔG de la rage pour traquer les signaux émis par les cellules ganglionnaires de la rétine vers le noyau géniculé latéral, une région du cerveau uniquement considérée comme un relais de l'information.

Quelle a été la surprise des chercheurs: ils ont en fait découvert trois types de neurones dans ce noyau, chacun traitant déjà l'information

La cartographie neuronale avec ce virus n'en est qu'à ses débuts

de façon distincte. Ainsi, moins d'un tiers des neurones sert effectivement de relais d'information jusqu'au cortex. Mais près d'un autre tiers reçoit des combinaisons de signaux provenant d'un seul œil, et les 40% restants, des signaux issus des deux yeux. Conclusion: si le noyau géniculé latéral intervient bien à un stade précoce du traitement de l'information visuelle, la plupart des neurones le constituant sont déjà capables d'intégrer des données de sources multiples. Des résultats qui ont précisé comment le cerveau traite l'information visuelle.

COMMENT TENONS-NOUS DEBOUT DANS LE MÉTRO?

Quant à nous, à l'université Columbia, nous nous sommes intéressés aux neurones du noyau vestibulaire latéral, la région du cerveau responsable du maintien de l'équilibre. Imaginez que vous êtes dans le métro, qui se met brutalement à freiner, sans raison apparente. Presque de façon instinctive, vous déplacez vos pieds pour compenser l'effet, tendez vos jambes et peut-être attrapez la barre centrale la plus proche. Comment le cerveau active-t-il si vite le bon groupe de muscles dans ce genre de situation?

Nous avons montré que le noyau vestibulaire latéral des souris contient deux groupes de neurones anatomiquement distincts, chacun ayant ses propres connexions avec le reste du système nerveux. Le premier groupe s'active instantanément quand le cerveau perçoit que le corps est instable; ces neurones permettent l'extension des membres pour augmenter la surface de support. Puis le second groupe renforce et stabilise les articulations des membres; cela permet au corps de retrouver sa position de départ. Nous avons en effet la possibilité d'activer ces neurones en envoyant simplement une lumière bleue dans le noyau vestibulaire latéral grâce à une fibre optique: quand la lumière s'allumait, les souris ajustaient la position de leurs membres, comme pour se retenir de tomber, alors même qu'elles n'étaient pas déséquilibrées.

L'équipe de Nao Uchida, à l'université Harvard, aux États-Unis, a enquêté sur un troisième point: la fonction des neurones qui libèrent de la dopamine, un neurotransmetteur,

EN CHIFFRES

59 000

décès par an dans le monde à cause du virus de la rage. On en compte bien moins qu'il y a un siècle, car les campagnes de vaccination et les mises en quarantaine d'animaux infectés limitent sa propagation.