

Université de Montréal

**Mécanismes moléculaires régulant la pathologie
dendritique dans la rétine adulte lésée *in vivo***

par
JUNIE BARBARA MORQUETTE

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph. D.)
En pathologie et biologie cellulaire, option système nerveux.

Décembre 2014

© Junie Barbara Morquette, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**« Mécanismes moléculaires régulant la pathologie
dendritique dans la rétine adulte lésée *in vivo* »**

Présentée par :
JUNIE BARBARA MORQUETTE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Bouchard, Ph. D.
Président-rapporteur

Adriana Di Polo, Ph. D.
Directeur de recherche

Christine Vande Velde, Ph.D.
Membre du jury

Edward Ruthazer, Ph.D.
Examineur externe

Louis-Éric Trudeau, Ph. D.
Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Les dendrites sont essentielles pour la réception et l'intégration des stimuli afférents dans les neurones. De plus en plus d'évidences d'une détérioration dendritique sont associées à une axonopathie dans les maladies neurodégénératives. Le glaucome dont la physiopathologie est caractérisée par une détérioration progressive et irréversible des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) est la première cause de cécité irréversible dans le monde. Son évolution est associée à un amincissement graduel des axones et à l'atrophie des somas des CGRs. La majorité des études de neuroprotection des neuropathies rétinienne visent la survie et la protection des somas et des axones. Des études récentes ont démontré des changements dendritiques associés à cette pathologie, toutefois les mécanismes moléculaires les régulant sont méconnus. **L'hypothèse principale de ma thèse stipule qu'une lésion axonale entraîne des altérations précoces des structures dendritiques. L'identification de voies de signalisation régulant ces changements permettrait d'élaborer des stratégies de neuroprotection et de rétablir la fonction de ces neurones.**

Dans la première étude, nous avons examiné l'effet précoce d'une lésion axonale aiguë sur la morphologie dendritique des CGRs *in vivo*. En utilisant des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente jaune (YFP) soumises à une axotomie, nous avons démontré un rétrécissement de l'arbre dendritique des CGRs et une diminution sélective de l'activité de mTOR avant le début de la mort des CGRs lésées. Aussi nous avons démontré une augmentation de l'expression de la protéine *Regulated in development and DNA damage response 2* (REDD2), un régulateur négatif en amont de la protéine mTOR en réponse à la lésion du nerf optique *in vivo*. Nous avons démontré que la réactivation de mTOR par l'inhibition de l'expression de REDD2 préserve les arbres dendritiques des CGRs adultes. En effet, l'injection de petits ARN

d'interférence contre la REDD2 (siREDD2) stimule l'activité de mTOR dans les CGRs lésées et augmente significativement la longueur et la surface dendritique totale. De plus, la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, inhibe complètement l'effet du siREDD2 sur la croissance et l'élaboration des dendrites. L'analyse électrophysiologique des CGRs démontre une augmentation de l'excitabilité des CGRs lésées qui est restaurée en présence du siREDD2.

Par ailleurs, des données récentes ont mis en évidence l'implication de la neuro-inflammation dans le glaucome, caractérisée par une augmentation de cytokines pro-inflammatoires dont principalement le facteur de nécrose tumorale (TNF α). Ainsi dans la **deuxième étude** nous avons examiné l'effet du TNF α exogène sur la morphologie de l'arbre dendritique des CGRs et commencé l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents à ces changements. Nos résultats démontrent que l'injection de TNF α recombinante dans le vitrée induit une rétraction dendritique précoce qui corrèle à une réduction de phospho-S6 suggérant l'implication de mTOR dans ces CGRs lésées. Ainsi, les études présentées dans cette thèse mettent en évidence un nouveau rôle de mTOR dans la stabilité et le maintien des dendrites de neurones rétiniennes adultes. Ces études ont aussi démontré l'effet précoce de stress direct ou indirect, c'est-à-dire l'axotomie et le TNF α respectivement sur la pathologie dendritique et sur leur effet sur la fonction neuronale.

Mots-clés : Dendrite, Cellule Ganglionnaire de la Rétine (CGR), Axotomie, Neurodégénérescence, Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), Regulated in development and DNA damage-2 (REDD2), Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), Neuroprotection.

SUMMARY

Dendrites are major determinants of how retinal neurons integrate and process incoming information. In neurodegenerative disorders, such as glaucoma, dendritic alterations are usually accompanied by axonopathy. However, the mechanisms that regulate these pathological changes are poorly understood. The physiopathology of glaucoma, characterized by a progressive and irreversible degeneration of retinal ganglion cells (RGCs), is the leading cause of irreversible blindness worldwide. This disease is associated with a gradual thinning of RGC axons and loss of RGC soma. Most studies on neuroprotection have focused on morphological and quantitative analysis of RGC bodies and axons. Yet, dendrites are critical for neurotransmission between retinal neurons and, as such, play a vital role in the functional properties of the retinal circuit.

The main hypotheses of this thesis is that: i) axonal injury induces early dendrite pathology, and ii) the identification of signaling pathways underlying dendritic changes is critical to design neuroprotective strategies and restore neuronal function.

In the **first study**, we investigated the molecular mechanisms involved in the early dendritic changes that occur in RGCs induced by an acute axonal injury (axotomy) *in vivo*. Using adult transgenic mice carrying the yellow fluorescent protein (YFP) gene subjected to optic nerve axotomy, we demonstrate a marked retraction of RGC dendritic arbors and selective downregulation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) activity prior to overt cell death. Axotomy triggered rapid up-regulation of the stress-induced protein *Regulated in development and DNA damage response 2* (REDD2), a potent inhibitor of mTOR. Treatment with siRNA against REDD2 stimulated mTOR activity in axotomized RGCs and promoted a significant increase in the length and complexity of injured RGCs compared to retinas treated with control siRNA. Administration of rapamycin completely blocked the effect of siREDD2 on dendritic

growth and branching thus confirming that this response occurred via mTOR stimulation. Whole-cell recordings demonstrated that REDD2 depletion leading to mTOR activation in RGCs restored their light response properties. Lastly, we show that REDD2-dependent mTOR activity extended RGC survival following axonal damage. Collectively, these results demonstrate that injury-induced stress leads to REDD2 upregulation, mTOR inhibition and dendrite pathology causing neuronal dysfunction and subsequent cell death.

Recent data demonstrate a neuroinflammatory component in glaucoma characterized by upregulation of pro-inflammatory cytokines, most notably tumor necrosis factor α (TNF α) (Tezel, 2013, Soto and Howell, 2014). Therefore, in the **second study of my thesis**, we investigated the effect of exogenous TNF α on RGC dendritic structure *in vivo* and initiated the analysis of molecular signals involved in this response. Our results show that injection of recombinant TNF α into the vitreous chamber of YFP mice induced early retraction of the dendritic arbors of RGCs concomitant with a reduction of mTOR activity in these neurons. Taken together, the results shown in this thesis reveal a novel role for mTOR in the stability and maintenance of dendrites in adult retinal neurons. These studies also demonstrate the effect of early direct and indirect stressors, axotomy or TNF α respectively, on the pathology of dendrites and their effect on neuronal function.

Keywords: Dendrites, Retinal Ganglion Cell, Axonal Injury, Neurodegeneration, Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), Regulated in development and DNA damage-2 (REDD2), Tumor necrosis factor – alpha (TNF α), Neuroprotection.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
SUMMARY	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE D'ABRÉVIATIONS	XV
REMERCIEMENTS	XX
AVANT-PROPOS	1
CHAPITRE 1	3
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
I.1. La rétine.....	4
I.1.1. L'architecture de la rétine.....	5
I.1.2. Organisation fonctionnelle de la rétine	9
I.2. Les dendrites des CGRs et leurs synapses.....	11
I.2.1. Structures et connectivités des dendrites des CGRs.....	11
I.2.2 Les structures intracellulaires des dendrites	15
I.2.3 Le développement des dendrites des CGRs	17
I.2.3.1. La neurogénèse de la rétine	17
I.2.3.2. Le développement dendritique des CGRs	17
I.2.3.3. La synaptogenèse des dendrites des CGRs	22
I.2.4. Facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la stabilité dendritique.....	23
I.3. La maladie du glaucome.....	26
I.3.1. La physiopathologie du glaucome.....	26
I.3.2 Les changements dendritiques dans le glaucome	30
I.3.3. Les changements dendritiques dans la rétine âgée.....	31

I.3.4. Les changements dendritiques dans les cibles post-synaptiques des CGRs	33
I.3.5. Mécanismes moléculaires régulant la pathologie dendritique et la perte synaptique ...	34
I.3.5.1. Rôle de la cascade du complément	35
I.3.5.2 La régulation dendritique dépendante du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF).....	37
I.4. La protéine kinase mammalian target of rapamycin.....	39
I.4.1 Structures et composantes des complexes de mTOR.....	40
I.4.2 Les voies de signalisation de mTOR dans le SNC.....	42
I.4.2.1 Signalisation en amont de mTOR : Voie classique.....	42
I.4.2.2 Signalisation en amont de mTOR : Voies alternatives	43
I.4.2.2.1. La protéine Regulated in Development and DNA damage response 2 (REDD2).....	45
I.4.2.3. Signalisation en aval de mTOR : les effecteurs	46
I.4.3. Rôle de mTOR dans la neurodégénérescence liée au glaucome.....	47
I.4.4. mTOR et la morphologie dendritique	47
I.5. Le TNF α , un médiateur de la neuro-inflammation	49
I.5.1. Signalisation du TNF α	49
I.5.2. Le TNF α dans les neuropathologies	50
I.5.3. Contribution du TNF α à la morphologie dendritique.....	51
I.6 LA neuroprotection des CGRs : où en sommes nous ?.....	53
I.6.1. Modèles de lésion de la rétine et du nerf optique (des CGRs).....	53
I.6.1.1. Modèles d'hypertension oculaire : le glaucome expérimental.....	53
I.6.1.2. Le modèle de l'excitotoxicité	55
I.6.1.3. Modèle de la lésion du nerf optique	57
I.1.1.1. La rétine : un outil de choix pour l'étude de maladies neuro-dégénératives.....	59
I.6.2. Les stratégies de neuroprotection des CGRs.....	60
I.7. Objectifs et hypothèse de la thèse	62

CHAPITRE 2	65
II. MÉTHODOLOGIE	65
II.1. Les animaux expérimentaux.....	66
II.2. Les procédures chirurgicales.....	66
II.2.1. La lésion du nerf optique.....	66
II.2.2. L'injection intra-vitréenne.....	69
II.2.3. Le marquage rétrograde des CGRs.....	70
II.3. Étude de survie neuronale.....	70
II.4. Marquage immunologique de la rétine.....	71
II.5. Analyse de l'architecture des dendrites et du soma.....	72
II.6. L'administration de la Rapamycine.....	73
II.7. Analyse des immuno-buvarages (Western Blots).....	73
II.8. Éléctrophysiologie.....	74
II.9. Analyse statistique.....	75
CHAPITRE 3	76
III. RÉSULTATS	76
III.1. Première étude.....	77
III.1.1. Résumé.....	77
III.1.2. Caractérisation du modèle expérimental.....	78
III.1.3. Études des changements dendritiques précoces des CGRs lésées.....	79
III.1.4. Perte sélective de l'activité de mTOR dans les CGRs.....	83
III.1.5. La REDD2 est surrégulée dans les CGRs lésées.....	87
III.1.6. Une inhibition sélective de REDD2 restaure l'activité de mTOR.....	90
III.1.7. L'activité de mTOR restaure l'arbre dendritique.....	94
III.1.8. L'activation de mTOR induite par la REDD2 restaure la fonction neuronale des CGRs.....	98
III.1.9. L'activation de mTOR influence la survie neuronale.....	102
III.1.10. Discussion.....	104

III.2. Deuxième étude.....	113
I.1.2. Résumé.....	113
III.2.1. Le TNF α exogène induit la mort des CGRs	114
III.2.2. Altérations dendritiques des CGRs en présence de TNF α exogène	115
III.2.3. L'injection du TNF α induit la réduction du pS6 dans les CGRs	118
III.2.4. Discussion	119
CHAPITRE 4.....	122
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	122
IV.1. L'altération dendritique précède la mort neuronale des CGRs après lésion Axonale..	123
IV.2. Activité de mTOR dépendante de REDD2	125
IV.3. La protéine mTOR importante pour la stabilité et le maintien des dendrites adultes..	127
IV.4. mTOR et la neuroprotection des CGRs lésées <i>in vivo</i>	130
IV.4.1. L'utilisation de pARNi : un outil thérapeutique.....	130
IV.4.2. La neuroprotection des dendrites et la survie des CGRS lésées via siREDD2	132
IV.4.3. Neuroprotection fonctionnelle des cellules ganglionnaires axotomisées.....	134
BIBLIOGRAPHIE	143
ANNEXES.....	170
ANNEXE A	171
REDD2-mediated inhibition of mTOR promotes dendrite retraction induced by axonal injury.....	171
Abstract	173
Introduction	174
Results	176
Discussion	184
Materials and Methods	189
References	197
ANNEXE B : FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	218

ANNEXE C: COLLABORATION.....	221
ASPP1/2 regulate p53-dependent death of retinal ganglion cells through PUMA and Fas/CD95 activation <i>in vivo</i>	221
Abstract	223
Introduction	224
Materials and Methods	226
Results	232
Discussion	239
References	244
 ANNEXE D : COLLABORATION.....	 264
Inhibition of P75 In glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells.....	264
Abstract	266
Introduction	267
Experimental procedures.....	269
Results	275
Discussion	282
References	286
Figure legends	292
 ANNEXE E : CONTRIBUTION AUX ARTICLES	 306

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Tableau 1 : Paramètres dendritiques des CGRs.....	111
Tableau 2 : Tableaux statistiques	112

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

FIGURE 1. Organisation laminaire de la rétine	6
FIGURE 2. Les cellules ganglionnaires de la rétine.....	12
FIGURE 3. Chronologie de développement des neurones rétiniens et leurs prolongements.....	18
FIGURE 4. Des CGRs exprimant différents marqueurs moléculaires présentent des patrons de croissances dendritiques distinctes.....	20
FIGURE 5. Voies de drainage de l’humeur aqueuse dans l’œil normal et glaucomateux.....	27
FIGURE 6. Les composantes des complexes de mTOR.....	41
FIGURE 7. Voie de signalisation de la protéine kinase mTOR.....	44

CHAPITRE 2

FIGURE 8 : Protocole expérimental d’étude de la morphologie dendritique et de la survie <i>in vivo</i>	67
--	----

CHAPITRE 3

Première étude

FIGURE 9. L’arbre dendritique des CGRs rétrécissement très tôt après une lésion axonale et avant la mort neuronale.....	81
FIGURE 10. L’activité de mTOR diminue dans les CGRs lésées.....	85
FIGURE 11. Surexpression de REDD2 dans les CGRs lésées.....	88
FIGURE 12. Le REDD2 knockdown de REDD2 restaure l’activité de mTOR.....	92
FIGURE 13. L’augmentation de l’activité de mTORC1 médié par REDD2 restaure l’arbre dendritique des CGRs lésées.....	96
FIGURE 14. L’activation de mTOR dépendante de REDD2 restaure la fonction des CGRs..	100
FIGURE 15. L’activation de mTOR prolonge la survie neuronale.....	103

Deuxième étude

FIGURE 16. TNF α exogène induit la mort neuronale des CGRs à une semaine.....114
FIGURE 17. Le TNF α induit un rétrécissement précoce des arbres dendritiques des CGRs.....117
FIGURE 18. L'expression de pS6 diminue en présence de TNF α dans les CGRs *in vivo*.....119

CHAPITRE 4

FIGURE 19.....130
FIGURE 20.....139
FIGURE 21141

LISTE D'ABRÉVIATIONS

AAV	Adeno-Associated Virus (ou VAA)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	Acide (S) -alpha-amino-3-hydroxy -5-methyl -4-isoxazopropionique
APB	Acide 2-amino -4-phosphonobutyric
ARC	Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein
ARN	Acide ribonucléique
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Facteur
CAMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CCG	Couche de cellules ganglionnaires
CGR	Cellule ganglionnaire de la rétine
CLIP-170	Cytoplasmic linker protein-170
CNE	Couche nucléaire externe
CNI	Couche nucléaire interne
CPE	Couche plexiforme externe
CPI	Couche plexiforme interne
CS	Collicule supérieur
DEPTOR	DEP domain containing mTOR interacting protein
FG	FluoroGold

GABA	Acide γ -aminobutyrique
GCL	Ganglion cell layer
HIF1- α	Hypoxia inductible factor-1 alpha
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
INL	Inner plexiform layer
IOP	Intra Ocular Pression
IPL	Inner plexiform layer
MAP	Microtubule-associated protein
mLST8	Mammalian lethal with sec13 protein 8
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1	Mammalian Target Of Rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian Target Of Rapamycin complex 2
NF-H	Neurofilament H
NGL	Noyau géniculé latéral
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NMDAR	Récepteur N-Méthyl-D-Aspartate
NP	Noyau prétectal
ONL	Outer plexiform layer
OPL	Outer plexiform layer

pARNi	Petit acide ribonucléique d'interférence
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIO	Pression Intra Oculaire
PRAS40	Proline rich Akt substrate 40 kDa
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RAPTOR	Regulatory associated protein of mTOR
REDD1	Regulated in development and DNA damage response 1
REDD2	Regulated in development and DNA damage response 2
RGC	Retinal Ganglion Cell
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RTK	Receptor tyrosine kinase
siCtl	Petit ARN d'interférence contrôle
siREDD2	Petit ARN d'interférence dirigé contre la REDD2
siRNA	Short interfering RNA
SL	Sublamina
SNC	Système Nerveux Central
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TNF α	Tumeur Necrosis Factor

TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNFR2	Tumor Necrosis Factor Receptor 2
TSC1	Tuberous sclerosis 1
TSC2	Tuberous sclerosis 2
TUJ1	β 3 tubuline
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
YFP	Yellow fluorescente protein

*«Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.
Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un
enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de
fées.»*

Marie Curie (1867-1934)

par Ève Curie, Ed. Da Capo Series in Science.

À ma famille pour votre soutien inconditionnel,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche le Dr Adriana Di Polo, pour m'avoir donné l'opportunité de faire un doctorat dans son laboratoire et m'avoir fait confiance pour un si beau projet.

Je tiens aussi à remercier Dr Nicole Leclerc et Dr Fernandes pour leur soutien au sein de mon comité de parrainage. Vos conseils, vos commentaires et aussi vos critiques m'ont permis de me questionner et d'aller au-delà de mes limites.

Je remercie particulièrement Michel Lauzon de son aide précieuse avec l'utilisation du microscope confocal tout au long de mon doctorat.

Je veux aussi remercier tous mes collègues passés et présents du laboratoire Di Polo ainsi que du département : Vincent, Philippe, Frédéric, Ali, Ariel, Mathieu, Annie, Dara, Jessica, Jorge, Marius (alias Momo), Nicolas et Yoko. Je me rappellerai toujours nos discussions scientifiques et des sujets « polémiques » de Momo...

Je remercie aussi tous les organismes subventionnaires qui m'ont apporté leur soutien financier tout au long de ce parcours. Sans ces bourses, je n'aurais probablement pas pu me concentrer sur ces études de longue haleine, et ce jusqu'à la fin : Le Département de pathologie et biologie cellulaire, la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP), le Fonds de Recherche en Santé du Québec (maintenant FRQS), les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et le Groupe de recherche en système nerveux central (GRSNC).

À ma famille, je vous dis mille mercis. J'aimerais tout d'abord remercier mes parents qui m'ont sans cesse encouragée à aller de l'avant. Merci pour votre appui moral, financier et spirituel. Je remercie ma sœur Valérie pour son soutien à chaque étape de ce doctorat, pour son oreille attentive et pour m'avoir appris les logiciels adobes Photoshop et Illustrator. Val, sans toi

je n'y serais pas arrivée. Merci aussi à Philippe, mon frère pour son aide, mais aussi pour avoir accepté de collaborer avec moi sur mon principal projet en faisant toute la partie de l'électrophysiologie. J'ai beaucoup appris de notre collaboration. Je veux remercier ma belle-mère Josette pour son support et aussi pour les nombreuses heures de garde durant mes absences au lab. Je remercie mon mari, Guy-Joseph pour sa patience, sa compréhension de mes absences et son soutien inconditionnel. Ce n'aura pas été en vain. Enfin, j'aimerais dédier cette thèse à mes petites Audrey A. et Raphaëlle A.

AVANT-PROPOS

Durant le 19^e siècle, la communauté scientifique croit que le système nerveux est organisé d'une façon réticulaire et en conséquence, que les fibres nerveuses forment un réseau diffus anatomiquement connecté (selon la théorie réticulaire). Vers 1860, Otto Deiters décrit le tissu nerveux comme étant composé de trois structures anatomiquement séparées : le corps cellulaire, l'*axe cylindrique* (ou axone) et les *processus protoplasmiques* (ou arbre dendritique). Il avance alors que les dendrites sont des structures fusionnées formant un réseau continu (Deiters and Guillery, 2013).

Ce n'est que vers 1888 que *la doctrine du neurone* voit le jour avec Ramon y Cajal remettant ainsi en question la *théorie réticulaire*. Selon Cajal, le système nerveux est formé de cellules indépendantes (les neurones) connectées l'une à l'autre par des petites zones de contacts (les synapses). Il est le premier à rapporter avec précision l'anatomie du neurone telle que nous la connaissons actuellement, grâce à l'utilisation de la technique de coloration de Golgi (Iturbe U et al., 2008).

Cajal établit également deux autres principes qu'il publie dans son manuel *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés* (Cajal, 1952). Le premier est le principe de la *polarité fonctionnelle* qui stipule que dans un neurone, l'information nerveuse circule dans une seule direction : elle est reçue au niveau des dendrites et du corps cellulaire puis acheminée aux terminaisons présynaptiques via l'axone (Cajal, 1952). Depuis, il est établi que les cellules nerveuses (les neurones) représentent l'unité fonctionnelle de base du système nerveux. Le second principe, dit de la *spécificité des connexions*, soutient que les connexions entre les

cellules nerveuses ne se font pas de manière aléatoire, mais plutôt avec des partenaires post-synaptiques définis.

Une des beautés du système nerveux réside dans la manière dont les cellules nerveuses ayant des propriétés de base similaire, peuvent engendrer différents systèmes lorsque connectées. Quand ces neurones et leurs connexions sont modifiés, suite à une expérience ou en cas de lésions, on parle alors de neuroplasticité (Raisman, 1969). Cette dernière se définit comme la capacité du cerveau de réorganiser par extensions ou rétrécissements les processus neuronaux et donc les réseaux de neurones et leurs connexions. Dans ce contexte, la neuroplasticité est la cause de bien des changements au niveau du fonctionnement de système nerveux, souvent à l'origine de maladies neurodégénératives.

Dans son ensemble, cette thèse espère contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de neurodégénérescences et de neuroprotections qui sont au cœur des préoccupations actuelles de la discipline des neurosciences.

CHAPITRE 1

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le présent chapitre met en perspective l'état des connaissances actuelles qui sera le fondement du raisonnement qui sous-tend mon travail et favorisera l'interprétation des résultats. Afin de faciliter la compréhension du système visuel utilisé tout au long de mon doctorat, nous tâcherons dans un premier temps de décrire les caractéristiques du système rétino-colliculaire. Par la suite, puisqu'il sera question de plasticité dendritique, il conviendra de mettre en lumière les aspects morphologiques (structure), biochimiques et physiologiques de base du compartiment dendritique durant le développement et dans la maladie du glaucome. Dans une troisième partie, nous regarderons en détail les voies de signalisation de la protéine kinase mTOR et du TNF α et leurs implications dans le système nerveux, respectivement. Ensuite, nous nous ferons un bilan des stratégies de neuroprotection connues et pour finir, nous émettrons l'hypothèse et les objectifs de cette thèse.

I.1. LA RÉTINE

La rétine est une extension du système nerveux central (SNC), située dans la partie postérieure du globe oculaire. C'est l'organe sensoriel spécialisé dans la conversion des stimuli lumineux en signaux électriques. Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs), cellules situées dans la couche la plus interne de l'organe, représentent la dernière étape dans l'intégration de l'information visuelle. Elles font le relais entre la rétine et le cerveau via le nerf optique (Kandel et al., 2000). Ces cellules ganglionnaires ont des projections situées dans le cerveau, dont les cibles varient selon les espèces. Chez les rongeurs, la majorité de leur axone projette sur le collicule supérieur (CS) et sur le noyau prétectal (NP), avec 30 % qui projettent de manière collatérale sur le noyau géniculé latéral (NGL) dans le thalamus (Dreher B et al., 1985, Isenmann et al., 2003). On parle alors de système rétinocolliculaire. Cependant chez l'humain, la grande majorité des axones se terminent dans le NGL, soit la partie dorsale du thalamus, le relais principal d'une voie qui mène au cortex visuel primaire à l'arrière du cerveau dans le lobe occipital. C'est la voie rétinogéniculocorticale (Usrey, 2002).

La rétine est la partie la plus accessible du SNC et en conséquence représente un outil expérimental unique dans la compréhension des mécanismes régulant le système nerveux. Une compréhension de son organisation structurelle et fonctionnelle ainsi que des étapes de son développement sont importantes pour comprendre l'ensemble de la rétine et appréhender les maladies neurodégénératives. C'est ce que nous explorerons dans la prochaine partie.

I.1.1. L'ARCHITECTURE DE LA RÉTINE

La rétine est un tissu organisé en multicouche, composée de six types majeurs de cellules neuronales et trois types de cellules gliales (Figure 1). Ces cellules sont réparties en trois couches de soma (corps cellulaire), séparées par deux couches synaptiques ou plexiformes (Livesey and Cepko, 2001). Ainsi, on distingue: les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) qui se situent dans les couches les plus externes de la rétine, comprenant la couche des segments externes des photorécepteurs et la couche nucléaire externe (CNE), où l'influx lumineux est converti en signaux chimiques; les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les cellules amacrines qui ont leur soma dans la couche nucléaire interne (CNI); et enfin, les CGRs et des cellules amacrines dites «déplacées» situées dans la couche la plus interne, soit la couche des CGRs (CCG). On notera que les cellules amacrines déplacées représentent jusqu'à 40 % des cellules de la CCG (Dräger and Olsen, 1981, Perry, 1981, Jeon et al., 1998).

Chaque type cellulaire est indispensable dans le traitement de l'information visuelle. En effet, alors que les photorécepteurs sont chargés de la conversion de l'information lumineuse en signal chimique, les cellules bipolaires quant à elles interviennent dans la transmission de l'information visuelle de la partie externe de la rétine vers sa partie interne et le signal y est transmis sous forme de potentiel gradué. En effet, les cellules bipolaires sont un passage obligé situé entre les photorécepteurs et les CGRs qu'elles contactent de manière post- et présynaptique respectivement. Les CGRs sont impliquées dans l'élaboration de l'information visuelle sortant de la rétine. Par ailleurs, les cellules horizontales font face à la couche plexiforme externe (CPE) et établissent des connexions avec les photorécepteurs de manière latérale alors que les cellules amacrines font face à la couche plexiforme interne (CPI) et sont en contact avec les CGRs.

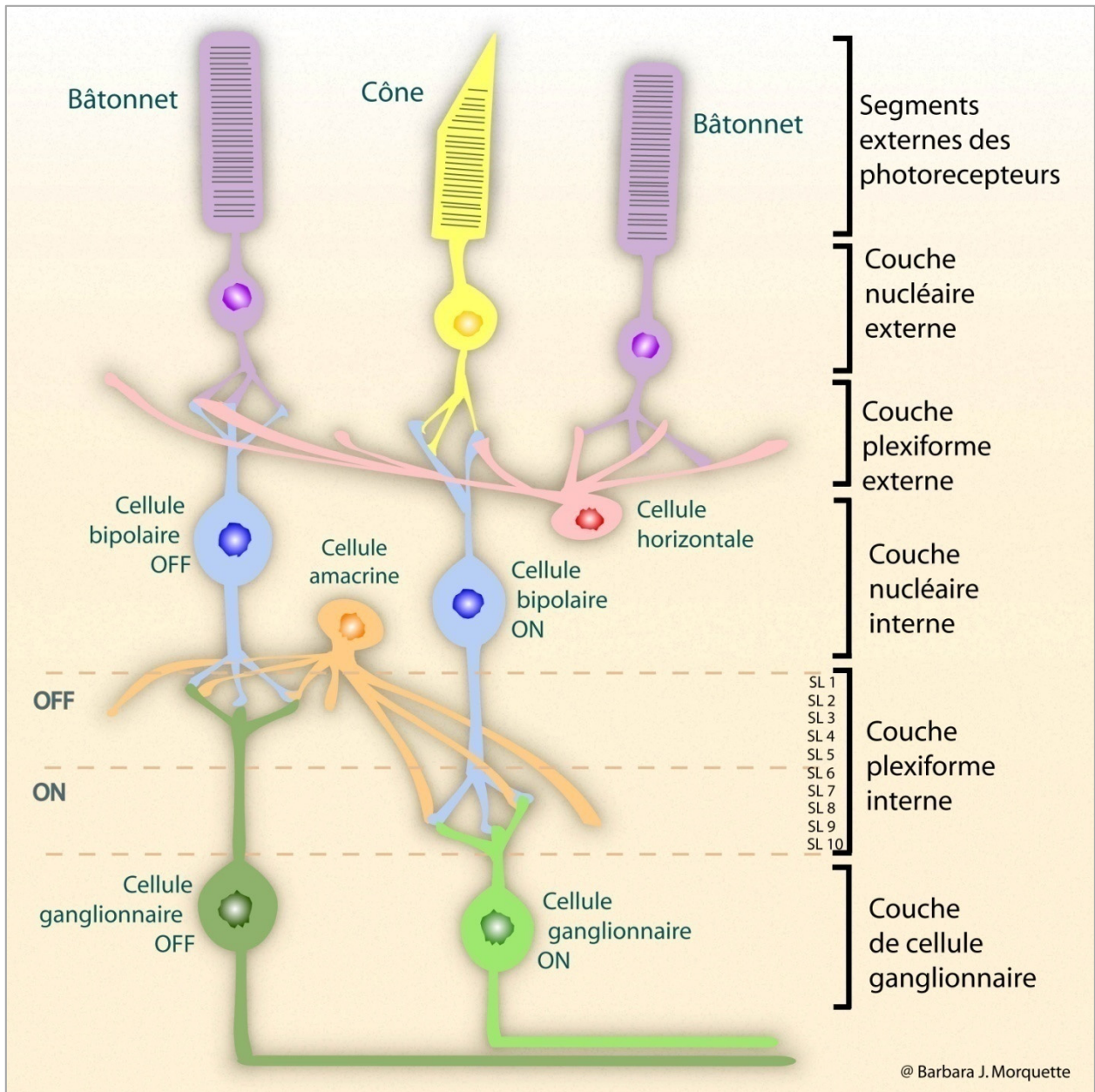


FIGURE 1. Organisation laminaire de la rétine. La rétine est le tissu sensoriel de l'œil composé d'une cytoarchitecture semblable à celle du cerveau. Elle est constituée de couches de corps cellulaires séparés par deux couches de fibres nerveuses, les dendrites et les axones. De l'extérieur vers l'intérieur, on y retrouve la couche contenant les segments externes des photorécepteurs, la couche nucléaire externe, la couche plexiforme externe, la couche nucléaire interne, la couche plexiforme interne et la couche de cellules ganglionnaires de la rétine. Cette dernière est composée des cellules amacrines dites déplacées et des cellules ganglionnaires de la rétine. Ces dernières cellules sont chargées de véhiculer l'information visuelle de la rétine vers les centres primaires de la vision dans le cerveau. (Image modifiée de Morquette et Di Polo, 2008, Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins©).

Les CPE et CPI sont composées des terminaisons fibreuses, axones et dendrites qui entrent en contact pour former les synapses. Ainsi, la CPE est formée par les terminaisons nerveuses des cellules bipolaires, des cellules horizontales et des photorécepteurs. La CPI, quant à elle est composée plus précisément des prolongements axonaux des cellules bipolaires qui forment des synapses en ruban (*ribbon synapses*) avec les dendrites des CGRs et des cellules amacrines. Il est à noter que dans cette couche, les prolongements ne sont pas présents de manière diffuse, mais sont plutôt organisés en strates. En effet, la CPI peut être divisée de manière fonctionnelle en deux sublamina qui peuvent à leur tour être divisées jusqu'en dix sous-couches en utilisant des marqueurs moléculaires (SL1 à SL10, figure 1) (Masland, 2001a, Wassle, 2004).

Par ailleurs, trois types de cellules gliales ont été identifiés dans la rétine : ce sont les astrocytes, les cellules de Müller et les cellules microgliales (Poitry-Yamate et al., 1995, Masland, 2001a). Les astrocytes présents dans la couche fibreuse dans la rétine entrent en contact avec les neurones, les vaisseaux sanguins et autres cellules gliales et ainsi sont impliqués dans la modulation synaptique, la régulation des ions extracellulaires et contribuent à la barrière hémato rétinienne entre autres (Jontes et al., 2000). Les cellules de Muller, quant à elles, sont les astrocytes spécialisés de la rétine qui s'étendent de manière radiale dans l'épaisseur de la rétine. Ces cellules représentent 90% des cellules gliales de la rétine. À l'instar des astrocytes, elles font contacts et entourent tous les corps cellulaires ainsi que les prolongements des neurones rétiniens. Elles sont responsables de l'homéostasie de la rétine (Poitry-Yamate et al., 1995, Newman and Reichenbach, 1996, Bringmann et al., 2009). Enfin, les cellules microgliales ont un rôle important dans la surveillance contre les infections et les blessures ainsi que l'initiation des processus d'inflammation et de réparation tissulaire (Newman and Reichenbach,

1996). Elles sont situées principalement au sein des fibres nerveuses issues de la couche des cellules ganglionnaires (Raisman, 1969).

Ainsi, à l'instar du cerveau, la rétine est un tissu avec une cytoarchitecture bien définie dont les cellules nerveuses et gliales sont importantes pour la fonction normale de la rétine.

I.1.2. ORGANISATION FONCTIONNELLE DE LA RÉTINE

L'organisation fonctionnelle de la rétine se manifeste structurellement de manière verticalement (avec des micros circuits établis en parallèle) ou horizontalement avec pour base les connections synaptiques situées dans les CPI et CPE. En effet, dans la rétine externe, les photorécepteurs cônes et bâtonnets entrent en contact avec les cellules bipolaires comme mentionnées ci-dessus. À ce niveau, la relâche du glutamate par les photorécepteurs se fait proportionnellement à leur degré de dépolarisation. Chez les vertébrés, une stimulation lumineuse hyperpolarise le potentiel de membrane des photorécepteurs ce qui entraîne une diminution de la relâche de glutamate de ces cellules. En outre, les cellules bipolaires peuvent devenir dépolarisées ou hyperpolarisées en fonction du type de canaux ioniques exprimés. Par exemple, la relâche de glutamate des photorécepteurs active les récepteurs glutamatergiques métabotropiques sensibles à l'acide 2-amino -4-phosphonobutyric (APB) sur les cellules bipolaires ON liées aux cônes et les cellules bipolaires connectées aux bâtonnets (Slaughter and Miller, 1981). Parallèlement, le glutamate active les récepteurs ioniques glutamatergiques des cellules bipolaires OFF liées aux cônes et dépolarise leur potentiel de membrane. Les cellules bipolaires produisent à leur tour des potentiels gradués, mais pas de potentiel d'action. Comme pour les photorécepteurs, la relâche du glutamate de ces cellules se fait proportionnellement à leur dépolarisation. Cette relâche entraîne la production de potentiel d'action chez les CGRs

lorsqu'elles atteignent leur seuil de dépolarisation. Les CGRs sont les seuls neurones de la rétine à émettre des potentiels d'action. Aussi, le principal neurotransmetteur excitateur de cette organisation verticale que nous venons de décrire est le glutamate.

Outre cette organisation verticale, la rétine détient aussi des connexions dites latérales (ou horizontales) qui permettent de moduler l'activité de ces neurones. Ces connexions latérales se font via les cellules horizontales dans la rétine externe et les cellules amacrines dans la rétine interne (Figure 1). En réponse à une dépolarisation provoquée par les photorécepteurs, les cellules horizontales relâchent un neurotransmetteur inhibiteur, le GABA, de manière graduée. Ce dernier a pour effet d'hyperpolariser les cellules bipolaires. De même, les cellules amacrines relâchent également des neurotransmetteurs inhibiteurs de manière graduelle qui a pour effet l'hyperpolarisation des CGRs qu'elles contactent et de ce fait diminuent leur capacité à produire des potentiels d'action (Masland, 2001a, g). L'organisation fonctionnelle de la rétine, bien que complexe, est bien orchestrée afin d'assurer le traitement de l'information visuelle avant son acheminement vers le cerveau par les CGRs, le dernier relais de cette information dans la rétine. Or, un développement adéquat des structures dendritiques de même que l'intégrité des champs dendritiques de neurones matures sont importants pour l'intégration appropriée de l'information visuelle. Ainsi dans la prochaine partie de cette thèse nous nous attarderons à la description des dendrites des CGRs, de leur développement à leurs altérations dans les cas pathologiques.

I.2. LES DENDRITES DES CGRS ET LEURS SYNAPSES

Les cellules ganglionnaires de la rétine sont des neurones fortement polarisés avec un corps cellulaire, un arbre dendritique complexe et un long axone responsable de la transmission de l'information visuelle de l'œil aux centres visuels dans le cerveau (Morquette and Di Polo, 2008) (Figure 2). Les dendrites se définissent comme le compartiment post-synaptique d'un neurone qui recueille les afférences et véhicule le potentiel post-synaptique vers le corps cellulaire. Les dendrites reçoivent les afférences synaptiques sur leur membrane (*dendritic shaft*) ou sur des petites protubérances que l'on qualifie d'épines dendritiques (*dendritic spines*). On notera que les CGRs adultes n'ont pas d'épines dendritiques et donc reçoivent leurs afférences directement sur la membrane des dendrites.

I.2.1. STRUCTURES ET CONNECTIVITÉS DES DENDRITES DES CGRS

Le nom dendrite vient du mot grec «dendron» qui signifie arbre. En fait, les dendrites ont une morphologie qui s'apparente aux arbres (Stuart et al., 2008). La morphologie dendritique des CGRs, leurs types de connections axonales (Cajal, 1952, Wassle and Boycott, 1991, Masland, 2001a) et leur réponse aux stimuli lumineux ont permis l'identification de près de 20 sous-types différents de CGRs dans différents modèles d'animaux expérimentaux tels que chez le rat, la souris et le chat (Masland, 2001g, a, Sun et al., 2002b, a, Dacey and Packer, 2003, Diao et al., 2004, Kong et al., 2005, Coombs et al., 2006, Coombs et al., 2007, Volgyi et al., 2009).

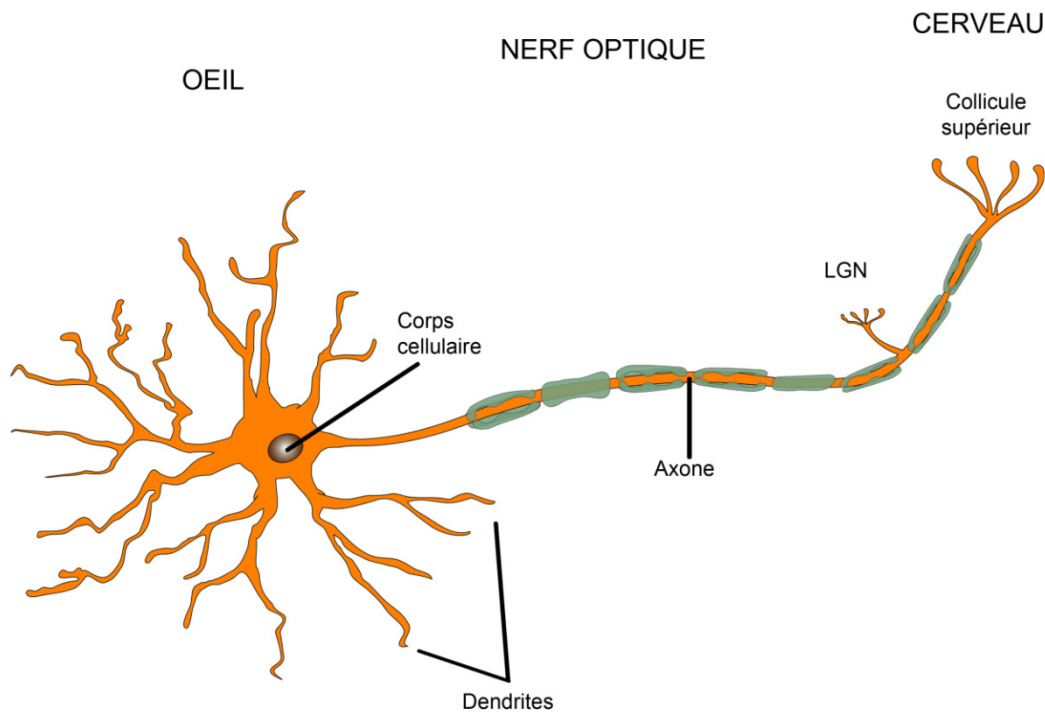


FIGURE 2 : Les cellules ganglionnaires de la rétine ont une cytoarchitecture particulière avec leurs divers compartiments situés dans différents sites anatomiques. Leur corps cellulaire ainsi que leur arbre dendritique complexe se trouvent dans la rétine, alors que leur axone qui peut atteindre plusieurs centimètres se situe dans le nerf optique. Ce dernier établit la liaison entre la rétine et les sites primaires de la vision dans le cerveau tel que le collicule supérieur (CS) et le noyau géniculé latéral (NGL). (Image générée par Junie Barbara Morquette).

La morphologie des arbres dendritiques des CGRs peut être associée à des fonctions neuronales précises, ce qui leur confère des caractéristiques physiologiques particulières. Voici quelques exemples :

- Les cellules ganglionnaires à mélanopsine représentent 2,5% des CGRs. Ce sont des CGRs photosensibles exprimant le photopigment mélanopsine. Leur morphologie se reconnaît par un large arbre dendritique peu complexe (Hattar et al., 2002). Elles sont impliquées dans le cycle du sommeil, les changements pupillaires et se projettent dans le noyau supra-optique (Hattar et al., 2002).
- Chez le chat, les CGRs de type Y ont un grand soma, un arbre dendritique large et des dendrites épaisses. Elles sont sensibles aux stimuli à faibles contrastes, à faibles fréquences spatiales et à des motifs bougeant rapidement. Par contre, les CGRs de type X ont un soma moyen, un petit arbre dendritique très complexe, fin, et répondent à des mouvements lents (Boycott and Wässle, 1974, Hochstein and Shapley, 1976).
- Un autre exemple est celui des CGRs chez le primate appelées cellules midjets, cellules parasols et cellules bistratifiées (Rodieck et al., 1985). Les cellules parasols sont des CGRs avec un large arbre dendritique et un gros soma. Elles se projettent dans la couche magnocellulaire située dans le NGL et répondent à des motifs contrastés, mais ne sont pas sensibles aux couleurs. Les cellules midjets, quant à elles, se projettent dans la couche parvocellulaire du NGL. Elles ont un arbre dendritique concis, un soma petit et répondent à des changements de couleur, mais pas aux contrastes.

Malgré la grande diversité structurelle des CGRs, on distingue trois catégories majeures de CGRs selon leur réponse à la lumière (Nelson et al., 1978) (Figure 1) : 1) Les CGRs ON répondent à la présence de lumière en émettant une augmentation de la fréquence de potentiel d'action lorsqu'un flash lumineux atteint le centre de son champ récepteur. Ces CGRs ON ont leur arbre dendritique dans la *sublamina b* ou elles entrent en contact synaptique avec les cellules bipolaires ON. 2) En contraste, les CGRs OFF répondent à l'absence de la lumière dans le centre de leur champ récepteur en émettant une augmentation de la fréquence de potentiel d'action. Ces CGRs OFF ont leurs arbres dendritiques dans la *sublamina a* dans la CPI où elles entrent en contact synaptique avec les cellules bipolaires OFF (Famiglietti and Kolb, 1976, Nelson et al., 1978). 3) enfin, une proportion restreinte de CGRs ON-OFF ont leur arbre dendritique dans les deux sublamina et répondent à l'augmentation et à la diminution de la lumière (Amthor et al., 1984).

L'ensemble des photorécepteurs en relation avec une même cellule ganglionnaire établit un champ récepteur. Le champ récepteur de CGR est circulaire et comprend le centre et le pourtour (soit la périphérie), deux régions concentriques à activités antagonistes (ON/OFF et OFF/ON). Au centre, il reçoit l'information directe provenant des cônes par l'entremis d'une cellule bipolaire alors qu'en périphérie l'information reçue provient des cônes connectée à la cellule bipolaire via les cellules horizontales. Dans une cellule ganglionnaire ON le centre est excité par la présence de la lumière au centre (ON) et inhibé par la présence de la lumière en périphérie (OFF). Alors que dans les CGRs OFF, le centre est inhibé par la lumière au centre alors que le pourtour est excité par elle. Ainsi selon la position du stimulus la réponse peut être excitatrice ou inhibitrice selon le type de cellule. On notera que dans un environnement stable où l'intensité de la lumière ne varie pas les CGRs ont une activité basale. Cependant, le moindre

changement d'intensité lumineuse se traduit par une différence de perception lumineuse entre le centre et la périphérie du champ récepteur, ce qui engendre une réponse.

Outre cette distinction fonctionnelle, des approches moléculaires chez la souris ont permis de démontrer que les dendrites de sous-populations de CGRs distinctes se situent dans des sous-couches précises et différentes les unes des autres dans la CPI (Kim et al., 2010). En l'occurrence, les CGRs de type J ont leur arbre dendritique dans la sous-couche SL2 alors que les CGRs de type DB établissent leurs dendrites dans la sous-couche SL3 et SL7 (Figure 1 et Figure 4). Nous y reviendrons plus loin. Dans la rétine adulte, le maintien des structures dendritiques et leurs synapses sont donc essentiels au bon fonctionnement des CGRs.

I.2.2 LES STRUCTURES INTRACELLULAIRES DES DENDRITES

Les informations nerveuses reçues au niveau des dendrites sont intégrées et transmises au corps cellulaire. Les dendrites aident le neurone dans l'intégration des afférences de signaux internes et externes qu'il reçoit. Ainsi la dendrite se différencie de l'axone par sa fonction, sa structure, mais aussi sa composition intracellulaire et moléculaire. En effet, les dendrites contiennent de l'ARN messager et des organelles responsables de la synthèse locale de protéines : on y distingue le réticulum endoplasmique, des polyribosomes, du Trans golgien (Kindler and Kreienkamp, 2012). Un exemple est celui de la protéine *Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein* (ARC) dont l'ARN est transporté dans les dendrites et y est traduit (Farris et al., 2014). Les dendrites contiennent aussi des récepteurs de neurotransmetteurs qu'on ne retrouve pas dans l'axone ainsi que des mitochondries responsables de l'apport en énergie (Sheng and Cai, 2012, Kimura and Murakami, 2014).

Au niveau du cytosquelette, les microtubules du compartiment dendritique se distinguent de celui des axones par leurs orientations mixtes. En effet, les microtubules situés dans les dendrites ont une orientation parallèle à la longueur dendritique. Cependant, certains microtubules ont leurs terminaisons positives vis-à-vis du corps cellulaire alors que d'autres les ont vis-à-vis de l'extrémité dendritique. Dans le compartiment axonal, l'ensemble des terminaisons positives des microtubules donne face à l'extrémité axonale (Baas and Lin, 2011). De plus, les dendrites contiennent des protéines complémentaires des microtubules qui leur sont propres, telle que la protéine *Microtubule-Associated Protein-2* (MAP2) impliquée entre autres dans la stabilisation du cytosquelette (Kandel et al., 2000).

Ainsi, la combinaison de ces différents éléments contribue aux maintiens structurels et permet aux dendrites de répondre efficacement à l'intégration des afférences, ce qui joue un rôle important dans la réponse de la cellule et la transmission du signal vers le soma.

I.2.3 LE DÉVELOPPEMENT DES DENDRITES DES CGRS

I.2.3.1. La neurogénèse de la rétine

Préalablement à la neurogénèse, la rétine neurale contient un groupe de cellules progénitrices multipotentes qui forment un neuroépithélium dans lequel toutes les cellules entre en contact avec les lamina basal et apical (Phase I) (Turner and Cepko, 1987, Turner et al., 1990). Par la suite, les cellules progénitrices migrent en profondeur et sortent du cycle cellulaire, chaque type à son tour, pour acquérir leur phénotype cellulaire distinct (phase II). Chez les vertébrés, la séquence d'apparition des différents types cellulaires suit un ordre précis (Cepko et al., 1996, Livesey and Cepko, 2001, Cepko, 2014) dans lequel les CGRs sont les premières cellules à se différencier. Les cellules horizontales, les cellules amacrines et les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) suivent. Les cellules bipolaires et des cellules de Müller sont ensuite les dernières à naître (Rapaport et al., 2004). La neurogénèse se produit jusqu'à la formation complète des différentes couches de la rétine mature (Figure 3). Chez la souris, elle a lieu entre E12 et P7 (Marquardt and Gruss, 2002). Peu de temps après leur différenciation, les neurones migrent vers leur position finale et leurs neurites commencent à croître.

I.2.3.2. Le développement dendritique des CGRs

Durant le développement dendritique, les neurones subissent des changements morphologiques qui vont de la croissance et l'élaboration de dendrites jusqu'à l'établissement de synapses.

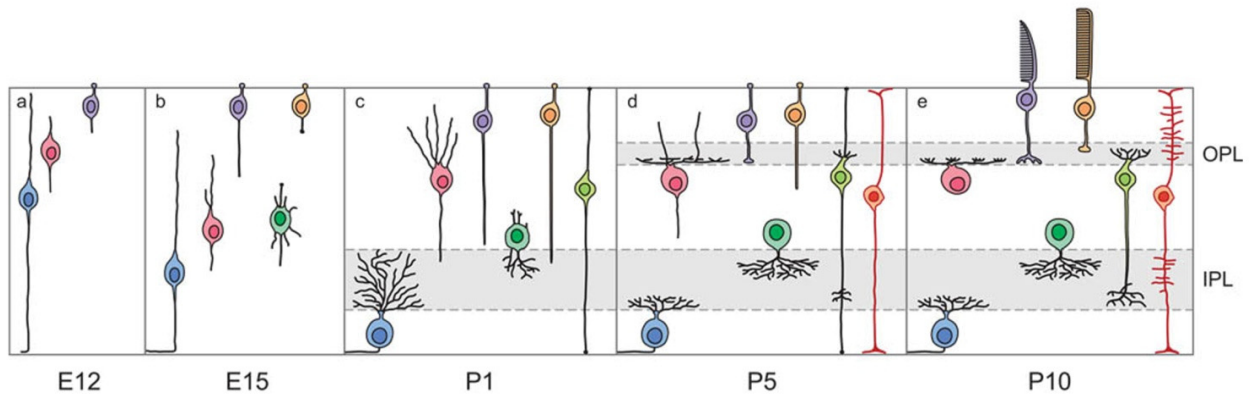


FIGURE 3 : Chronologie du développement des neurones rétiniens et leurs

prolongements. Sur cette figure se trouvent les différentes étapes de développement des dendrites : initiation, élaboration, maturation, stabilisation et synaptogenèse. Peu de temps après leur différenciation, les neurones migrent vers leur position finale et leurs dendrites commencent à croître. Chez les CGRs cette migration a lieu après que la croissance des axones a commencé. Le développement dendritique qui survient par la suite implique les phases d’exploration, d’élaboration et de stratification (Reese, 2011). Vert : Cellule amacrine; Bleu : Cellule ganglionnaire de la rétine; Rose : Cellule horizontale; Vert pale : cellule bipolaire; Mauve : cône; Orange : Bâtonnet. OPL : Outer plexiforme layer pour couche plexiforme externe; IPL : inner plexiforme layer pour couche plexiforme interne. Reproduit à partir de «Development of the retina and optic pathway», Reese BE., Volume 51, page 618, Copyright © (2011) avec permission de Elsevier.

Dans la rétine en développement, la croissance dendritique des CGRs commence peu de temps après que leur axone ait établi des contacts synaptiques avec leurs cibles dans le cerveau vers la période embryonnaire (E16). Sous l'influence de facteurs libérés par les cellules amacrines, les CGRs passent d'un mode de croissance axonale à un mode de croissance dendritique (Goldberg et al., 2002, Goldberg, 2004). Une vue classique du développement dendritique des CGRs veut que les arbres dendritiques croissent de manière diffuse dans plusieurs sublamina du IPL et qu'ensuite ces structures soient restructurées pour former un arbre dont les branches sont restreintes dans des lamina prédéfinies (Sernagor et al., 2001). En effet, il a été démontré qu'au stade d'initiation débutant vers E17, les premières dendrites commencent leur croissance dans la CPI nouvellement formée. Ensuite, durant la phase d'élaboration, l'arbre dendritique des CGRs passe par maintes étapes incluant l'addition, l'élimination de branches dendritiques, l'élongation ou la rétraction de branches existantes. Chez les rongeurs, cette phase de croissance a lieu jusqu'à la naissance de l'animal (P0). À la fin de cette phase, les arbres dendritiques sont multistratifiés (Bodnarenko and Chalupa, 1993, Bodnarenko et al., 1995, Wang et al., 2001). Subséquemment, durant la phase de maturation, les branches dendritiques des CGRs qui occupent des positions inappropriées se restructurent par un mécanisme d'élimination sélective et de croissance (Sernagor et al., 2001, Chalupa and Gunhan, 2004, Xu and Tian, 2004). Ceci provoque une diminution progressive des CGRs multistratifiées et parallèlement, une augmentation des CGRs monostratifiées. Ce processus de maturation est connu sous le nom de *dendritic pruning* (Liu et al., 2007, Xu and Tian, 2008). La dernière étape est celle de la stabilisation. Elle est associée à la formation de contacts synaptiques entre les dendrites et leurs partenaires. Nous y reviendrons un peu plus loin.

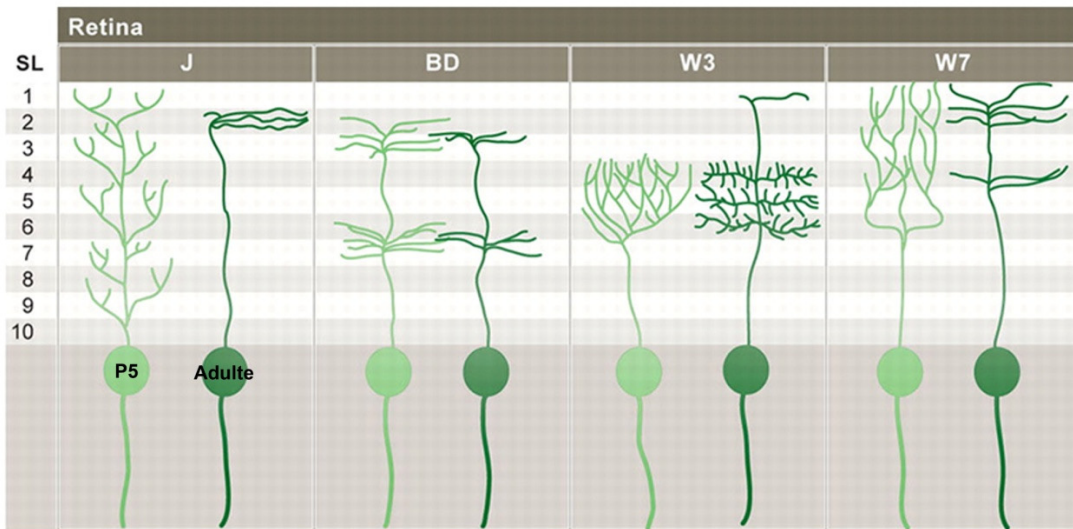


FIGURE 4. Des CGRs exprimant différents marqueurs moléculaires présentent des patrons de croissances dendritiques distinctes. Les dendrites des CGRs de type J (CGR-J) croissent de manière diffuse dans toutes les couches de plexiforme interne (CPI) avant de prendre position dans une sous-couche distincte après l'émondage dendritique (*dendritic pruning*). Cependant, dans les CGRs-BD, les arbres dendritiques croissent de manière ciblée directement dans un compartiment précis de la CPI. Les CGRs-w3 commencent à s'établir dans une sous-couche avant de croître et de s'installer aussi dans d'autres sous-couches du plexiforme interne. Enfin les CGRs-W7, des cellules ganglionnaires bistratifiées dont les dendrites se développent par étape. Reproduit avec permission. Source : modifié de (Kim et al., 2010).

D'autres patrons de développement dendritique des CGRs ont été démontrés plus récemment (Mumm et al., 2006, Kim et al., 2010). Dans ces derniers, les séquences d'élaboration et de maturation de l'arbre dendritique varient (Figure 4). Ainsi, en dehors du patron de i) restructuration des branches dendritiques initialement diffuses décrites ci-dessus, on peut compter ii) la formation d'arbres dendritiques de manière ciblée vers une position précise dans la CPI, iii) la formation d'arbres dendritiques dans une lamina qui, par la suite, change pour une position plus distale et iv) la formation d'arbres bistratifiés par des étapes distinctes (Maslim and Stone, 1988, Bodnarenko and Chalupa, 1993, Tian and Copenhagen, 2003, Chalupa and Gunhan, 2004, Diao et al., 2004, Mumm et al., 2006, Coombs et al., 2007). Cette diversité de patrons de développement dendritique peut varier selon les espèces (souris, poisson zèbre), mais aussi selon différents sous-types de CGRs chez un même animal (Mumm et al., 2006, Coombs et al., 2007). En effet, une étude du laboratoire du Dr Sanes montre que chez les souris, les dendrites des CGRs de type J subissent une restructuration après une croissance diffuse, alors que les dendrites des CGRs de type DB croissent d'une manière ciblée vers des sublamina précis. Pour les CGRs de type W3 et W7, les dendrites grandissent par étape (Kim et al., 2010).

Somme toute, les différentes étapes de la formation des dendrites et en particulier les deux dernières sont essentielles, car elles sont impliquées dans l'établissement de types de neurones du SNC et pourraient avoir un impact sur le type d'afférences qu'elles reçoivent. Qu'en est-il de la genèse des connexions post-synaptiques des CGRs?

I.2.3.3. La synaptogenèse des dendrites des CGRs

Tout au long de l'élaboration de la structure dendritique, les connexions synaptiques se forment. En effet, la formation des branches dendritiques se fait grâce à la formation de filopodes qui croissent vers un cône de croissance axonale pour former des synapses (Jontes et al., 2000, Jontes and Smith, 2000). Alors, le filopode en contact avec son partenaire atteint un stade de stabilité et fait place à une nouvelle branche dendritique (Dailey and Smith, 1996, Niell et al., 2004). Il a été suggéré que le remodelage durant la maturation entraîne la perte des connexions synaptiques inappropriées des CGRs ON ou OFF avec les terminaisons présynaptiques des cellules bipolaires OFF ou ON respectivement. Les connexions correctement établies contribueraient à la stabilité des segments dendritiques via un renforcement des synapses selon l'hypothèse synaptotrope (Vaughn et al., 1988). Aussi, contrairement à la séquence de neurogénèse dans laquelle les CGRs sont les premiers neurones à naître, les CGRs sont parmi les dernières à établir des contacts synaptiques dans la rétine en développement. Les dendrites des CGRs établissent des contacts synaptiques premièrement avec les cellules amacrines environ 3 jours après la naissance (P3), suivis peu de temps après par les cellules bipolaires de P8 à P10 (Bansal et al., 2000, Diao et al., 2004, Coombs et al., 2007). Tout compte fait, la formation des synapses est une étape importante pour la maturation et le maintien des structures dendritiques.

Le développement des dendrites des CGRs et leurs synapses se font sous l'influence de plusieurs facteurs. Dans la partie suivante, nous nous attarderons sur certains facteurs les plus étudiés.

I.2.4. FACTEURS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LA STABILITÉ DENDRITIQUE

Le développement des dendrites nécessite l'implication de facteurs génétiques intrinsèques et de facteurs extrinsèques agissant globalement sur toute la cellule ou localement sur les dendrites (McAllister, 2000, Urbanska et al., 2008). Ainsi, les facteurs génétiques intrinsèques sont médiés par les facteurs de transcriptions qui déterminent les patrons dendritiques indépendamment des signaux extracellulaires. Un exemple est celui du facteur de transcription Hamlet. Ce facteur est exprimé par les neurones sensoriels externes du système nerveux périphérique de la *Drosophile* (Moore et al., 2002). L'expression de Hamlet durant le développement entraîne la formation de neurones ne contenant qu'une seule dendrite comparativement aux neurones munis de multiples dendrites qui n'expriment pas ce facteur. Aussi, le knock-down de Hamlet induit la transformation des précurseurs des neurones sensoriels externes en neurones à multiples dendrites avec un arbre dendritique complexe (Moore et al., 2002, Urbanska et al., 2008).

Les facteurs extrinsèques qui influencent l'arborisation, la plasticité ainsi que la stabilité dendritique comprennent : i) des signaux diffusibles tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF pour *Brain-Derived Neurotrophic Facteur*), ii) les contacts cellulaires et iii) l'activité neuronale. Tout d'abord, le BDNF est un facteur diffusible clé impliqué dans la régulation de la morphologie des dendrites des CGRs. Ainsi, le BDNF est exprimé dans les CGRs avec leur récepteur TrkB et contribue à la mise en forme et au maintien de la morphologie dendritique (McAllister, 2000, Urbanska et al., 2008). Durant le développement, une corrélation inverse entre la présence de BDNF dans la rétine de *Xenopus* et la complexité de l'arbre dendritique des CGRs a été rapportée (Lom and Cohen-Cory, 1999). En effet, l'administration

du BDNF exogène dans la rétine au début du développement dendritique entraîne une simplification de l'arbre dendritique des CGRs qui devient plus petit et moins complexe. Cependant, une réduction du niveau de BDNF dans la rétine par l'utilisation d'anticorps neutralisant le BDNF, entraîne une augmentation de l'élaboration des dendrites et un arbre plus complexe. Il est à noter qu'une administration du BDNF dans le tectum optique, une cible des CGRs dans le cerveau de certains animaux vertébrés, stimule l'arborisation dendritique des CGRs (Lom et al., 2002). Ces résultats soulignent l'importance du BDNF local et du BDNF provenant des cibles, dans la régulation de l'arbre dendritique des CGRs durant le développement.

Les contacts cellulaires médiés par les protéines de surface favorisent aussi la croissance dendritique en agissant sur la longueur et la complexité. De même, les contacts dendro-dendritiques dirigent les dendrites, leur position finale (d'où l'établissement de leurs champs dendritiques) et permettent l'établissement de contacts synaptiques appropriés (Perry and Linden, 1982, Parrish et al., 2007).

L'activité afférente est aussi importante dans la régulation de la croissance dendritique et le patron dendritique des CGRs. En effet, l'activité synaptique régule la croissance de l'arbre dendritique en augmentant le taux d'ajouts de branches (Rajan and Cline, 1998). Durant les premières phases du développement, l'activité synaptique engendre initialement l'élaboration et la croissance de l'arbre dendritique. En effet, dans la rétine le remodelage dendritique dû à l'activité afférente coïncide avec la période développementale au cours de laquelle les cellules bipolaires établissent des contacts synaptiques avec les CGRs (Maslim et al., 1986). Bodnarenka et Chalupa ont démontré que les contacts établis par les cellules bipolaires jouent un rôle prépondérant dans le patron de stratification des dendrites des CGRs ON et OFF (Bodnarenko

and Chalupa, 1993). Lorsque la libération du glutamate dans les cellules bipolaires ON est bloquée par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, cela prévient la ségrégation des arbres dendritiques dans les sublamina de la CPI et ce, durant la période normale de stratification. De plus, il a été démontré que le blocage de la stimulation visuelle, dans un contexte «d'élevage dans le noir» (ou *dark rearing*) retarde la ségrégation de l'arbre dendritique des CGRs ON et OFF après l'ouverture de l'œil (Tian and Copenhagen, 2001, Tian and Copenhagen, 2003). Ces résultats démontrent l'importance de l'activité afférente dans l'établissement de la morphologie des dendrites des CGRs durant le développement. Cependant après la période développementale les synapses contribuent au maintien des structures dendritiques en prévenant la pousse dendritique et favorisant la stabilisation des branches dendritiques (Rajan and Cline, 1998, Niell et al., 2004). Au juste, le développement des dendrites et leurs synapses sont étroitement régulés.

Après leur développement, les dendrites deviennent relativement stables et leurs morphologies définissent la manière dont les signaux se propagent à partir des synapses vers le corps cellulaire. Les facteurs impliqués durant le développement de l'élaboration des structures dendritiques contribueraient au maintien et à la stabilité des dendrites de neurones matures. Par ailleurs, l'arbre dendritique d'un neurone adulte mature peut être modulé au niveau de sa structure dans les cas pathologiques, mais aussi durant le vieillissement normal. Dans les parties qui suivent, nous ferons un rappel des caractéristiques de la physiopathologie du glaucome et ensuite nous nous attarderons aux changements dendritiques qui surviennent durant le vieillissement normal et pathologique.

I.3. LA MALADIE DU GLAUCOME

I.3.1. LA PHYSIOPATHOLOGIE DU GLAUCOME

Première cause irréversible de cécité dans le monde, le glaucome fait référence à un groupe de maladies caractérisées par une neurodégénérescence progressive de la rétine et du nerf optique. En effet, elle entraîne des dommages au sein de la rétine, du nerf optique, mais aussi dans le cerveau au niveau du NGL et du cortex visuel (Quigley, 1999, Almasieh et al., 2012). Le glaucome est une neuropathie multifactorielle dont l'éthologie reste inconnue. Étant asymptomatiques, les personnes atteintes de glaucome n'en sont pas conscientes avant une phase assez avancée de perte visuelle.

Parmi les facteurs de risque qui y sont associés, les plus connus sont l'âge, l'augmentation de la pression intraoculaire (PIO) et l'ethnicité (Coleman and Miglior, 2008), (Leske, 2007, Quigley, 2011). Toutefois, de ces trois éléments l'augmentation de la PIO dans la rétine est le seul facteur de risque modifiable associé au développement du glaucome (Leske, 1983, (VanVeldhuisen et al., 2000, Nouri-Mahdavi et al., 2004), (Weinreb et al., 2014). Ainsi, différents types de glaucome (le glaucome à angle ouvert et à angle fermé), sont associés à une augmentation de la pression intraoculaire. À cet égard, chez un sujet malade, la pression intraoculaire peut atteindre les 21 mm Hg comparativement à celle d'un sujet sain qui se situe aux alentours de 15 mm Hg (Quigley and Iglesias, 2004). Chez les patients glaucomateux, l'augmentation de la pression intraoculaire induit une pression mécanique au niveau de la papille optique (ou point aveugle), à l'endroit où se réunissent les fibres optiques provenant des CGRs.

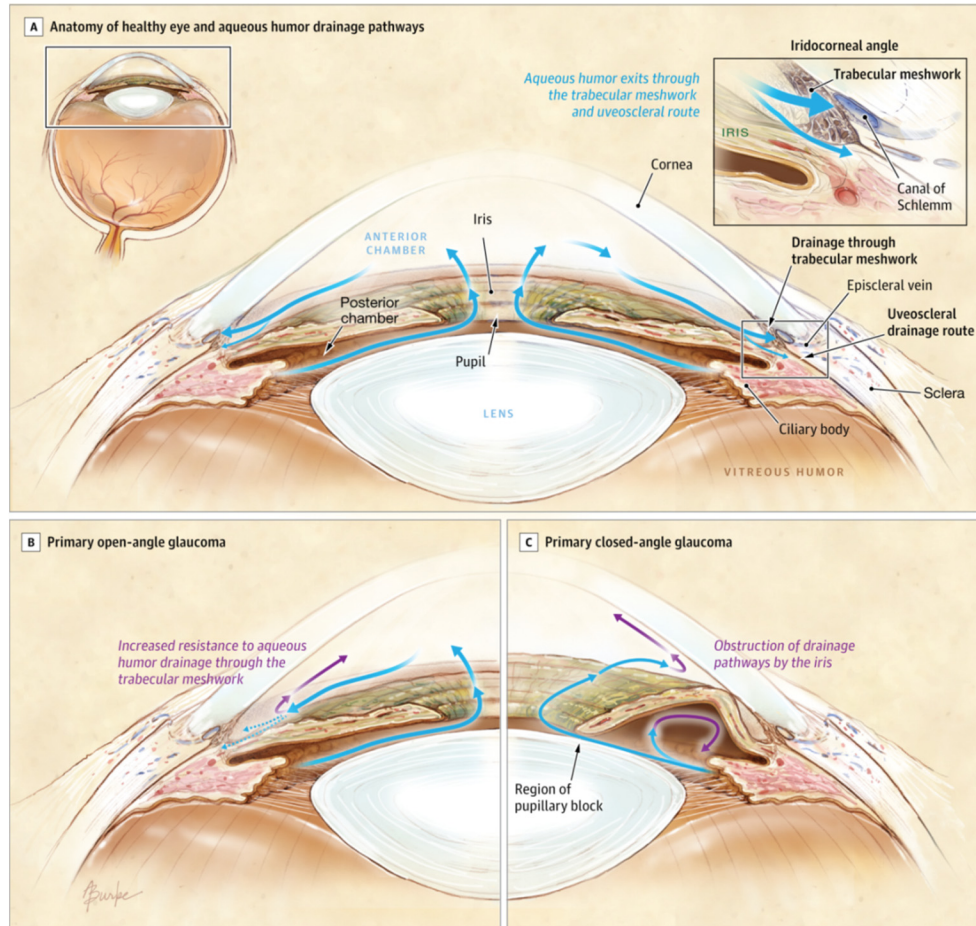


FIGURE 5. Voies de drainage de l’humeur aqueuse dans l’œil normal et l’œil glaucomateux. A) Dans l’œil normal, l’humeur aqueuse est drainée via le trabéculum (*trabecular meshwork*) dans l’angle irido-cornéal. Dans la plupart des sujets atteints de glaucome, le drainage de l’humeur aqueuse est entravé. B) Dans le glaucome à angle ouvert, le trabéculum devient progressivement imperméable à la circulation de l’humeur aqueuse, alors que dans le glaucome à angle fermé une déformation de l’iris est à l’origine de cette obstruction. Dans les deux cas, l’accumulation de l’humeur aqueuse entraîne une augmentation de la pression intraoculaire (PIO), un des facteurs de risque de la maladie du glaucome. (Image provenant de (Weinreb et al., 2014); Copyright © (2014) American Medical Association. All rights reserved).

Cette pression entraîne une compression au niveau de la lamina cribrosa avec comme conséquence l'activation de mécanismes cellulaires locaux (Tezel et al., 2007, Weinreb et al., 2014), l'induction d'ischémie au niveau de la rétine ainsi qu'une lésion des axones des CGRs dans le nerf optique (Kaur et al., 2008), (Tezel et al., 2010). Néanmoins, il est à noter que tous les types de glaucome ne sont pas associés à une augmentation de la PIO et vice versa (Van Buskirk and Cioffi, 1992, Nemesure et al., 2007). De même, certains patients glaucomateux répondant positivement aux traitements contre l'augmentation de la PIO continuent pourtant de perdre la vue.

La classification des différents types de glaucome se fait selon trois critères :

1. Tout d'abord, selon la présence ou non d'hypertension intraoculaire (PIO élevée),
2. Le caractère ouvert ou fermé de l'angle irido-cornéen au fond duquel se trouve le trabéculum (Figure 5). En effet, le glaucome à angle ouvert est provoqué par le ralentissement de l'écoulement de l'humeur aqueuse causé par le trabéculum qui devient progressivement imperméable. Par contre le glaucome à angle fermé, provient de la déformation de l'iris qui crée une résistance au passage de l'humeur aqueuse (Weinreb et al., 2014).
3. Enfin, selon que le développement du glaucome résulte ou non de la présence au préalable d'une pathologie. Aussi s'il n'existe pas de cause apparente responsable on parle de glaucome de type primaire. Autrement si une cause de la maladie a été identifiée on parle de glaucome de type secondaire (Weinreb et al., 2014).

Les mécanismes responsables des dommages des CGRs dans le glaucome ne sont pas tout à fait élucidés. Outre les mécanismes de compression au niveau de la paille optique induite

par l'hypertension intraoculaire, les plus connus sont : la perte de l'apport des neurotrophines comme que le BDNF l'ischémie, l'hypoxie, le stress oxydatif, l'excitotoxicité impliquant les protéines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor alpha pour* TNF α) (Wax and Tezel, 2002, Almasieh et al., 2010, Agarwal and Agarwal, 2012). Ces facteurs peuvent agir directement ou indirectement sur les CGRs pour induire leurs morts par apoptose, nécrose et autophagie (Quigley et al., 1981, Berkelaar et al., 1994, Garcia-Valenzuela et al., 1994, Garcia-Valenzuela et al., 1995, Quigley et al., 1995, Kim et al., 2008). Il est à noter qu'une forme de mort cellulaire récemment rapportée, la nécrose programmée (la nécroptose), est responsable de la mort des CGRs dans un modèle d'ischémie-reperfusion rétinale. Toutefois, l'implication de la nécroptose dans l'évolution de la maladie du glaucome en tant que tel n'a pas encore été démontrée.

Il a été suggéré que le glaucome ainsi que des neuropathies du nerf optique sont des maladies axogéniques caractérisées par une dégénérescence des axones des CGRs dans le nerf optique, suivie d'une perte progressive de leurs corps cellulaires (Schwartz et al., 1999). Une mort considérable des CGRs dans ces pathologies entraîne chez le patient une détérioration progressive de la vision, débutant généralement en périphérie et progressant vers le centre avec des conséquences dévastatrices pour la qualité de vie du patient. Cependant, il y a de plus en plus d'évidences de l'altération dendritique dans la rétine glaucomateuse. C'est ce dont nous discuterons dans les prochaines parties.

I.3.2 LES CHANGEMENTS DENDRITIQUES DANS LE GLAUCOME

Des changements dendritiques précoces ont été mis en évidence dans le modèle de glaucome expérimental chez le primate. Cela inclut la réduction de la complexité des arbres dendritiques avec un amincissement des branches et une réduction du champ dendritique des CGRs (Weber et al., 1998f). Ces altérations morphologiques corrélaient avec une réduction de la réponse temporelle et spatiale à des stimuli visuels (Weber and Harman, 2005). La rétraction de l'arbre dendritique a aussi été décrite dans le modèle expérimental de glaucome chez le rat (Morgan et al., 2006) et le chat (Shou et al., 2003). Ces changements morphologiques surviennent avant l'atrophie du soma et de l'axone et suggèrent que les altérations au niveau dendritique seraient un des premiers signes de neurodégénérescence liés au glaucome (Weber et al., 1998a, Morgan et al., 2000, Liu et al., 2011). Parallèlement, le niveau d'expression d'un marqueur de la connectivité neuronale, le c-fos, diminue après l'induction de l'hypertension oculaire au laser chez le rat et ceci très tôt (Fu et al., 2009). Ceci corrobore avec une étude récente démontrant dans un modèle d'hypertension oculaire chronique chez le rat, une diminution du nombre et de la morphologie (incluant le diamètre de la zone active) des synapses en ruban (*ribbon synapse*) présente dans le plexiforme interne de la rétine (Park et al., 2014). Ces synapses établissent le contact entre les cellules bipolaires en pré-synaptique et CGRs en post-synaptique. Ceci suggère que les CGRs perdent leurs connexions synaptiques durant les premières phases de la pathologie. Par ailleurs, une réduction importante de l'arbre dendritique des CGRs a été rapportée dans la rétine glaucomateuse humaine à une phase avancée de la maladie, alors que le nombre de CGRs était déjà très bas (Pavlidis et al., 2003).

On sait maintenant que ces changements dendritiques varient selon le sous-type de CGRs affecté. Dans la rétine de chat sujet à une élévation chronique de la pression intraoculaire, par exemple, les dommages au niveau de l'arbre dendritique sont plus prononcés pour les CGRs de type Y ayant un large arbre dendritique que pour les CGRs X ayant un arbre dendritique plus petit (Shou et al., 2003). Ceci suggère que les sous-populations de CGRs ont des résistances différentes aux dommages glaucomateux, ce qui pourrait être en lien avec leurs propriétés intrinsèques morphologiques et de fonctionnelles.

Ainsi, ces études montrent que des changements au niveau dendritique des CGRs pourraient être sous-jacents au déficit fonctionnel durant le glaucome et donc avoir des conséquences critiques sur l'efficacité synaptique.

I.3.3. LES CHANGEMENTS DENDRITIQUES DANS LA RÉTINE ÂGÉE

Les changements dendritiques dans la rétine ne surviennent pas seulement dans les cas pathologiques. En effet, des études ont montré que l'âge est la meilleure corrélation qui existe entre la cécité et les troubles visuels (Dandona and Dandona, 2006). Il a été suggéré qu'une perte neuronale importante survient avec l'âge et serait à l'origine d'une diminution du fonctionnement neuronal de l'œil âgé. En effet, Balazzi et al. 1984 ont rapporté une perte progressive des CGRs parallèlement avec une réduction de l'épaisseur de la rétine dans le processus de vieillissant normal chez l'humain et dans des modèles expérimentaux (Balazzi et al., 1984). Aussi, ont-ils démontré que les CGRs seraient susceptibles aux changements liés à l'âge comparativement aux autres types de neurones rétiens (Balazzi et al., 1984, Katz and Robison, 1986, Repka and Quigley, 1989, Weisse, 1995, Shoji et al., 1998, Cavallotti et al.,

2001 , Cavallotti et al., 2004). De plus, la perte de l'épithélium pigmentaire ainsi que des cônes et des bâtonnets ont été rapportés dans la rétine âgée (Gao and Hollyfield, 1992, Curcio et al., 1993). Somme toute, ces résultats suggéreraient fortement que la perte des neurones rétinien est à l'origine de la perte de fonction durant le vieillissement.

Cette notion a été récemment controversée puisqu'une étude a démontré que les altérations neuronales plus subtiles peuvent être responsables d'un déficit fonctionnel dû au vieillissement. Parmi ces changements, l'on compte le remodelage de l'arbre dendritique, des changements au niveau de leur connexion et au niveau de facteurs régulateurs de leur plasticité (Burke and Barnes, 2006). Un exemple est celui des cellules bipolaires dans lesquelles des neurites aberrantes ont été trouvées au niveau de leurs dendrites. De même, des arborisations anormales ont été trouvées dans des cellules horizontales dans la rétine des souris âgées de 24 mois (Liets et al., 2006, Eliasieh et al., 2007, Terzibasi et al., 2009). Dans ces deux cas, les changements dendritiques menant à une perte fonctionnelle ont lieu en absence de pertes neuronales significatives. Dans ce même ordre d'idée, une étude du laboratoire de Josh Sanes a aussi démontré qu'il n'y avait aucun changement dans le nombre des neurones principaux de la rétine âgée (Samuel et al., 2011). Cependant, la rétine s'amincit et s'étend avec l'âge et maintient ainsi son volume. Parallèlement, le diamètre de l'arbre dendritique des CGRs diminue avec l'âge. Ainsi, l'augmentation de la rétine et la diminution des dendrites pourraient être à l'origine de zones non couvertes par les champs dendritiques établis par les arbres dendritiques des CGRs (Samuel et al., 2011) potentiellement responsables du déficit fonctionnel.

Des altérations dendritiques dues à l'âge ont aussi été démontrées dans d'autres parties du SNC. Par exemple, dans une proportion importante de neurones, une diminution de l'arbre dendritique et de ses branches a été démontrée dans le cortex frontal de rats et d'humains âgés

(De Brabander et al., 1998, Grill and Riddle, 2002, Markham and Juraska, Uylings and de Brabander, 2002). Le cortex frontal est une des régions les plus vulnérables durant le vieillissement. Dans l'hippocampe, on retrouve des anomalies au niveau des arbres dendritiques ainsi que de leurs épines dendritiques et une perte de synapses fonctionnelles (Coleman and Flood, 1987, Barnes, 1994).

En résumé, ces données démontrent que la plasticité neuronale a lieu dans les neurones âgés et peut ainsi avoir une conséquence nuisible sur la réponse au niveau de synapses afférentes, affectant ultimement le fonctionnement neuronal.

I.3.4. LES CHANGEMENTS DENDRITIQUES DANS LES CIBLES POST-SYNAPTIQUES DES CGRS

Les changements dendritiques durant la maladie du glaucome ne sont pas limités au CGRs. En effet, des changements dendritiques ont été démontrés dans d'autres neurones du SNC lésé. La majorité des terminaisons axonales des CGRs finissent dans le NGL et le CS chez les primates et les rongeurs respectivement. Ils représentent les centres primaires de la vision qui relie l'information visuelle de la rétine au cortex visuel. Chez les primates, des voies parallèles se séparent dans le NGL en trois compartiments : les couches magnocellulaires, parvocellulaires et konicocellulaires (Hendry and Calkins, 1998). Ces couches reçoivent des afférences de différents sous-types de CGRs, notamment des cellules parasols, midgets et des CGRs bistratifiées respectivement.

L'analyse du NGL dans le modèle du glaucome expérimental a permis de comprendre les conséquences de la lésion du nerf optique sur les changements transynaptiques dans le NGL. Par exemple, une perte de neurones a été trouvée dans les couches magnocellulaires et

parvocellulaires dans un modèle expérimental de glaucome chez le singe (Yucel et al., 2000, Ito et al., 2009). La taille et la densité des neurones sont aussi affectées. Les neurones de la couche parvocellulaire subissent un rétrécissement considérable par rapport aux neurones de la couche magnocellulaire (Weber et al., 2000, Yucel et al., 2000). De plus, des corrélations ont été établies entre le niveau de PIO et la sévérité de la perte des CGRs.

Dans le glaucome expérimental chez le primate, les neurones de projection du NGL subissent une réduction de leur longueur dendritique et de leur complexité (Gupta et al., 2007, Ly et al., 2011). Les dendrites post-synaptiques des neurones du NGL semblent aussi subir des changements pathologiques considérables en absence de la perte des neurones de l'axone en question. Ces changements étaient présents dans les neurones magnocellulaires et parvocellulaires dans les phases précoces et modérées du modèle de dommage du nerf optique (Gupta et al., 2007). Ces résultats démontrent qu'une réduction des afférences des CGRs subséquente à un dommage du nerf optique, induit des changements pathologiques dans les couches magno- et parvocellulaires au niveau de la longueur dendritique, de la complexité ainsi qu'une perte des neurones. L'altération de ces structures aurait des conséquences sur l'intégration et peut contribuer à la perte précoce de fonctions associées au glaucome.

I.3.5. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES RÉGULANT LA PATHOLOGIE DENDRITIQUE ET LA PERTE SYNAPTIQUE

La compréhension du monde scientifique actuel des mécanismes qui régulent les changements dendritiques et la perte de leur connexion synaptique des CGRs dans la pathologie du glaucome est très limitée. Ces altérations seraient en partie le résultat soit de modifications

au niveau de l'expression de protéines impliquées dans la formation, la stabilisation et le maintien des arbres dendritiques, soit des facteurs impliqués dans l'élaboration et le fonctionnement des synapses de neurones en développement ou matures. Rappelons que la présence de synapses fortes au niveau des dendrites permet la stabilisation et le maintien dendritique. Dans ces prochains paragraphes, nous discuterons dans un premier temps de l'implication de la cascade du complément dans l'élimination des connexions synaptiques. Ensuite, nous nous attarderons sur l'implication du BDNF dans la régulation de la morphologie dendritique durant le glaucome.

I.3.5.1. Rôle de la cascade du complément

Le rôle de la cascade du complément dans l'élimination des synapses durant la neurodégénérescence de la maladie du glaucome a reçu une attention toute particulière récemment (Ren and Danias, 2010, Rosen and Stevens, 2010). La cascade du complément est une composante importante du système immunitaire inné incluant une large famille de protéines qui interviennent dans la destruction des agents infectieux, dans l'élimination des complexes immunes ainsi que dans le contrôle des réponses inflammatoires. L'activation du complément implique plusieurs protéines dont le C1q et en aval, le C3 et C5. Ces derniers conduisent à une opsonisation, au recrutement de leucocytes ou à la lyse de pathogène suite à la formation du complexe d'attaque membranaire, CAM (Rutkowski et al., 2010). Une étude réalisée avec minutie a émis l'hypothèse que le C1q joue un rôle important dans l'élimination des synapses dans le SNC en développement (Stevens et al., 2007). Les auteurs démontrent que les astrocytes stimulent la cascade du complément dans les CGRs en développement, ceci résulte en l'accumulation du C1q dans les synapses marquées pour élimination dans le NGL dorsale

(Stevens et al., 2007). Ils ont aussi démontré que des souris déficientes pour les C1q et C3 développaient des défauts substantiels dans l'élimination de synapses. Ainsi dans le NGL de souris knockouts, les cellules cibles des CGRs recevaient plus qu'une ou deux terminaisons axonales de ces dernières (Stevens et al., 2007, Lambris et al., 2010).

La *cascade du complément* est-elle aussi impliquée dans l'élimination des synapses dans le glaucome ? La réponse à cette question reste inconnue. Cependant, plusieurs données supportent cette hypothèse. Les C1q, C3 et C4 sont surrégulés dans le modèle de glaucome chez le rat, le primate, les souris DBA/2J et dans le glaucome humain (Kuehn et al., 2006, Stasi et al., 2006, Steele et al., 2006, Stevens et al., 2007, Howell et al., 2011). Les protéines C1q sont localisées dans les synapses de la couche plexiforme interne aux premiers stades de la dégénérescence du glaucome chez des souris DBA/2J, ceci avant la mort neuronale des CGRs (Stevens et al., 2007). Aussi, chez des souris déficientes pour Cq1a ou C3, une protection partielle des synapses des CGRs a été notée dans le glaucome (Howell et al., 2013) ou dans les dommages ischémiques (Kuehn et al., 2008) respectivement. Ceci suggère que l'élimination des synapses induite par les protéines du complément entraîne la mort neuronale. Une idée intéressante est que l'inhibition des protéines du complément comme le C1q pourrait être utilisée comme thérapie pour prévenir la perte des synapses et des CGRs dans le glaucome. Toutefois, il faut noter que *la cascade du complément* est impliquée dans une variété de fonctions, dont certaines sont essentielles pour la survie cellulaire. Il a été démontré que le C1q joue un rôle neuroprotecteur dans le SNC en provoquant une élimination rapide des débris cellulaires et des microglies toxiques, réduisant ainsi le niveau de cytokines inflammatoires, en promouvant la survie neuronale et en inhibant la neurotoxicité (Alexander et al., 2008, Benoit

and Tenner, 2011). De ce fait, le double rôle de *la cascade du complément* doit être pris en considération lorsque des stratégies de neuroprotection sont conçues pour le glaucome.

I.3.5.2 La régulation dendritique dépendante du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF)

Le BDNF est bien connu pour sa capacité à promouvoir la survie neuronale. Il est aussi un important régulateur de la plasticité synaptique et de la mémoire (Poo, 2001, Arancio and Chao, 2007, Lu et al., 2008). La sécrétion du BDNF se fait en réponse à l'activité neuronale au niveau des terminaisons présynaptiques et aux niveaux post-synaptiques dans les épines dendritiques (Hartmann et al., 2001, Kohara et al., 2001). Aussi, ces récepteurs TrkB sont situés aux niveaux pré et post-synaptiques (Drake et al., 1999). La signalisation entre le BDNF et TrkB induit une potentialisation à long terme dans l'hippocampe une réponse qui dépend de la synthèse de protéine locale par les dendrites (Kang and Schuman, 1995, Minichiello, 2009). Dans la rétine, le BDNF participe à la mise en forme et au maintien de la morphologie dendritique (Lom and Cohen-Cory, 1999, Lom et al., 2002, Cohen-Cory and Lom, 2004). Le BDNF est un facteur bien connu impliqué dans plusieurs événements cellulaires, dont l'élaboration des arbres dendritiques des CGRs de la rétine, durant le développement (Cohen-Cory and Lom, 2004) comme mentionné préalablement.

Dans les modèles expérimentaux tels que le glaucome expérimental et l'hypertension intraoculaire, le niveau d'expression du BDNF ne varie pas alors que l'expression du pro-BDNF diminue (Guo et al., 2009). De plus, l'expression de son récepteur TrkB diminue (Hernandez, 2000, Guo et al., 2009). Aussi une étude a rapporté que le transport axonal compromis dans des

modèles de glaucome chez le rat et le singe bloque le transport du BDNF et de son récepteur, TrkB, du nerf optique vers la rétine (Pease et al., 2000).

Le rôle du BDNF vis-à-vis des dendrites des RGCs dans le glaucome est obscur, mais des données récentes indiquent que les neurotrophines peuvent agir pour préserver la morphologie dendritique des cellules ganglionnaires après une lésion axonale. En effet, l'administration de BDNF exogène au moment d'une lésion du nerf optique dans un modèle de chat préserve la morphologie des dendrites et du soma des CGRs alpha et bêta (Weber and Harman, 2008). Ces résultats soulignent l'importance du BDNF local dans la régulation dendritique durant le développement et post-lésion. Comme pour la survie des CGRs, l'utilisation des suppléments de BDNF par thérapie génique pourrait être avantageuse pour préserver la structure et la fonction des dendrites des CGRs dans le glaucome. Cependant, les effets à long terme et la fiabilité de l'augmentation de neurotrophines diffusibles dans la rétine sont actuellement inconnus et nécessiteraient une analyse de faisabilité préalable avant l'implantation d'approches thérapeutiques. D'ailleurs, une étude récente a démontré que l'expression de BDNF ou de CNTF par l'utilisation d'AAV a amenée à des changements substantiels dans la structure dendritique de CGRs transfectées (Harvey et al., 2009). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'effet du BDNF sur la préservation dendritique ne sont pas connus. Néanmoins, cela révèle le rôle du BDNF dans le maintien des structures synaptiques. Ce serait important d'établir si l'effet d'un tel changement morphologique aurait des effets tangibles sur l'aspect électrophysiologique des CGRs.

Il est plausible que la perte des contacts présynaptiques corrèle avec une diminution dans la longueur et la complexité des arbres dendritiques des CGRs. Toutefois, il n'y a pas encore des évidences démontrant si les mécanismes moléculaires impliqués dans les

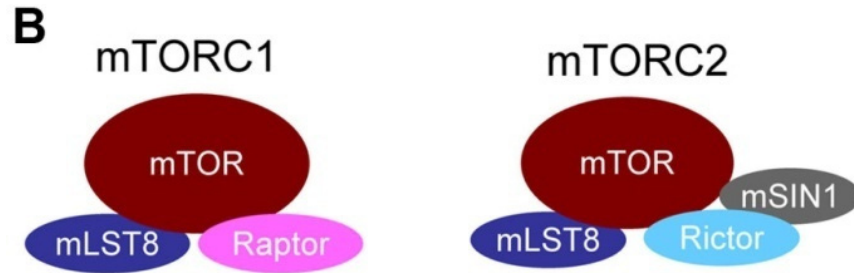
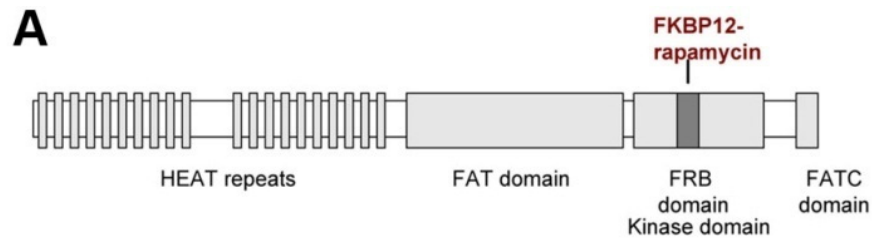
restructurations dendritiques et les altérations synaptiques sont reliés. Aussi, on ignore si une diminution de la longueur et de la complexité de l'arbre dendritique a lieu avant, pendant, ou après la perte synaptique, suite à une blessure axonale.

I.4. LA PROTÉINE KINASE MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN

En 1975, une équipe de scientifiques canadiens isole la rapamycine un antibiotique de type macrocyclique à partir de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* trouvée dans le sol de l'île de Paque, l'île Rapa Nui (Sehgal et al., 1975, Vézina et al., 1975). La cible de la rapamycine chez les mammifères ou la protéine *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) est la seule protéine connue, complètement bloquée par cet antibiotique. mTOR est une protéine sérine thréonine kinase de la famille des phosphatidylinositol-3 kinase qui contrôle plusieurs événements cellulaires. Différents stimuli extracellulaires convergent vers mTOR, qui induit alors la synthèse protéique, l'autophagie et la synthèse lipidique. Plusieurs rôles lui ont été attribués dans le SNC durant le développement et dans les cas pathologiques. En effet, durant le développement mTOR contrôle la dimension des corps cellulaires des neurones, la croissance axonale, l'arborisation dendritique dans les neurones de l'hippocampe et la synthèse de protéines locales (Kwon et al., 2003, Takei et al., 2004, Jaworski et al., 2005). Dans les prochains paragraphes, nous nous attarderons aux structures et composantes de mTOR ainsi qu'aux voies de signalisation qu'elle active. Ensuite, nous nous pencherons sur son rôle dans le glaucome et terminerons par ce qui est connu du lien entre mTOR et les dendrites.

I.4.1 STRUCTURES ET COMPOSANTES DES COMPLEXES DE mTOR

La protéine mTOR médie son action grâce à ses deux complexes : le complexe 1 de mTOR (mTORC1) et le complexe 2 de mTOR (mTORC2) composés chacun de plusieurs protéines d'interaction qui leur confèrent différentes fonctions. Ainsi, mTORC1 contrôle la croissance, le métabolisme et le cycle cellulaire alors que mTOR2 contrôle la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Laplante and Sabatini, 2013). Structurellement, mTORC1 est formé de la sous-unité mTOR associée au RAPTOR (Regulatory associated protein of mTOR), l'élément majeur du complexe 1. En effet, RAPTOR est une protéine structurelle qui régule l'assemblage du complexe et détermine la signalisation en aval de mTORC1 (Hara et al., 2002, Kim et al., 2002). De même, la protéine mLST8 (*mammalian lethal with sec13 protein 8*) est indispensable pour l'activité de mTOR. La PRAS40 (proline rich Akt substrate 40 kDa) et la DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein) sont des inhibiteurs des mTOR (Takei et al., 2004). La mTORC2 est composée quant à elle de RICTOR qui détermine l'assemblage du complexe et contrôle les effecteurs en aval (Jacinto et al., 2004, Sarbassov et al., 2004). La mTORC2 est composée quant à elle de RICTOR qui détermine l'assemblage du complexe et en aval contrôle les effecteurs. Le complexe 2 de mTOR est aussi composé de PRAS40, DEPTOR et de la protéine mSin1 importante dans la régulation de l'assemblage du complexe (Figure 6). Par ailleurs, le mTORC1 est sensible à la rapamycine et aux rapalogues, c'est à dire des molécules de même famille, alors que le mTORC2 est résistant à la rapamycine.



mTORC1		mTORC2	
component	function	component	function
mTOR raptor	serine/threonine kinase scaffold protein determining mTORC1 specific substrates and regulating the assembly and the localization	mTOR rictor	serine/threonine kinase scaffold protein determining mTORC2 specific substrates and regulating the assembly
mLST8	unknown: no effects on known substrates of	mLST8	unknown: essential for mTOR2
PRAS40	mTORC1 inhibitor	mSin1	scaffold protein regulating the assembly
deptor	mTOR inhibitor	deptor ptor1/2	mTOR inhibitor related t SGK activation

FIGURE 6. Les composants des complexes de mTOR. A) Structure des domaines de mTOR; B) Composantes des complexes mTORC1 et mTORC2 ainsi qu'une description des différentes fonctions des protéines associées (Takei and Nawa, 2014). Copyright © 2014 Takei and Nawa.

I.4.2 LES VOIES DE SIGNALISATION DE mTOR DANS LE SNC

La protéine mTOR est essentiellement régulée par deux voies (Figure 7) : soit la voie impliquant la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) / *phosphatase and TENsin homolog* (PTEN) / Akt appelée aussi voie canonique ou classique, et les voies dites alternatives (Hay and Sonenberg, 2004, Swiech et al., 2008).

I.4.2.1 Signalisation en amont de mTOR : Voie classique

Plusieurs facteurs de croissance tels que l'*insulin-like growth factor 1* (IGF-1), l'insuline, l'*epidermal growth factor* (EGF) activent la voie intracellulaire PI3K/PTEN/Akt. En effet, la liaison de ces facteurs de croissance à leurs récepteurs membranaires à tyrosines kinases entraîne le recrutement et l'activation de ces derniers et subséquemment d'Akt. Aussi, un lien a été établi entre Akt et mTOR via le complexe de la sclérose tubéreuse 1 (appelé TSC1 ou hamartine) et du complexe 2 (TSC2) appelé aussi tubérine (Gao et al., 2002, Inoki et al., 2002, Tee et al., 2002). La phosphorylation de TSC2 par Akt entraîne sa dissociation de TSC1. La TSC2 dissociée se lie alors à la protéine de liaison 14-3-3 qui la capture et cette dernière empêche la liaison de TSC2 de nouveau au TSC1 (Li et al., 2002, Li et al., 2003, Nellist et al., 2003, Shumway et al., 2003). Par contre dans des conditions de non-stimulation, TSC2 garde une interaction avec la TSC1 et ainsi ce complexe inhibe l'activité de mTORC1. Ainsi la TSC2 est un acteur important dans la signalisation de mTOR.

Le complexe TSC1/TSC2 est central dans le processus d'activation de mTOR. En effet, lorsque lié, le complexe TSC1/TSC2 agit comme une *GTPase activating protein* (GAP) pour la protéine G homologue de Ras enrichie dans le cerveau, soit la Rheb *small G-protein Ras homology enriched in brain* (Inoki et al., 2003a; Dibble et al., 2012). La forme active de Rheb

soit Rheb-GTP se lie au mTORC1 et l'active (**Long et al., 2005**). Il faut noter que la présence de GAP accélère l'hydrolyse du GTP ce qui entraîne l'inactivation de Rheb (Rheb-GDP).

I.4.2.2 Signalisation en amont de mTOR : Voies alternatives

La phosphorylation du TSC2 peut provenir de voies alternatives, c'est-à-dire des voies indépendantes de la voie PI3K/Akt. En effet, les nutriments, l'état d'énergie et l'hypoxie sont différentes conditions métaboliques de la cellule qui induisent la phosphorylation du TSC2. Certaines de ces conditions et les voies qu'elles activent sont présentées à la figure 7. À titre d'exemple, nous pouvons citer l'AMPK (AMP-activated proteine kinase) qui est induit par la baisse d'énergie, la hVps34 qui répond à la présence d'acide aminé et la REDD 1/2 à la présence de stress cellulaire (Kim, 2009). Il est important de noter toutefois que la phosphorylation de TSC2 dans ces conditions peut entraîner l'activation ou l'inactivation de mTOR en fonction du site phosphorylé. Par exemple, la voie MAPK / Erk induit une phosphorylation au niveau de la ser664, ce qui entraîne l'inhibition de l'activité de TSC1/TSC2 et donc l'activation de mTOR; alors que l'AMPK induit sa phosphorylation sur la serine 1345 et ainsi augmente l'activité du complexe TSC1/TSC2 et de ce fait l'inhibition de mTOR (Inoki et al., 2002).

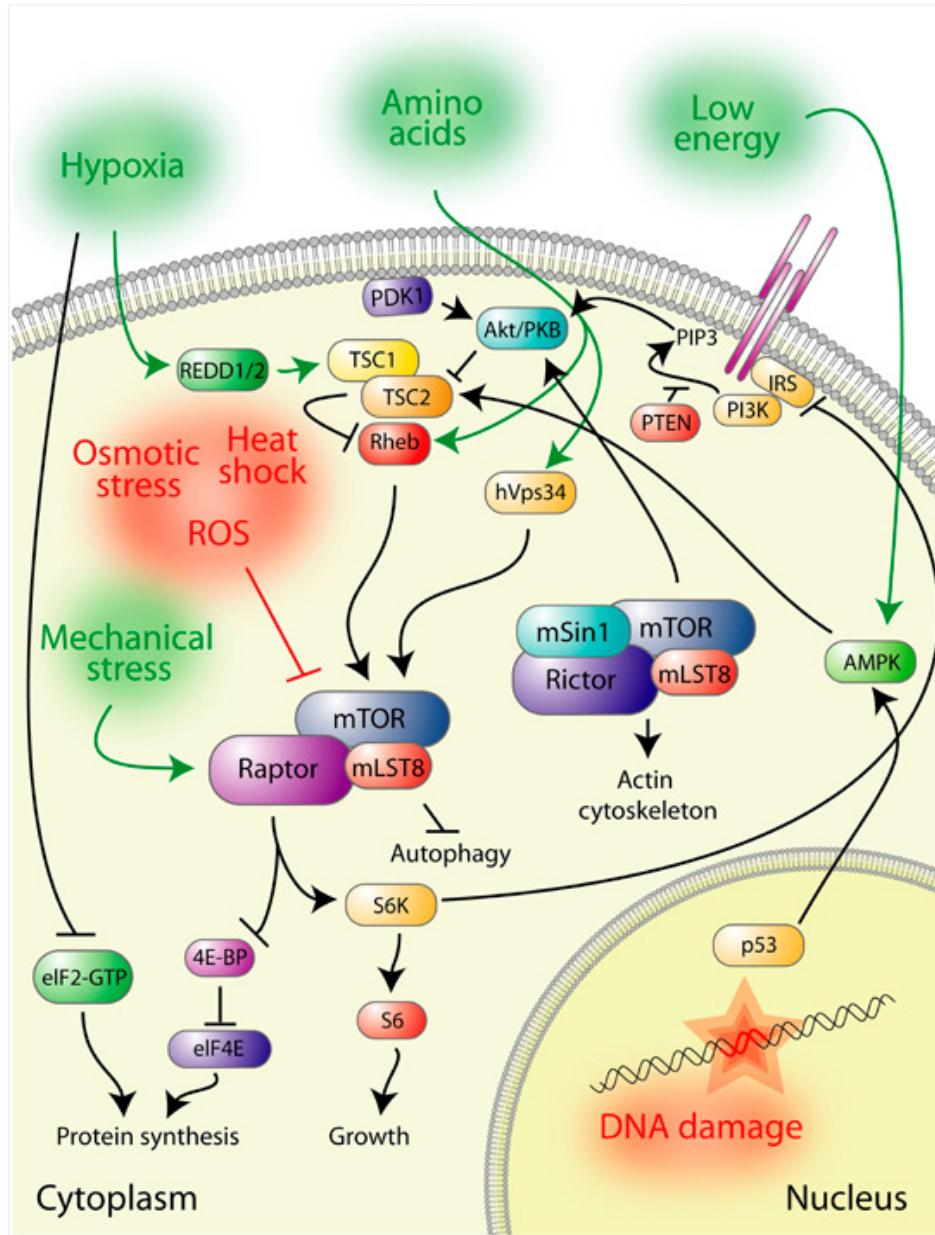


FIGURE 7 : Voie de signalisation de la protéine kinase mTOR. Voir à la section I.4 pour une description détaillée des voies de signalisation intracellulaire de mTOR. Reproduit avec permission de Macmillan Publishers Ltd: Oncogene (Reiling and Sabatini, 2007), copyright (2006).

1.4.2.2.1. La protéine Regulated in Development and DNA damage response 2 (REDD2)

La protéine *Regulated in Development and DNA damage response 2* (Redd2), connue aussi sous les noms de DDIT4L ou RTP-801L, a été identifiée comme un inhibiteur de la voie de signalisation de mTOR. La protéine REDD2 partage 33% d'homologie avec la REDD1, mais pas avec d'autres protéines connues. L'expression de REDD2 a été rapportée dans le muscle squelettique immobilisé (Kelleher et al., 2013), dans les cellules osseuses et dans les macrophages ayant accumulé du cholestérol (Cuaz-Pérolin et al., 2004). Aussi, l'expression de REDD2 et de son homologue REDD1 est augmentée en situation de stress cellulaire tel que l'hypoxie, le stress osmotique et oxydatif (Cuaz-Pérolin et al., 2004, Imen et al., 2009, Miyazaki and Esser, 2009).

La REDD2 agit sur l'activité de mTOR en aval de la voie de signalisation classique c'est-à-dire indépendamment de PI3K/PTEN/AKT. En effet, une étude a montré que REDD2 ainsi que son homologue REDD1 agissent sur l'activation du complexe TSC1/TSC2 avec l'intermédiaire de la protéine 14-3-3 (DeYoung et al., 2008, Miyazaki and Esser, 2009). Ainsi la présence de REDD2 compétitionne avec la liaison de TSC2 et de la protéine 14-3-3. REDD2 entraîne leur dissociation et se lie à 14-3-3 favorisant ainsi la formation du complexe TSC1/TSC2 et donc l'inhibition de mTOR (Corradetti et al., 2005, Miyazaki and Esser, 2009).

Plusieurs études ont rapporté la présence de REDD1 dans des neurones du SNC dont les CGRs (Del Olma-Aguado et al. 2013). Cependant, jusqu'à l'étude décrite dans cette thèse, l'expression de REDD2 n'avait pas encore été rapportée dans le SNC en développement ou dans le SNC mature lésé. En agissant en aval de Akt, la protéine REDD2 représente une cible idéale pour la modulation ciblée de l'activité de mTOR (Manning and Cantley, 2007).

I.4.2.3. Signalisation en aval de mTOR : les effecteurs

Des centaines de protéines régulées par la protéine kinase TOR ont été rapportées chez la levure. À titre d'exemple, la protéine TOR régule la transcription, la traduction et la stabilité protéique, le transport intracellulaire et le dynamisme des microtubules. Chez les mammifères, l'activation de mTOR induit aussi la synthèse de protéines et de lipides qui participent à l'extension de l'axone et des dendrites du neurone. Les effecteurs les mieux connus, les p70S6 et 4EBP1, agissent au niveau de la traduction et de la synthèse protéique. En effet, mTORC1 active eIF4E-binding protein, ce qui libère le facteur de transcription eIF4E, et la kinase S6K1 (ou p70S6K), impliquée dans la biogenèse ribosomale. Ceci entraîne la formation de polysomes actifs dans la traduction. Des exemples de traduction de protéines contrôlées par l'activité de mTOR sont : l'expression de transporteurs en nutriments situés à la surface de la membrane plasmique, comme GLUT-1, l'expression de la protéine post-synaptique PSD-95 ou celle de la CAMKII (Taha et al. 1999, Lee et al., 2005; Gong et al., 2006). Par ailleurs, une étude a aussi démontré l'implication de mTOR dans le contrôle du cytosquelette. En effet en se phosphorylant la *cytoplasmic linker protein-170* (CLIP-170), une protéine liant le bout positif des microtubules, mTOR agit sur le dynamisme des microtubules peut-être même le transport via les microtubules et participe à la formation de la morphologie dendritique. Aussi, mTOR contrôle la stabilité de dendrite en se liant à des protéines liées aux microtubules. mTORC2 phosphoryle le PKC α et en régulant l'activité de Rac et Rho et donc l'invasion et l'assemblage du cytosquelette ainsi que la formation et la motilité du cône de croissance (Hochstein and Shapley, 1976, Amthor et al., 1984, Marquardt and Gruss, 2002).

I.4.3. RÔLE DE mTOR DANS LA NEURODÉGÉNÉRESCENCE LIÉE AU GLAUCOME

Plusieurs évidences suggèrent que la signalisation de mTOR est altérée dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et le Parkinson (Malagelada et al., 2006, Tang et al., 2013, Xu et al., 2014). Le rôle de mTOR dans l'évolution du glaucome n'a toutefois pas encore été rapporté. Cependant dans un modèle d'axotomie du nerf optique, Park et al. ont mis en évidence une diminution de l'activité de mTOR en lien avec la mort neuronale (Park et al., 2008). Aussi, ils ont démontré que l'activation de mTOR de manière continue, induit la survie des CGRs et la régénération axonale en utilisant des souris knockouts conditionnelles de PTEN, un activateur de la voie mTOR (Park et al., 2008). Aussi, l'implication de mTOR dans la synthèse de protéines synaptiques et sa liaison avec des protéines du cytosquelette nous portent à spéculer qu'il serait modulé dans les axonopathies.

I.4.4. mTOR ET LA MORPHOLOGIE DENDRITIQUE

Plusieurs évidences lient mTOR au développement dendritique. Dans les neurones de l'hippocampe en culture, l'activation de PI3K de manière constitutive ou l'inhibition de PTEN en utilisant de l'ARN d'interférence (ARNi) induit une augmentation de la longueur dendritique totale, du nombre et de la complexité des branches (Jaworski et al., 2005). Dans les cellules granule dentate, l'élimination de PTEN entraîne l'hypertrophie du soma, l'élongation et l'augmentation de l'arborisation dans les neurones en développement (Kwon et al., 2003, Pun et al., 2012). Aussi, mTOR agit non seulement sur la croissance, mais aussi sur la stabilité des dendrites durant le développement des neurones de l'hippocampe (Jaworski et al., 2005, Swiech et al., 2011). De plus, l'utilisation de la rapamycine bloque la croissance dendritique anormale lorsque PI3K est activé de manière constitutive ou que PTEN est inhibé (Jaworski et al., 2005).

Dans les neurones pyramidaux matures sains, la suppression de PTEN dans des souris transgéniques induit la croissance des dendrites pyramidales des couches apicales 2/3 alors qu'il n'y a aucun effet sur les neurones des couches basales (Chow et al., 2009). On notera par ailleurs que le rôle de la protéine mTOR sur les dendrites des CGRs matures ou sur la plasticité dendritique des neurones adultes du SNC lésé n'a pas encore été démontré.

En résumé, mTOR est une protéine kinase qui intervient dans plusieurs événements cellulaires dont la croissance et l'élaboration axonale et dendritique durant le développement. Bien que son implication dans certaines maladies neurodégénératives ait été établie, son implication dans l'évolution de la pathologie du glaucome n'a pas été établie. Il serait intéressant d'investiguer s'il est modulé dans le glaucome et si la perte de dendrite rapportée dans cette maladie influence par sa modulation.

I.5. LE TNF α , UN MÉDIATEUR DE LA NEURO-INFLAMMATION

De plus en plus d'études mettent en évidence une contribution majeure de la neuro-inflammation dans le processus de neurodégénérescence liée au glaucome. Cette neuro-inflammation se caractérise par l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (Newman and Reichenbach, 1996, Bringmann et al., 2009). Actuellement, il y a plusieurs évidences de l'implication de cette cytokine dans l'évolution du glaucome.

Le TNF α exerce un rôle homéostatique et pathophysiologique dans le système nerveux central selon son niveau d'expression (Montgomery and Bowers, 2012). Dans le système nerveux sain, le TNF α est impliqué dans plusieurs événements physiologiques importants dont la plasticité synaptique. Cependant, une forte concentration de TNF α a été démontrée dans plusieurs pathologies neurodégénératives du SNC telles que l'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques et le glaucome (Shohami et al., 1999, Tan et al., 2007, Brodacki et al., 2008, Sawada et al., 2010, Balaiya et al., 2011, Çomoğlu et al., 2013, Fukazawa et al., 2013, Xin et al., 2013, Belkhelfa et al., 2014). Dans les prochains paragraphes, nous donnerons une description succincte de la signalisation du TNF α et discuterons des connaissances actuelles de son implication dans le glaucome et sa contribution à morphologie dendritique.

I.5.1. SIGNALISATION DU TNF α

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée sous forme de protéine transmembranaire (tmTNF α) de 26 kDa. Suite à son clivage par la protéine transmembranaire ADAM17 ou TACE (Moss et al., 1997), il est relâché sous une forme soluble

(sTNF α) de 17 kDa. L'activité du TNF α et la transduction de signaux associés se fait via l'entremise de deux récepteurs membranaires le TNFR1 (p55TNFR) et le TNFR2 (p75TNFR). Le TNFR1 serait impliqué dans la fonction pro-apoptotique du TNF α alors que le TNFR2 le serait dans la neuroprotection cellulaire (Lom and Cohen-Cory, 1999, Roh et al., 2012). Lorsque le TNF α se lie à son récepteur TNFR1, la trimérisation de ce dernier déclenche le processus d'apoptose par l'activation de la caspase 8 qui, à son tour, active la caspase 3. L'activation de la voie des caspases promeut la mort neuronale (Chen and Goeddel, 2002). Une étude récente a toutefois démontré que la mort des CGRs induite par le TNF α dans un contexte d'excitotoxicité, ne diminue pas en présence d'inhibition de la caspase 8 (Lebrun-Julien et al., 2009), suggérant ainsi une mort des CGRs indépendante des caspases. Dans ce contexte, l'étude de mécanismes alternatifs menant à la mort des CGRs induite par le TNF α est importante (Maslim and Stone, 1988).

I.5.2. LE TNF α DANS LES NEUROPATHOLOGIES

La présence de la cytokine pro-inflammatoire TNF α en forte concentration est responsable de la neuro-inflammation associée avec plusieurs maladies neurologiques. Dans l'œil glaucomateux, l'augmentation de la PIO induit la libération de TNF α par les astrocytes et principalement par la microglie affectée de la rétine (Roh et al., 2012). Aussi, une augmentation de l'expression du TNFR1 a été observée dans la rétine et la partie proximale du nerf optique. Ceci contribue à la mort des CGRs par apoptose et à l'altération des axones des CGRs via la liaison du TNF α à son récepteur TNFR1 (Tezel and Wax, 2000, Yan et al., 2000, Yuan and Neufeld, 2000, Yuan and Neufeld, 2001). De plus, le niveau du TNF α augmente dans l'humeur

aqueuse de sujets souffrants de glaucome primaire à angle ouvert (Weinreb et al., 2014). Il a été démontré qu'en présence d'un inhibiteur de $TNF\alpha$, l'etanercept, la mort des CGRs ainsi que la dégénérescence du nerf optique sont amoindries (Roh et al., 2012). De même, dans des souris déficientes pour le $TNF\alpha$ et le $TNFR2$ soumises à une augmentation de la PIO, la perte de CGRs peut être diminuée (Nakazawa et al., 2006). Somme toute, ces résultats suggèrent que le $TNF\alpha$ contribue à l'évolution de la pathophysiologie du glaucome.

I.5.3. CONTRIBUTION DU $TNF\alpha$ À LA MORPHOLOGIE DENDRITIQUE

La neurodégénérescence des CGRs et de leur axone durant le glaucome a été démontrée dans plusieurs études. Ceci englobe la détérioration de leur axone, de leur soma et le remodelage de leur arbre dendritique ainsi que de leurs synapses (Morquette and Di Polo, 2008, Weber et al., 2008). Étant donné l'implication maintenant reconnue de la neuro-inflammation dans l'évolution du glaucome, nous nous sommes demandés si la cytokine pro-inflammatoire $TNF\alpha$ pourrait avoir un effet sur la morphologie des dendrites durant cette neurodégénérescence.

En fait, la contribution du $TNF\alpha$ à la morphologie neuronale est encore mal connue. Durant le développement, il serait impliqué dans la régulation de la croissance neuritique. En effet, dans les neurones de l'hippocampe en culture, le $TNF\alpha$ induit l'inhibition de la croissance et de l'élaboration des neurites (Neumann et al., 2002). Outre cette étude, aucune donnée n'a été rapportée sur l'effet du $TNF\alpha$ sur les structures dendritiques durant le développement et durant la pathologie à notre connaissance.

Par ailleurs, plusieurs évidences supportent le rôle du $TNF\alpha$ dans la plasticité synaptique. Le $TNF\alpha$ augmente l'efficacité et la rapidité de la transmission synaptique en induisant

l'expression du récepteur de glutamate α -amino -3-hydroxy -5-méthyl -4-isoxazolepropionique (AMPA). Par exemple, dans les neurones de l'hippocampe en culture le TNF α induit l'augmentation de l'insertion des récepteurs AMPA perméable au calcium (Beattie et al., 2002, Wheeler et al., 2009, Beattie et al., 2010). Par contre, dans des cas pathologiques on observe une expression rapide et excessive de ces récepteurs avec pour conséquence une augmentation du calcium intracellulaire à l'origine du processus de l'excitotoxicité (Hermann et al., 2001, Ogoshi et al., 2005). Une étude dans notre laboratoire a corroboré ces résultats puisque dans un modèle d'hypertension oculaire chez le rat ils montrent une augmentation de la production de TNF α qui induit l'insertion des canaux AMPA perméable au Ca²⁺, à l'origine de la mort des CGRs (Cueva Vargas et al., 2011). Ces résultats suggèrent que le TNF α est une cytokine importante durant le développement dendritique et synaptique des neurones. Dans les cas pathologiques, l'effet du TNF α sur les structures dendritiques des neurones du SNC n'est pas connu.

La neuro-inflammation constitue un élément important de la physiopathologie du glaucome. Elle implique la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire telle que le TNF α . Plusieurs études ont montré son implication dans la perte des CGRs, la détérioration de leur axone et la modulation de synapses. Aussi, le TNF α exacerbe l'effet néfaste du glutamate dans la neurotoxicité. Cependant, ses effets sur les dendrites de neurones matures et donc les mécanismes les régulant ne sont pas encore connus et devraient être investigués. Vu que mTOR représente une protéine kinase importante durant le développement des structures dendritiques, il serait judicieux d'investiguer s'il pourrait intervenir dans les mécanismes impliqués. Ceci avec pour objectif final de proposer des stratégies de neuroprotection et de fournir des outils thérapeutiques pour palier à ces effets.

I.6 LA NEUROPROTECTION DES CGRS : OÙ EN SOMMES NOUS ?

Dans la partie présente, nous nous attarderons à la description de différents modèles de lésions de la rétine et du nerf optique utilisés en laboratoire. Nous expliquerons ensuite le choix du modèle expérimental dans cette thèse. Et enfin, nous discuterons de quelques-unes des stratégies de neuroprotection élucidées jusque-là, à l'aide d'exemples.

I.6.1. MODÈLES DE LÉSION DE LA RÉTINE ET DU NERF OPTIQUE (DES CGRS)

I.6.1.1. Modèles d'hypertension oculaire : le glaucome expérimental

Il existe une variété de modèles de glaucomes expérimentaux autant chez les primates non humains que chez les petits mammifères tels que les rongeurs (rats et souris). Il faut savoir cependant que la majorité des modèles expérimentaux de glaucome utilisent l'hypertension intraoculaire comme point de départ pour induire la lésion des CGRs. L'augmentation de la pression intraoculaire (PIO) est réalisée de différentes manières en tirant avantage de l'anatomie de l'œil antérieur, ce qui rappelle souvent un des différents types de glaucome tel que mentionné dans la section I.3.1, Figure 5. Voici quelques exemples de modèles :

- Le modèle de Morisson (Morrison et al., 2008) : Dans ce modèle, une solution saline hypertonique est administrée au niveau de la veine episcléale de l'œil de rat. Ceci entraîne une diminution du drainage de l'humeur aqueuse induisant ainsi une augmentation de la PIO. Afin de faire une courbe de survie des CGRs, des traceurs lipophyliques tels que le DiI sont introduits *in vivo* dans le collicule supérieur de

l'animal glaucomateux une semaine avant l'euthanasie. L'analyse des CGRs se fait sur des rétines étalées. De même, les nerfs optiques sont prélevés et les axones analysés. Des résultats provenant d'Almasieh et al. (2010) ont rapporté 55% de survie des CGRs soumises à une augmentation de la PIO chez le rat à 3 semaines d'étude versus 37% de survie à 5 semaines (Almasieh et al., 2010, Almasieh et al., 2013). Bien que quelques études rapportent que plusieurs injections au niveau de la veine episcléale sont nécessaires pour garder une pression élevée, des études dans notre laboratoire ont montré qu'une seule injection dans la veine épisclérale permet de maintenir la pression élevée durant des semaines (Almasieh et al., 2013).

- Un autre exemple est celui du modèle récent de l'hypertension intraoculaire induit par l'injection de microbilles chez la souris. Les microbilles sont injectées au niveau de la chambre antérieure dans l'œil de souris. Les microbilles présentes dans la chambre antérieure agissent au niveau de la région du trabéculum, ce qui entraîne une diminution du drainage de l'humeur aqueuse et de ce fait induit la mort des CGRs et le dysfonctionnement de leur axone (Sappington et al., 2010).
- Enfin, il existe des modèles de souris transgéniques de glaucome expérimentales. Un exemple est celui du modèle de glaucome spontané de la souris transgénique DBA/2J. L'atrophie de l'iris et la dispersion de pigment qui en résulte entraînent une augmentation de la pression intraoculaire qui demeure constante tout au long de la vie de l'animal (John et al., 1998). Ainsi vers l'âge de 8 à 9 mois on note le début de la mort des CGRs avec 50% de perte axonale vers 10 à 11 mois (Hansen et al., 2005, Libby et al., 2005a, Nagaraju et al., 2007, Reichstein et al., 2007).

Ces modèles représentent un outil expérimental important pour étudier l'évolution de la maladie du glaucome. Cependant, il faut noter que chacun de ces modèles de glaucome ou d'hypertension oculaire met en évidence un aspect de la maladie. Aussi un obstacle dans l'étude des mécanismes qui surviennent dans les premières phases de la maladie est la variabilité présente entre animaux. Aussi le glaucome étant une maladie chronique, l'étude des voies de signalisation qui y sont impliquées peut s'avérer longue.

La lésion du nerf optique et l'excitotoxicité contribuent à l'évolution de la physiopathologie du glaucome (Almasieh et al., 2012). De ce fait, les modèles expérimentaux d'axotomie aiguë et d'excitotoxicité permettent d'étudier certains aspects de ces maladies et d'élucider des voies de signalisation impliquées dans la détérioration et la mort neuronale. Dans les prochains chapitres, nous nous attarderons à la description de ces deux modèles.

I.6.1.2. Le modèle de l'excitotoxicité

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le SNC des vertébrés. Dans la rétine, on le retrouve dans les CPE et CPI où il assure la transmission de l'information visuelle au niveau de synapses excitatrices (Lukasiewicz, 2005). Lorsqu'un excès de glutamate se lie aux récepteurs ionotropiques glutamatergiques, principalement les récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA), ceci déclenche une entrée massive de Ca^{2+} et l'activation de voies de signalisation de protéines pro-apoptotiques dans les neurones : l'on parle alors d'excitotoxicité. Des phénomènes d'excitotoxicité ont été mis en évidence dans des cas de lésions aiguës du cerveau. Dans ces cas, la relâche de glutamate entraîne des dommages tissulaires rapides et sévères (Choi and Rothman, 1990, Casson, 2006, Seki and Lipton, 2008).

L'excès de glutamate dans la fente intersynaptique peut avoir plusieurs origines. Les plus importantes sont:

- i) l'augmentation de la présence du glutamate due à un défaut de recapture du glutamate par les récepteurs glutamatergiques des cellules neuronales et gliales de la rétine. Par exemple, les cellules de Müller sont responsables de la recapture de l'excès de glutamate via les transporteurs glutamate/aspartate (GLAST ou EAAT1) (Otori et al., 1994, Derouiche and Rauen, 1995, Kawasaki et al., 2000). Aussi, une concentration anormalement élevée de glutamate dans la rétine peut être neurotoxique si ce dernier n'est pas évacué à temps.
- ii) La libération de neurotoxines par les cellules gliales affectées (dans les cas pathologiques) (Lebrun-Julien et al., 2009). Par exemple dans des conditions d'excitotoxicité les cellules de Müller induisent la production de TNF α qui contribue à la mort des CGRs. Une étude de notre groupe a démontré que l'injection du NMDA dans la rétine induit une activation du *nuclear factor* κ B (NF- κ B) dans les cellules de Müller, mais pas dans les CGRs. Dans ces conditions, les cellules de Müller produisent la protéine TNF α .
- iii) L'implication encore méconnue des récepteurs AMPA (Cueva Vargas et al., 2011, Almasieh et al., 2012). L'augmentation du glutamate en présence de TNF α induit une augmentation de récepteurs AMPA perméables au Ca²⁺ sur les CGRs dans un modèle de glaucome chez le rat. Ceci exacerbe la mort des CGRs (Cueva Vargas et al., 2011).

Dans le modèle de l'excitotoxicité on utilise une forte concentration de NMDA, un agoniste du glutamate. L'injection du NMDA provoque les mêmes effets qu'un excès de glutamate c'est-à-dire une suractivation des récepteurs ionotropiques. L'effet du NMDA a été testé dans plusieurs modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* (Sucher et al., 1997, Lam et al., 1999, Vorwerk et al., 1999). Il agit au niveau des récepteurs NMDA exprimés par les CGRs, les cellules amacrines et les cellules de Müller et conduit à une mort neuronale en continuum apoptose-nécrose (Martin et al., 1998).

I.6.1.3. Modèle de la lésion du nerf optique

Parmi les modèles de lésion du nerf optique, l'axotomie par coupure complète du nerf est un excellent modèle d'étude de la dégénérescence des CGRs. (Jontes and Smith, 2000, Blanch et al., 2012) . Le nerf optique, accessible via l'orbite de l'œil, peut être complètement coupé sans endommager l'artère ophtalmique lors de la procédure chirurgicale. Une coupure du nerf optique, donc des axones des cellules ganglionnaires, entraîne une neurodégénérescence irréversible de ces dernières (Isenmann et al., 2003). Les CGRs y meurent principalement par apoptose. Chez les CGRs soumises à une axotomie, la mort cellulaire par apoptose se fait en deux phases. La première, plus lente, débute 4 à 5 jours après la lésion et se caractérise par une perte négligeable des CGRs (Berkelaar et al., 1994, Galindo-Romero et al., 2011). La deuxième phase se caractérise par une mort plus rapide des CGRs avec 50% de mort à 7 jours et 90% à 14 jours dans la rétine de souris (Villegas-Pérez et al., 1993, Berkelaar et al., 1994, Hüll and Bähr, 1994). Une alternative à la coupure franche est la coupure des axones des CGRs par l'écrasement

du nerf optique (*micro-crush*). Comme dans le cas de la transsection, l'écrasement du nerf optique entraîne la mort des CGRs par apoptose, mais avec un patron de mort plus lent.

Comment ce modèle de lésion qu'est l'axotomie reflète-t-il le glaucome, cette maladie neurodégénérative lente et chronique ? Tout d'abord, des études ont rapporté que les CGRs meurent par apoptose dans les modèles de lésions aiguës tels que la coupure et l'écrasement du nerf optique, de même que dans le glaucome expérimental et humain (Quigley et al., 1981, Berkelaar et al., 1994, Garcia-Valenzuela et al., 1994, Garcia-Valenzuela et al., 1995, Quigley et al., 1995). Dans l'axotomie, le patron de mort par apoptose des CGRs suivit une chronologie connue et prédictible. Bien que différent, le patron de mort des CGRs par apoptose dans le glaucome présente des similarités: Il comporte une phase primaire et secondaire de neurodégénérescence. En effet, dans un modèle d'hypertension oculaire la séquence de dégénérescence menant à la mort des CGRs a été résumée en 5 étapes dans un article de Robert Nickells (Nickells, 2007) : soit par 1) l'activation de la glie au niveau de la lamina cribrosa à la jonction du nerf optique suite à l'augmentation de la PIO; suivi par 2) le dommage axonal et le début du processus de neurodégénération; 3) l'activation des voies de signalisation de l'apoptose dans les CGRs au cours de la phase de dégénérescence primaire qui survient dans la rétine suivit par 4) une dégénérescence secondaire principalement induite par les débris des premiers neurones morts; et enfin, 5) parallèlement l'activation des cellules gliales en réponse à la neurodégénération. Il est à noter que dans le glaucome les étapes citées ci-dessus peuvent avoir lieu à des moments différents selon le sous-type des CGRs et leur position dans la rétine. De plus, dans le glaucome la séquence des événements est plus lente alors que dans le cas de l'axotomie, elle est rapide et chronologique, toutes les cellules ganglionnaires rétiniennes étant lésées en même temps. D'ailleurs, un avantage de la coupure du nerf optique repose sur la forte

reproductibilité du patron de mort neuronale des CGRs par apoptose (Nickells, 1996, Cellarino et al., 2000, Levin and Gordon, 2002, Watanabe and Fukuda, 2002). Aussi, ce modèle de lésion des CGRs entraîne une mort neuronale rapide, ce qui permet l'étude de mécanismes moléculaires et cellulaires qui seraient trop longs à investiguer dans des maladies chroniques comme le glaucome.

Par ailleurs, on notera que le glaucome a souvent été considéré comme une pathologie chronique à déclenchement tardif (*late-onset*), la détection de la maladie chez l'humain se faisant à un stade avancé, à un moment où la perte neuronale des CGRs est en cours dans la rétine. Cependant, plusieurs articles récents ont rapporté des changements précoces au niveau dendritique et synaptique (Weber et al., 1998, Stevens et al. 2007, Morquette et al., 2014), suggérant la présence de neuroplasticité et de déficit fonctionnel bien avant. De ce fait, nous pensons que le modèle de l'axotomie reflète des aspects de la pathologie du glaucome. Ces différents avantages m'ont porté à choisir ce modèle dans l'étude principale de cette thèse dont l'objectif est d'investiguer les mécanismes moléculaires liés à la pathologie dendritique après une lésion axonale.

I.6.1.4. La rétine : un outil de choix pour l'étude de maladies neuro-dégénératives

La rétine est la partie la plus accessible du SNC. De par sa cytoarchitecture bien organisée, elle représente un support expérimental de choix pour les études de neurodégénérescence, de neuroprotection et de régénération des neurones incluant les CGRs. De plus, les CGRs sont faciles à cibler dans la rétine en raison de leur position dans la monocouche : la CCG. Cette couche est séparée de l'humeur vitrée par la membrane limitante

juxtaposée à la couche fibreuse constituée des axones des CGRs. Ainsi, lorsque des traitements (médicaments, VAA, siRNA ou autres) sont introduits dans le vitrée, ils peuvent agir sur un grand pourcentage de CGRs (Pernet et al., 2005, Vidal-Sanz et al., 2012). Par ailleurs, chaque compartiment cellulaire des CGRs se trouve dans des sites distincts, ce qui permet de cibler le compartiment voulu sans manipuler les autres lors d'expériences. En effet, les axones forment le nerf optique, leurs corps cellulaires se situent dans la CCG alors que les dendrites se situent dans la CPI (Figure 2; (Morquette and Di Polo, 2008). Aussi, le marquage et l'analyse quantitative des CGRs sont faciles et pratiques dans les rétines étalées et dans des coupes transversales (Figure 8 - Section Matériels et méthodes) grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques des CGRs tels que le Brn3a et la β III-tubuline (TUJ-1) qui permettent la détection et la quantification de la survie des CGRs.

I.6.2. LES STRATÉGIES DE NEUROPROTECTION DES CGRS

Dans les maladies neurologiques, la neuroprotection a souvent été considérée comme une stratégie visant à garder les neurones en vie en retardant le processus de mort neuronal. Dans les neuropathies du nerf optique plus particulièrement, la neuroprotection vise la prévention de la mort des CGRs ou la restauration de neurones dans lesquels le processus de mort a déjà commencé. Plusieurs des stratégies de sauvegarde des CGRs ont été testées sur des modèles expérimentaux en laboratoire : En voici quelques-unes :

- L'augmentation de la présence des **facteurs neurotrophiques** dans la rétine lésée afin d'induire la survie des CGRs lésées. Les facteurs neurotrophiques sont importants pour la survie de neurones, la différenciation et l'établissement des connexions synaptiques

durant le développement. En effet, l'hypothèse de la privation des facteurs neurotrophiques stipule que ces derniers sont produits en quantité limitée durant le développement. Ainsi seulement quelques neurones exposés à une concentration optimale survivront alors que les autres sont éliminés par apoptose (Lewin et al., 1998). Par exemple, 65% des CGRs meurent durant le développement de la rétine chez les rongeurs (Sefton and Lam, 1984, Tay et al., 1986). Suite à une lésion du nerf optique, l'administration du BDNF (exogène ou sous forme de thérapie génique) dans l'humeur vitrée entraîne une survie robuste des CGRs dans des modèles de lésion du nerf optique ou de glaucome expérimental (Mey and Thanos, 1993, Mansour-Robaey et al., 1994b, Di Polo et al., 1998, Martin et al., 2002). Cependant cette survie est compromise puisque la lésion entraîne une diminution de l'expression de son récepteur, le TrkB. Des études ont démontré que l'augmentation de TrkB par thérapie génique dans les CGRs augmente la durée et l'effet neuroprotecteur du BDNF (Cheng et al., 2002). Il faut noter aussi que dans ce même ordre d'idée, d'autres études se sont penchées sur les voies de signalisation de facteurs neurotrophiques (Cheng et al., 2002, Sapienza et al., 2003, Pernet et al., 2005), (Annexe C). Cependant, cette survie est temporaire, ne faisant que retarder le processus de mort neuronale.

- Un autre exemple est la stratégie qui vise **l'inhibition de l'apoptose**. Comme la mort des CGRs après une lésion du nerf optique (mécanique ou biochimique) a lieu principalement par apoptose, ces stratégies ciblent l'inhibition de protéines pro-apoptotiques telles que BAX dans un modèle de souris DBA/2J (Libby et al., 2005b) ou la surexpression de protéine anti-apoptotique comme Bcl-2, Bcl-XL par thérapie génique dans des modèles d'axotomie (Bonfanti et al., 1996, Malik et al., 2005). Ceci

afin de médier la survie des CGRs lésées. Par ailleurs, la suppression de l'apoptose des neurones peut aussi passer par l'utilisation d'inhibiteurs de caspase tel que XIAP (Kugler et al., 2000, Holcik et al., 2001, McKinnon et al., 2002, Renwick et al., 2005), (annexe C).

Les stratégies de neuroprotection testées dans notre laboratoire et ailleurs ont jusqu'à récemment visé la neuroprotection, la survie et la régénération neuronale et axonale. De fait, nous pensons que les stratégies qui permettent la préservation de la morphologie dendritique et la connectivité synaptique devraient être des composantes importantes de l'approche globale pour prévenir la perte de vision dans le glaucome (Morquette and Di Polo, 2008). En effet, les neurones et plus particulièrement les cellules ganglionnaires rétiniennes sont des cellules polarisées dont le bon fonctionnement de leurs différents compartiments neuronaux est important pour l'intégrité du neurone.

I.7. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE LA THÈSE

Les CGRs constituent un des sept types cellulaires de la rétine. Bien qu'elles ne représentent que 2% du nombre total de cellules de la rétine adulte, l'intégrité des CGRs est importante pour la perception visuelle. Ces neurones sont affectés dans certaines neuropathies rétiniennes telles que le glaucome, ce qui entraîne d'importantes conséquences sur la qualité de vie des personnes qui en souffrent. Durant ces dernières années, les études de neurodégénérescence et de neuroprotection se sont attardées à l'étude des compartiments axonaux et somatiques. Or le compartiment dendritique est important pour la réception et

l'intégration des afférences d'un neurone. Aussi nous pensons que l'intégrité de tous les compartiments neuronaux est importante pour le bon fonctionnement de la cellule, mais aussi du circuit neuronal dont ils font partie. De plus en plus d'études mettent en évidence la neuroplasticité dendritique en lien avec des maladies neurodégénératives telles que le glaucome. Ainsi, **l'hypothèse principale de ma thèse stipule que la neuroprotection des dendrites des CGRs lésées *in vivo* et par conséquent, la modulation des voies de signalisation sous-jacentes permettraient de mieux protéger et de rétablir la fonction première de ces neurones lésés.**

L'objectif principal de cette thèse est de démontrer qu'une lésion axonale des CGRs entraîne un remodelage précoce des dendrites des CGRs. Aussi en modulant l'activité de mTOR dépendante de REDD2 nous pouvons induire une neuroprotection morphologique et physiologique de ces CGRs adultes lésées *in vivo*.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons cherché à répondre aux six sous-objectifs ci-dessous, qui sont de :

1. Démontrer qu'une lésion axonale (axotomie) entraîne une pathologie précoce des arbres dendriques des CGRs lésées *in vivo*, et ce avant que la mort neuronale ne commence dans la rétine.
2. Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la stabilité des dendrites après une lésion axonale et cibler des protéines impliquées dans ce remodelage (p. ex. mTOR, REDD2).
3. Moduler l'expression des protéines régulatrices de la stabilité dendritique en utilisant des outils moléculaires comme le *short interfering RNA* (siRNA) ou des inhibiteurs pharmacologiques

4. Investiguer s'il existe une corrélation entre la structure des dendrites et la fonction des CGRs lésées *in vivo*.
5. Démontrer qu'une neuroprotection structurelle des dendrites des CGRs restaure la fonction des CGRs et prolonge la survie des CGRs adultes lésées *in vivo*.
6. Investiguer si le $\text{TNF}\alpha$, une protéine capable d'induire la dégénérescence du nerf optique et la mort des CGRs, induit aussi une altération des dendrites en liant avec une modulation de la protéine mTOR.

CHAPITRE 2

II. MÉTHODOLOGIE

Dans cette section nous ferons la description des différents matériels et méthodes dont il est question dans cette thèse.

II.1. LES ANIMAUX EXPÉRIMENTAUX

Les procédures expérimentales sont effectuées sur des souris transgéniques B6.Cg.Tg [Thy1-YFPH]2Jrs/J dites YFP (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) ou des souris de type sauvage (wld) provenant de la même colonie, ceci en conformité avec les politiques sur l'utilisation des animaux dans la recherche de l'Université de Montréal et le Conseil Canadien de Protection des Animaux (directives de www.ccac.ca). Ces souris transgéniques sont porteuses du gène de la protéine fluorescente jaune (YFP) sous le contrôle du promoteur Thy-1 (Feng et al., 2000). Toutes les procédures chirurgicales sont effectuées sous l'anesthésie générale (2% d'isoflurane à 0,8 L / min) sur des souris âgées de 3 à 7 mois.

II.2. LES PROCÉDURES CHIRURGICALES

II.2.1. LA LÉSION DU NERF OPTIQUE

La blessure axonale (axotomie) des CGRs est induite par une section complète du nerf optique menant à la mort des CGRs par apoptose (Lebrun-Julien et al. 2009, Annexe D). Le nerf optique gauche est sectionné à 0,5-1 mm de la base de l'œil en évitant d'endommager l'artère ophtalmique. L'œil droit est laissé intact (sans lésion) et par conséquent sert comme contrôle. Un examen du fond d'œil est effectué après chaque chirurgie afin de vérifier l'intégrité de la circulation rétinienne. Les animaux dont la circulation sanguine est compromise sont exclus de l'étude.

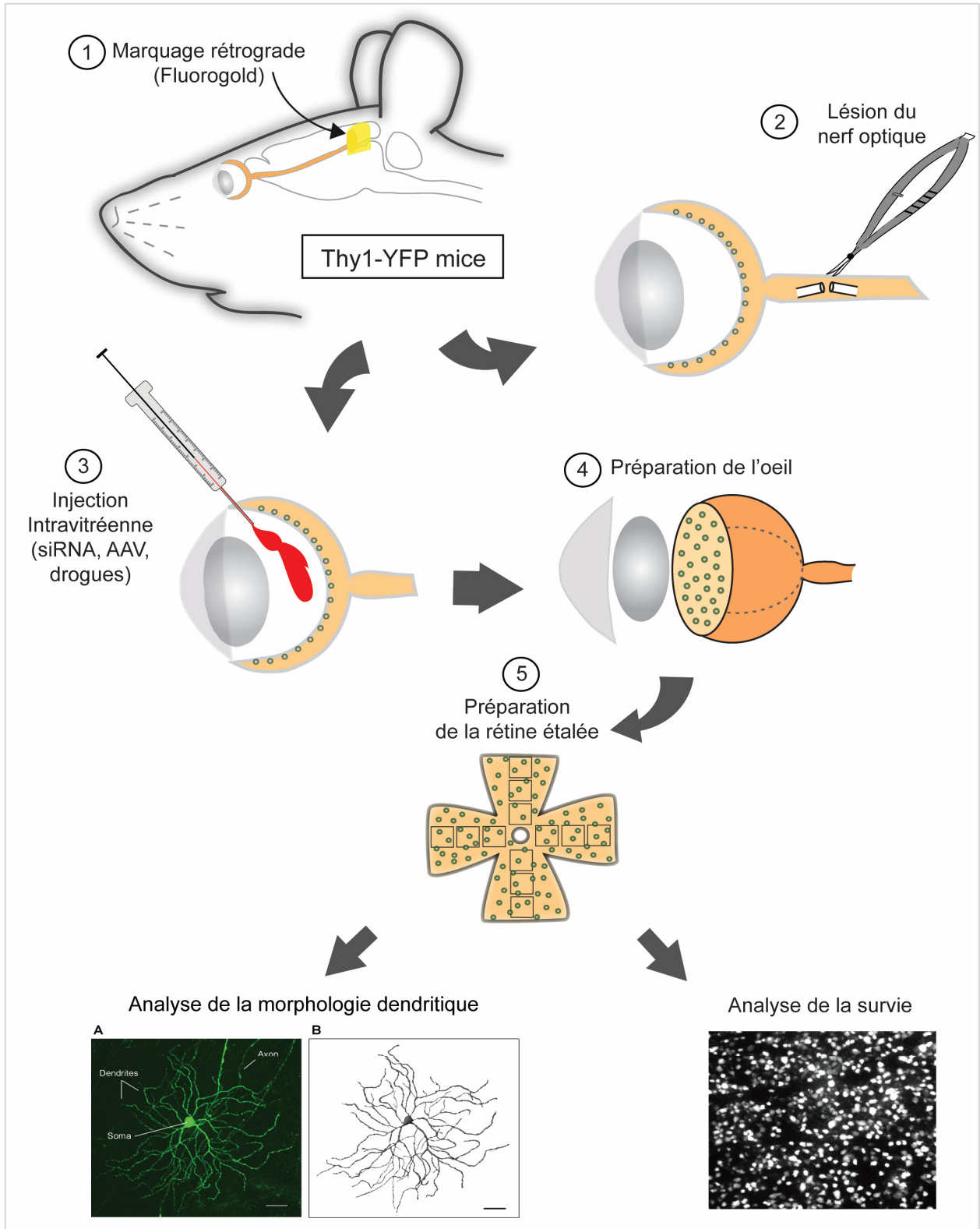


FIGURE 8 : Protocole expérimental d'étude de la morphologie dendritique et de la survie

in vivo. Afin d'étudier la morphologie dendritique des cellules ganglionnaires de la rétine, nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant le YFPH sous le contrôle du promoteur Thy-1 (1). Ces souris sont soumises à deux types de chirurgie, soit la coupure du nerf optique ou l'injection intraoculaire. (2) Puis, le nerf optique est exposé et sectionné à environ 0,5 mm de la rétine tout en évitant d'endommager l'artère ophtalmique. (3) Ensuite, la sclérotique est délicatement percée avec le bout d'une aiguille afin d'injecter les composés d'intérêt dans l'humeur vitrée avec une seringue placée à un angle de 45°. Cet angle d'injection évite toute blessure de l'iris ou du cristallin. (4) Trois (3) jours après la lésion, les souris sont perfusées et la rétine disséquée. (5) Les analyses des dendrites des CGRs se font sur des rétines étalées. Les CGRs exprimant le YFP (A) sont visualisées à l'aide d'un microscope confocal et reconstruites en 3D avec le logiciel Imaris (Bitplane, B). L'analyse de survie neuronale se fait sur des rétines étalées à 3 jours, 5 jours et 7 jours post-lésion. Les CGRs marquées immunologiquement avec le Brn3a, un marqueur spécifique des CGRs, sont visualisées en microscopie à fluorescence sur des rétines étalées. Chez la souris, la quantification se fait sur des grilles placées à 0,25; 0,625 et 1mm de la papille optique. (Image générée par Junie Barbara Morquette).

II.2.2. L'INJECTION INTRA-VITRÉENNE

Cette procédure chirurgicale consiste en une injection au niveau de la cavité vitrénne de l'œil à l'aide d'une seringue Hamilton munie d'une micro-aiguille de verre de 32-gauge. La sclérotique (ou blanc de l'œil) est exposée et la pointe de l'aiguille insérée dans l'hémisphère supérieur oculaire à un angle de 45° par rapport à la sclérotique. Cette voie d'administration permet d'éviter le détachement de la rétine et les blessures des structures de l'œil (l'iris et la lentille) et par ce fait éviter l'induction de mécanisme de survie des CGRs (Mansour-Robaey et al., 1994a, Leon et al., 2000, Fischer et al., 2001). Après l'injection, de la colle chirurgicale (Indermill, soins de santé Tyco, Mansfield, MA, USA) est immédiatement utilisée pour sceller le site d'injection.

Injection des petits ARN interférents (pARNi) : Des petits acides ribonucléiques d'interférents (pARNi) dirigés contre REDD2 et des pARNi contrôles ont été conçus et fournis par Quark Pharmaceuticals Inc. (Division de la recherche, Ness Ziona, Israël). Ces pARNi sont stabilisés par l'ajout du groupement 2'-O-méthyl aux bases d'ARN à différentes positions sur les pARNi (Czuderna et al., 2003) et sont synthétisés par BioSpring GmbH (Francfort, Allemagne). Les séquences des pARNi dirigées contre le REDD2 sont testées avec des résultats similaires (brins sens) : 5'-ACGTGAACTTGGAAATTGA-3', 5'-CCCAGAGAATTGCCCAAGA-3', 5'-TTGGACAGA CAGTTCTCCA-3' . Les pARNi contrôles regroupent des pARNi (siCtl) constitués d'un mélange aléatoire de base dont la séquence est la suivante : 5'-ACTAAATTACGCGCGATGC-3' (brin sens), et d'autres pARNi constitués d'un mélange de séquences aléatoires liées au fluorochrome Cy3 (siCtl-Cy3) dont la séquence est la suivante : 5'-

GUGCCAACCUGAUGCAGCU-3' (brin sens). 2 μ l de pARNi (7 μ g/ μ L) sont injectés peu de temps après la lésion du nerf optique (axotomie) dans cette étude.

Injection du TNF α exogène : Le TNF α exogène (0,2 μ L, murine recombinant TNF α , R&D Systems) ou son véhicule (PBS) sont injectés dans le vitrée des souris YFP ou contrôle.

II.2.3. LE MARQUAGE RÉTROGRADE DES CGRS

Le marquage rétrograde des CGRs consiste en une procédure chirurgicale durant laquelle le FluoroGold 2% (Fluorochrome, Englewood, CO) dans 10% dimethyl sulfoxide est appliqué au niveau des deux collicules supérieurs. Une semaine après l'application, le fluorochrome est visible dans le corps cellulaire des CGRs en vie.

II.3. ÉTUDE DE SURVIE NEURONALE

Les souris sont perfusées avec du paraformaldéhyde à 4% (PFA). Les rétines sont ensuite disséquées et étalées sur une lame de verre, le côté vitré vers le haut. Les CGRs exprimant la YFP sont alors quantifiées dans la rétine étalée des souris YFP. Nous avons aussi confirmé ces données en quantifiant la densité des CGRs sur des rétines étalées de souris sauvages marquées avec le Brn3a (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) et le fluorogold tel que déjà décrit précédemment (Lebrun-Julien et al., 2009, Nadal-Nicolás et al., 2009). Les CGRs sont alors analysées dans 3 régions carrées à des distances de 0,25, 0,625 et 1 mm de la papille optique, ceci dans chacun des quatre quadrants de la rétine étalée et pour un total de 12 régions par rétine (Figure 8). La fluorescence des somas est examinée avec un microscope Zeiss Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC). Les images sont prises avec une caméra vidéo CCD (Retiga,

QImaging, Burnaby, Colombie-Britannique) et analysées avec le logiciel Eclipse du Nord (Empix Imaging, Mississauga, ON).

II.4. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA RÉTINE

Marquage sur des rétines étalées : Les souris sont perfusées avec 4% de PFA, les yeux sont prélevés et les rétines soigneusement disséquées. L'immunomarquage est fait sur des rétines flottantes. La procédure consiste à les mettre durant 30 minutes dans une solution de blocage : 10% sérum normal d'âne (NGS), 2% de Triton X-100, et 0,5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans un tampon phosphate (PBS). Les rétines sont ensuite incubées pendant 72 heures à 4 °C dans une solution de blocage (2% de NGS, 2% de Triton X-100, 0,5% de DMSO) contenant chacun les anticorps primaires suivants : SMI-32 (NF-H, 10 pg / mL, Sternberger Monoclonals, MD, USA), la GFP (4 ng / mL, Sigma-Aldrich, Oakville, ON), ou Brn3a (0,3 pg / mL, Santa Cruz Biotechnologies). Les rétines sont ensuite lavées et incubées avec des anticorps secondaires anti-souris : Alexa Fluor 594 (2 pg / mL, Molecular Probes, Eugene, OR), anti-lapin FITC (1:1000, Sigma-Aldrich), ou anti-chèvre Alexa Fluor 594 (2 pg / mL, Molecular Probes). Les rétines sont lavées et montées sur des lames de verre avec le côté de la couche de cellules de la rétine vers le haut. La visualisation est faite en utilisant un microscope à fluorescence (Zeiss Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss, Canada).

Marquage sur des coupes transversales de rétine : Les animaux sont perfusés avec du paraformaldéhyde à 4% et les coupes transversales de rétine (cryosection) sont préparées à des dimensions de 16 µm d'épaisseur. Quelques coupes sont préparées à partir de rétine provenant d'œil marqué préalablement avec le marqueur rétrograde, le Fluorogold. Les anticorps primaires

cités ci-dessous ont été rajoutés dans la solution de blocage (3% bovine sérum albumine, 0,3% Triton X-100) et incubés durant la nuit à 4°C : phospho-S6 (Ser 240/244, 1:200, Cell Signaling Technology, Boston, MA), β III-tubuline (TUJ1, 1:400, Sigma-Aldrich), calbindin (1:200, Swant, Marly, Switzerland), REDD2 (5 μ g/mL, Biorbyt, San Francisco, CA) or Brn3a (1 μ g/mL, Santa Cruz Biotechnologies). Les anticorps secondaires utilisés sont : anti-lapin Cy3 (1,5 μ g/mL, Sigma-Aldrich), anti-souris FITC (1:1000, Sigma-Aldrich), anti-lapin Alexa Fluor 594 (2 μ g/mL, Molecular Probes), or anti-chèvre Alexa Fluor 488 (2 μ g/mL, Molecular Probes). Le marquage fluorescent est observé à l'aide du Zeiss AxioSkop 2 Plus (Carl Zeiss Canada).

II.5. ANALYSE DE L'ARCHITECTURE DES DENDRITES ET DU SOMA

L'acquisition et la reconstruction des arbres dendritiques ont été faites en aveugle. Des images de hautes résolutions de CGRs exprimant le YFP sont prises à l'aide d'un microscope confocal Leica SP1 (Leica Microsystems Inc., Concord, ON). Des scannes sont prises à 0,48 à 0,65 μ m d'intervalles dans l'axe des z (x et y = 1024 X 1024 pixels) avec en moyenne 4 à 6 images par plan focal). La reconstruction en 3D de l'arbre dendritique est faite à l'aide du module *filament tracing* du logiciel Imaris (Bitplane, South Windsor, CT). Les paramètres ci-dessous sont mesurés et analysés :

- i) La longueur dendritique totale : la somme de la longueur de tous les dendrites par neurone ;
- ii) l'aire dendritique, soit : l'aire comprise dans le contour de l'arbre crée par une ligne qui rejoint les terminaisons des dendrites ;

- iii) l'ordre des dendrites, soit : le nombre de fois que les branches se divisent, commençant par l'ordre 1 qui correspond à la branche dite primaire qui émerge du soma ;
- iv) l'analyse de sholl, soit : le nombre de fois que les dendrites d'un neurone croisent des cercles concentriques dont la distance augmente de 10 μm d'intervalle à partir du soma ;
- v) les dimensions du soma soit : aire comprise dans le contour tracé en suivant la forme du soma de la CGR.

II.6. L'ADMINISTRATION DE LA RAPAMYCINE

La rapamycine (sirolimus), un inhibiteur sélectif de mTOR (Corradetti et al., 2005). Elle a été obtenue auprès des laboratoires LC et dissoute à 25 mg / mL dans l'éthanol. Avant chaque administration, la rapamycine est diluée à 5% de Tween 80, 5% de polyéthylène glycol 400 (0,5 à 1,5 mg / mL). Elle est administrée par voie intra péritonéale à 6 mg / kg tous les 2 jours, une concentration qui permet d'inhiber complètement l'activité de la protéine kinase mTOR pendant 60 heures (Meikle et al., 2008).

II.7. ANALYSE DES IMMUNO-BUWARDAGES (WESTERN BLOTS)

Des rétines fraîches sont rapidement prélevées et homogénéisées à l'aide d'un pilon électrique (Kontes, Vineland, NJ) dans du tampon de lyse froid (20 mM Tris pH 8,0, 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, et 10% glycérol incluant un inhibiteur de protéase). Les homogénats de protéines sont centrifugés à 10,000 rpm pour 50 minutes et les surnageants sont enlevés et resédimentés pour obtenir des extraits solubles. Les extraits de rétine sont récupérés

sur des gels de polyacrylamide SDS et transférés sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON). Les membranes sont alors incubées pour la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivant : REDD2 (0,5 µg/mL, Fitzgerald, Acton, MA), REDD1 (4 µg/mL, Proteintech, Chicago, IL), or β-actine (0,5 µg/mL; Sigma-Aldrich). Les membranes sont ensuite incubées avec des anticorps secondaires, anti-lapin ou anti-souris, liés aux peroxydases (0,5 µg/mL, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Puis elles sont développées à l'aide de réactifs (ECL, Amersham Biosciences) et exposés à des films X-OMAT (Eastman Kodak, Rochester, NY). L'analyse densitométrique est performée à l'aide du logiciel d'image Scion (Scion Corporation, Frederick, MD) à partir de film auto-radiographique provenant d'une série de 3 immuno-buvarpages indépendants et chacun fait à partir d'échantillons de rétines provenant de groupes expérimentaux distincts.

II.8. ÉLECTROPHYSIOLOGIE

Les expériences d'enregistrement en mode "cellule entière" ont été faites sur des préparations de rétines isolées provenant de souris YFPH comme précédemment décrite (Schmidt, 2011). Brièvement, les animaux sont anesthésiés avec de l'isoflurane et ensuite décapités. L'euthanasie et la dissection sont effectuées à la lumière ambiante. Par la suite, l'œil est isolé, la rétine rapidement extraite et placée dans une solution Ames (Sigma-Aldrich) et gardée dans l'obscurité. L'humeur vitrée est alors doucement enlevée avant le traitement de la préparation avec une combinaison de collogénase/hyaluronidase (240 et 1,000 U/mL, respectivement, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) durant 5 à 10 minutes, à température ambiante. Ensuite, les rétines sont placées avec l'humeur vitrée vers le haut sous le microscope et elles sont perfusées avec une solution Ames oxygéné (95% O₂, 5% CO₂) à température pièce.

Les CGRs exprimant le YFP sont visualisées sur un écran connecté à une caméra infrarouge CCD, couplé à un microscope à épifluorescence. Le microscope confocal utilisé est un Olympus FluoView FV 1000 équipé d'un objectif à immersion de 40X. Les enregistrements sont faits en utilisant un amplificateur Multiclamp 700A contrôlé par ordinateur et un numériseur Digidata 1322A (Axon Instruments, Downingtown, PA, USA). Les électrodes d'enregistrement (résistance 5-7 M Ω) sont tirées à partir de capillaires de borosilicate (1,5 mm OD, 1,12 mm ID; World Precision Instruments, Sarasota, FL) sur une étireuse Sutter P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA). La solution intra pipette contient : 140 mM K-gluconate, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0,5 mM EGTA, Tris 2 mM ATP, Tris 0,4 mM GTP, et l'Alexa Fluor 594 (15-30 μ M, Molecular Probes), pH 7,2-7,3, 280-300 mOsmol/kg. Pendant les enregistrements, des pulses de courant de -250 pA à 350 pA sont injectés afin de caractériser les propriétés membranaires intrinsèques des CGRs. Un laser argon (488 nm) est utilisé en mode balayage linéaire afin de produire un stimulus ayant une vitesse de 4 μ s/pixel. L'analyse des données est faite en utilisant P-clamp 8 or 9 (Axon Instruments, Downingtown, PA, USA).

II.9. ANALYSE STATISTIQUE

Les données sont analysées avec le logiciel GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Nous utilisons les tests d'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivi par des tests post-hoc Bonferroni ou Dunnett ou des tests t de Student, là ou approprié.

CHAPITRE 3

III. RÉSULTATS

Les résultats de la première étude de ce chapitre proviennent de l'article dont je suis première auteure, récemment publié dans le journal scientifique «Cell Death and Differentiation» du *Nature publishing group*. Cette étude représente l'essentiel de cette thèse et est une traduction de l'article original qui se trouve dans l'Annexe A. Dans cette section, vous trouverez aussi les résultats d'une deuxième étude non publiée.

III.1. PREMIÈRE ÉTUDE

III.1.1. RÉSUMÉ

Les altérations dendritiques ont lieu dans les maladies neurodégénératives accompagnant les axonopathies. Cependant, les mécanismes qui régulent ces changements sont encore méconnus. L'objectif de cette étude est d'étudier les changements morphologiques survenant dans les CGRs adultes axotomisées *in vivo* et d'établir les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le but d'induire une neuroprotection structurelle et fonctionnelle de ces neurones. En utilisant des souris YFP-H soumises à une axotomie du nerf optique, nous avons démontré une rétraction précoce de l'arbre dendritique des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) et une réduction sélective de la protéine kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR), avant la mort neuronale. La lésion axonale a aussi engendré une augmentation rapide de la protéine *Regulated in development and DNA damage response 2* (REDD2), un puissant inhibiteur de mTOR. Un knock-down de la protéine REDD2 à l'aide de petits ARN d'interférence restaure l'activité de la protéine mTOR et rétablit la longueur, l'aire et la complexité des branches dendritiques. De plus, cette restauration s'est avérée dépendante de la rapamycine confirmant la spécificité de la protéine mTOR. Des enregistrements électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence que l'inhibition de REDD2 entraînant une augmentation de l'activité de mTOR dans les CGRs restaure les propriétés extrinsèques, c'est-à-dire la réponse des CGRs à la lumière. Enfin, nous avons montré que l'activité de mTOR dépendante de REDD2 a permis une prolongation de la survie des CGRs axotomisées. Ces résultats montrent que la protéine induite par le stress, la REDD2, lorsque surrégulée induit

l'inhibition de mTOR ainsi que la pathologie dendritique entraînant le dysfonctionnement neuronal et la mort neuronale.

III.1.2. CARACTÉRISATION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Afin d'investiguer si des altérations dendritiques ont lieu très tôt après une lésion axonale, et donc avant le début de la mort neuronale dans la rétine, nous avons caractérisé et établi notre modèle expérimental. Pour cela nous avons i) établi la meilleure stratégie pour visualiser, analyser et quantifier les dendrites des CGRs dans la rétine et ii) établi le patron de mort des CGRs après une lésion axonale. Les CGRs sont présentes dans la rétine en fortes densités de telle manière qu'un marquage contre la MAP-2, une protéine dendritique, démontre un enchevêtrement des arbres dendritiques de CGRs adjacentes. De tous les techniques et modèles testés, l'utilisation de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente jaune (Yellow Fluorescent Protein, YFP) sous le contrôle du promoteur Thy-1 dans les CGRs (Feng 2000) s'est révélée la meilleure. Chez ces souris, seulement 1% des CGRs expriment la protéine fluorescente, ce qui permet la visualisation complète de l'arbre dendritique d'une CGR à la fois sans enchevêtrement avec les branches dendritiques de neurones avoisinants (Annexe B, figure 1).

Ensuite, afin de déterminer le patron de mort des CGRs lésées, des souris transgéniques YFP-H sont soumises à une axotomie au niveau de l'œil gauche. La figure 9 montre qu'à 3 jours après la coupure du nerf optique, l'intensité ou le nombre de CGRs exprimant la YFP ne diminue pas en comparaison aux CGRs intactes (lésées : 63 ± 4 CGR ; intactes : 44 ± 3 CGR, moyenne \pm S.E.M., ANOVA $p > 0,05$; Tableau 1), alors qu'à 5 jours post-axotomie on compte 35 % de morts de soma dans la population des CGRs (lésées : 44 ± 3 CGR, ANOVA, $p > 0,001$).

Ce patron de dégénérescence a été confirmé dans les souris de type sauvage avec un marqueur spécifique pour les CGRs, le Brn3a (Figure 9b; Galindo-Romero et al., 2011). Par conséquent, l'analyse de l'arbre dendritique se fait à 3 jours post-lésion, à un moment où le patron de mort neuronale n'a pas encore commencé dans la rétine ou l'intensité et le nombre de CGRs positives pour le YFP n'ont pas changé.

III.1.3. ÉTUDES DES CHANGEMENTS DENDRITIQUES PRÉCOCES DES CGRS LÉSÉES

Dans la rétine de souris, quatorze types de CGRs ont été identifiés en se basant sur leur patron dendritique et l'expression de marqueurs moléculaires distincts. Le neurofilament H (NF-H, SMI-32) est le seul marqueur moléculaire connu capable d'identifier 4 sous-types de CGRs (Sun et al., 2002b, Coombs et al., 2006). Aussi, ces CGRs exprimant le NF-H comptent pour une proportion substantielle de la population des CGRs, soit 36% (1213 ± 101 CGR/mm²). Les CGRs co-exprimant les YFP et NF-H sont photographiées et reconstruites en 3D. Les CGRs situées dans toute la rétine c'est-à-dire au centre et à la périphérie sont incluses dans l'analyse et les mesures sont faites en aveugle. Les CGRs co-exprimant la YFP et le NF-H ont des arbres dendritiques moyens à larges ne contenant pas d'épine dendritique (Figure 9c-e). Après lésion, les arbres dendritiques des CGRs sont plus petits que ceux des CGRs de rétines intactes (Figure 9f, g). L'analyse de la longueur dendritique totale et de l'aire dendritique démontre une réduction de 15% ($3707 \mu\text{m}$) et 25% ($112 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) respectivement en comparaison aux CGR contrôles (longueur : $4320 \mu\text{m}$, aire : $150 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) (Figure 9h, i, Tableau 1 & 2). L'analyse de Sholl, qui se définit comme la mesure du nombre d'intersections que font les dendrites avec des cercles concentriques placés à des distances qui augmentent de $10 \mu\text{m}$ à partir du centre de la cellule, montre un déplacement de la courbe vers la gauche indiquant une réduction de la

complexité des neurones axotomisés (Figure 9j, Table 2). Ces résultats démontrent que la rétraction des CGRs commence très tôt après la lésion et ceci avant que la mort neuronale ne commence dans la rétine.

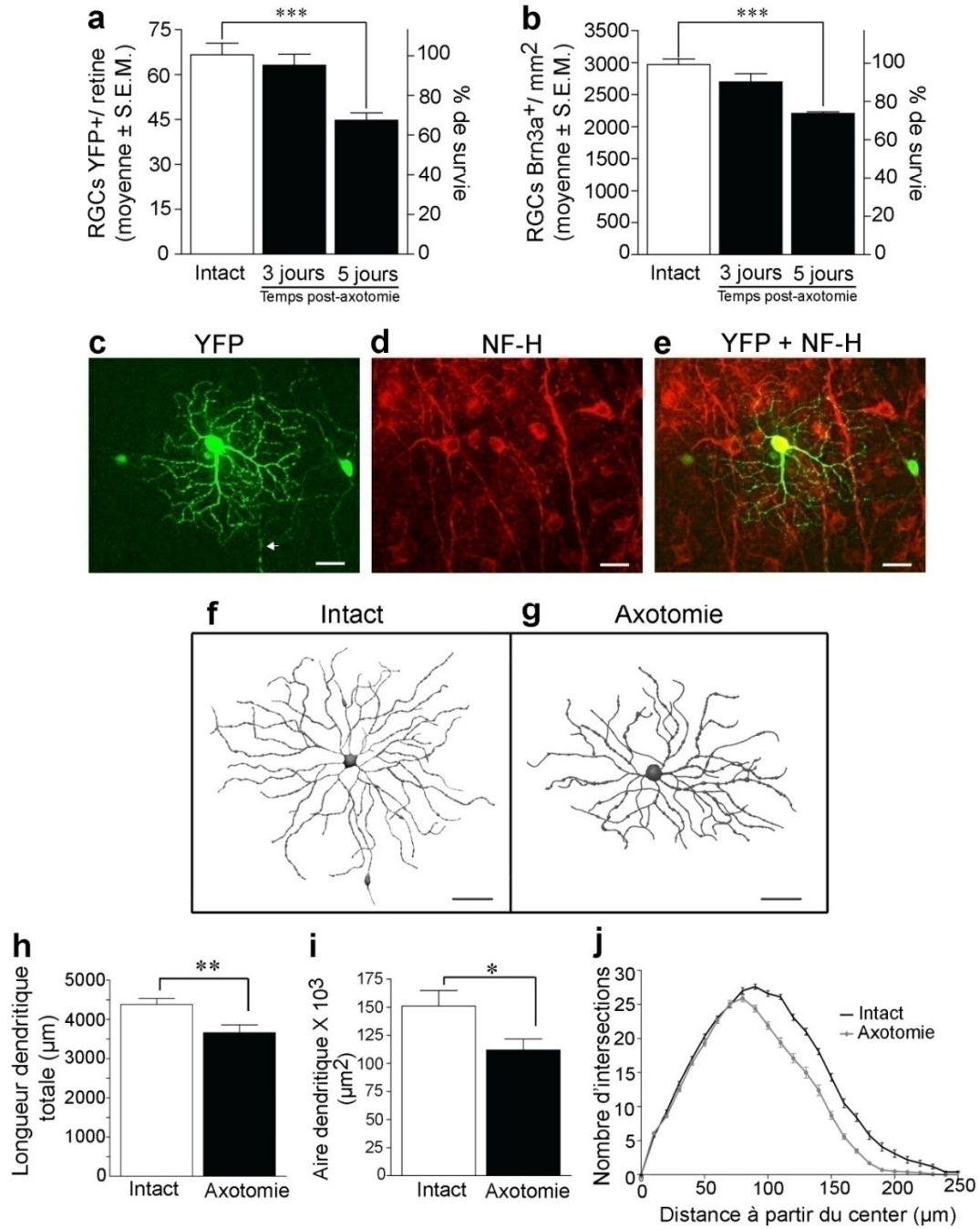


FIGURE 9. L'arbre dendritique des CGRs rétrécissement très tôt après une lésion

axonale et avant la mort neuronale. (a) L'analyse quantitative de la densité des CGRs ne montre aucun changement 3 jours après axotomie pour les CGRs exprimant le YFP; alors qu'une perte significative de CGRs est observée à 5 jours après la lésion (axotomie 3 jours : n=7; axotomie 5 jours : n=4). (b) Une courbe similaire de la mort des CGRs axotomisées est observée avec l'utilisation du Brn3a, un marqueur spécifique des CGRs, dans des souris sauvages (n=3). La densité des cellules ganglionnaires dans la rétine intacte est montrée ici en guise de référence (n=11). Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (ANOVA, ***P<0,001; n=3–11 souris par groupe). (c–e) Les CGRs exprimant le YFP qui co-localisent avec le marquage NF-H et dont les axones (flèches) sont clairement identifiables sont acquises en microscopie confocale et reconstruites Échelle : 25 μ m. (f et g) 3 jours après l'axotomie les CGRs avaient un arbre dendritique plus petit que celui des CGRs de rétines intactes (axotomie : n=21 cellules; intact : n=17 cellules). L'analyse quantitative des paramètres dendritiques montre une diminution significative de la longueur dendritique totale (h), de l'aire dendritique (i) et de la complexité de l'arbre dendritique (j, Analyse de Sholl). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (Test t de Student, **P<0,005; *P<0,05; les cellules analysées proviennent de 5 souris par groupe).

III.1.4. PERTE SÉLECTIVE DE L'ACTIVITÉ DE mTOR DANS LES CGRS

Comme décrit précédemment, la protéine kinase mTOR interagit avec des partenaires intracellulaires afin de réguler plusieurs événements cellulaires. Parmi ces derniers, un des mieux caractérisés est la synthèse protéique. En effet, la protéine mTOR phosphoryle la protéine p70S6K qui entraîne à son tour la phosphorylation de la protéine ribosomale S6. Cette dernière stimule le taux de traduction des ARNm (Jefferies et al., 1997). Des anticorps capables de reconnaître la S6 phosphorylée (pS6) sont très utilisés comme indicateurs de l'activité de mTOR (Ikenoue et al., 2009). Ainsi, afin d'établir si la rétraction dendritique observée corrèle avec des changements de l'activité de mTOR dans les CGRs, nous avons examiné l'expression de la phospho-S6^(ser240/244) (pS6) dans des rétines de souris intactes et axotomisées. Le marquage du pS6 est prédominant dans deux populations de la rétine, dont l'une est située dans la couche de cellule ganglionnaire (CCG) et l'autre dans la couche nucléaire interne (CNI) (Figure 10a). Le double marquage de pS6 avec l'anticorps contre la β III tubuline (TUJ1), un marqueur sélectif des CGRs (Cui et al., 2003, Yin et al., 2003) démontre la présence de l'activité de mTOR dans le soma et dendrites des CGRs (Figure 10b-i). Le marquage de pS6 dans la CNI co-localise avec la calbindin qui est une protéine de liaison du calcium, un marqueur des cellules horizontales (Figure 10j-l).

Par ailleurs, nous avons constaté une réduction de l'activité de pS6 dans les CGRs 3 jours après l'axotomie, ceci avant le début de patron de mort des CGRs. Parallèlement, l'expression de pS6 dans les cellules horizontales ne change pas (Figure 10m, n). Le co-marquage des rétines axotomisées avec la pS6 et le TUJ1 a permis de confirmer que la diminution de l'expression de pS6 est due à une perte de pS6 dans les CGRs et non à la mort

de ces neurones en soit (Figure 10o-q). La quantification des CGRs qui expriment la pS6 et le TUJ-1 par rapport à celles qui expriment seulement le TUJ-1 démontre que 50% des CGRs de la rétine adulte expriment un niveau de mTOR détectable (Figure 10r, Tableau 1). Aussi, la coupure du nerf optique entraîne une diminution de 40% des CGRs qui expriment la pS6 (Figure 10r). Par contre, l'expression de pS6 conjointement à la calbindin ne change pas avec l'axotomie (Figure 10s). Ces résultats suggèrent que la lésion sélective des axones des CGRs entraîne une diminution de l'activité de la protéine kinase mTOR dans les CGRs mais pas dans d'autres types cellulaires.

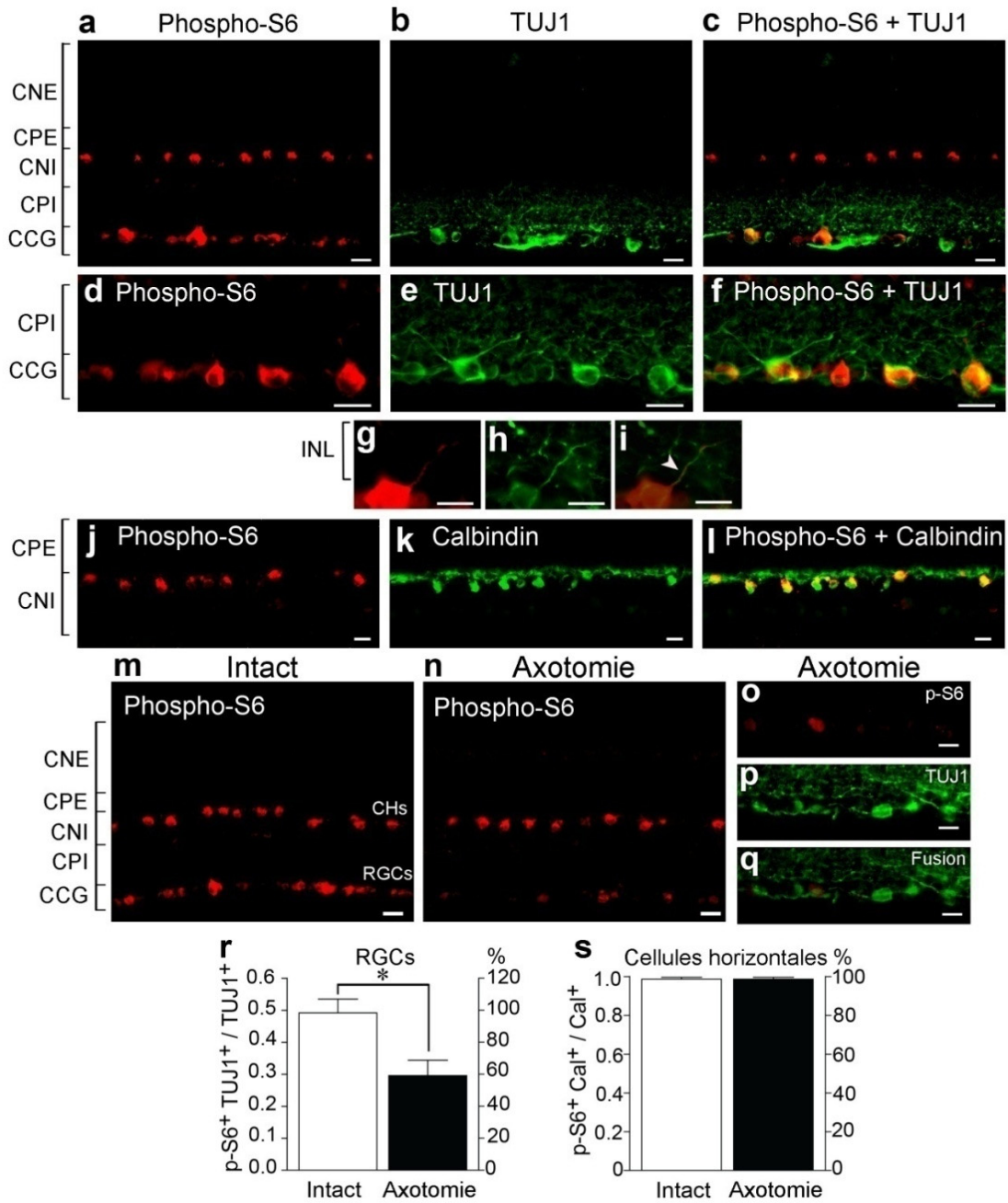


FIGURE 10. L'activité de mTOR diminue dans les CGRs lésés. (a) Le marquage du phospho-S6 est détecté dans les neurones de la CNI et la CCG. (b-i) Le co-marquage de phospho-S6 avec TUJ1, un marqueur spécifique des CGRs, révèle la présence de l'activité de mTOR dans le soma des CGRs ainsi que dans leurs dendrites (flèche, i). (j-l) Dans la CNI, la phospho-S6 co-localise avec la protéine de liaison du calcium appelé calbindin, un marqueur des cellules horizontales. (m et n) Une perte de phospho-S6 a lieu 3 jours après axotomie dans les CGRs, alors que dans les cellules horizontales, l'expression de phospho-S6 ne change pas, ceci avant le début de mort neuronale. (o-q) La diminution de l'expression de phospho-S6 dans la CCG reflète une perte de l'activité de mTOR dans les CGRs et non la mort de ces neurones puisque les CGRs sont encore perceptibles avec le TUJ1. (r) Le nombre des CGRs qui expriment les deux marqueurs phospho-S6 et TUJ1 par rapport à toutes les cellules CGRs qui expriment le TUJ1 diminue après lésion. (s) Parallèlement, le nombre de cellules horizontales qui expriment phospho-S6 et calbindin ne change pas avec l'axotomie. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (Test t de Student : *P<0,05; n=3 - 4 souris par groupe). Échelle : (a-l et o-q) = 25 μ m et (m et n) =50 μ m. CNE, couche nucléaire externe; CPE, couche plexiforme externe; CNI, couche nucléaire interne; CPI, couche plexiforme interne; CCG, couche de cellules ganglionnaires.

III.1.5. LA REDD2 EST SURRÉGULÉE DANS LES CGRS LÉSÉES.

L'inhibition de mTOR durant le stress a lieu par la stabilisation et/ou l'activation du complexe TSC1/TSC2. REDD1 et REDD2 inhibent l'activité de mTOR en agissant sur TSC2, la libérant de son association avec des facteurs les inhibant. Ces derniers agissent pour stabiliser l'interaction entre le TSC1 et TSC2 (DeYoung et al., 2008). Afin de tester l'hypothèse que la REDD2 pourrait être impliquée dans l'inhibition de l'activité de mTOR, nous avons premièrement examiné l'expression de REDD2 dans des rétines intactes et axotomisées. Alors qu'un faible niveau de REDD2 est détecté dans les CGRs des rétines intactes, un fort marquage de REDD2 a été observé dans des rétines 3 jours après axotomie (Figure 11a, b). Le co-marquage de REDD2 avec le Brn3a, un marqueur sélectif des CGRs, démontre que l'expression de REDD2 augmente dans les CGRs lésés (Figure 11c-e). Nous avons aussi observé l'expression de REDD2 dans la couche plexiforme externe (CPE) où elle colocalise avec les dendrites des cellules horizontales marquées avec le calbindin (Figure 11a, f-h). Cependant, aucun changement dans l'expression de REDD2 n'est détecté dans les dendrites des cellules horizontales après les lésions axonales (Figure 11b, f-h). Par ailleurs, la REDD1, un membre de la famille de REDD2 avec laquelle elle partage 38% d'homologie (Shoshani et al., 2002, Reiling and Hafen, 2004), est aussi observée dans la CCG (Figure 11i). Un co-marquage avec un marqueur des CGRs, le Brn3a, a permis de confirmer que la REDD1 est exprimée par les CGRs (Figure 11j-l), comme reporté préalablement (Del Olmo-Aguado et al., 2013). L'augmentation de l'expression de la REDD2 dans les CGRs lésés a été confirmée par l'analyse d'immunobuvardage d'homogénats de rétines à 48h post-lésion (Figure 11m, n). Par

contre, l'expression de la REDD1 ne change pas suite à l'axotomie (Figure 11m, o). Ainsi, ces résultats démontrent une augmentation sélective de REDD2 dans les CGRs suite à une lésion.

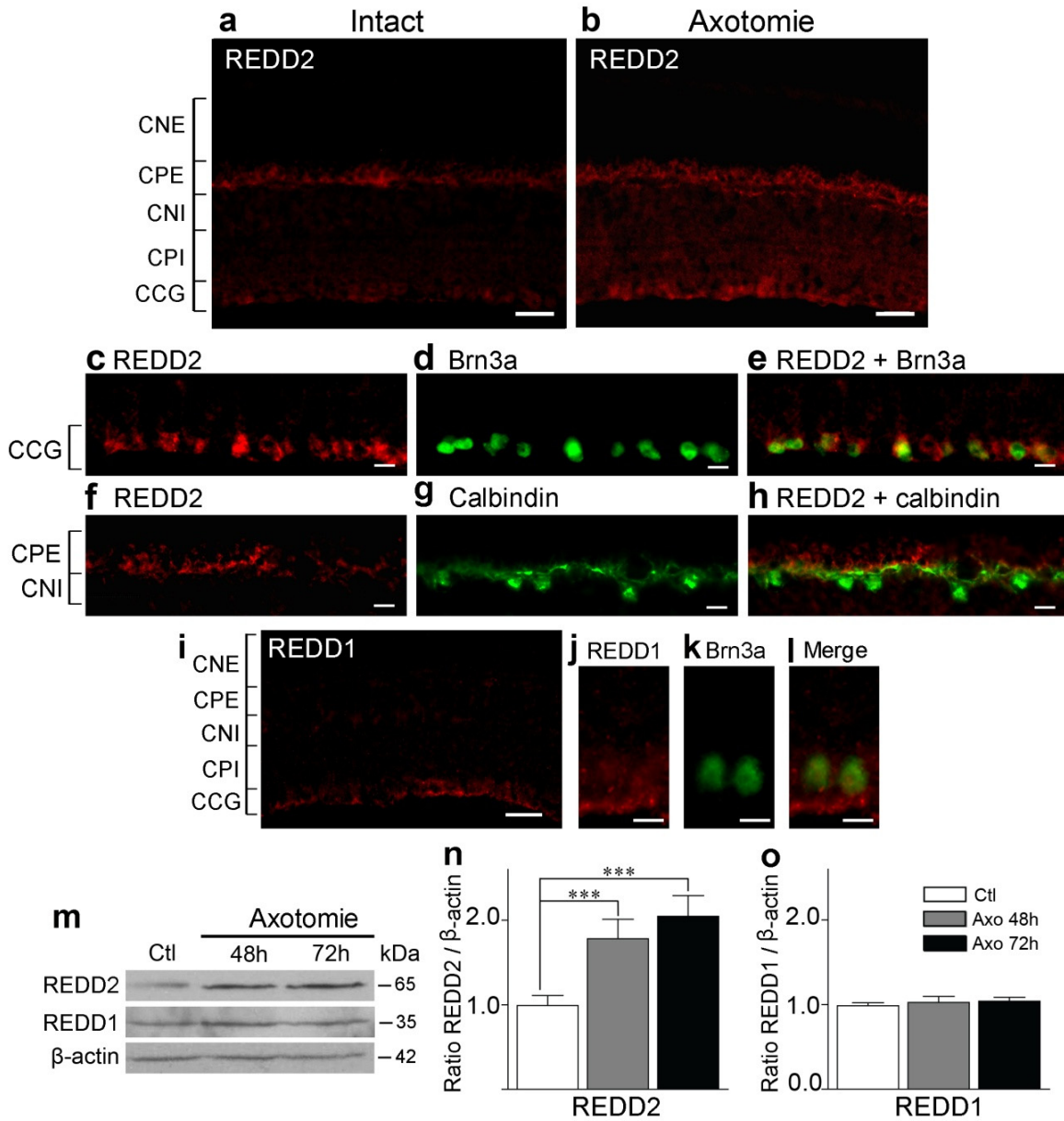


FIGURE 11. Surexpression de REDD2 dans les CGRs lésés. (a) Un niveau d'expression basale de REDD2 est détecté dans la CCG dans des rétines non lésées. (b) Par contre, une augmentation significative du marquage de REDD2 est visible 3 jours après axotomie. (c–e) La co-localisation de REDD2 avec Brn3a démontre que l'augmentation de REDD2 est dans les CGRs lésés. (a et f–h) L'expression de la protéine REDD2 dans la CPE co-localise avec les dendrites proximales des cellules horizontales identifiées ici avec la calbindin. (i–l) Le membre de la même famille, REDD1 est aussi exprimé dans la CCG de manière sélective. Un co-marquage avec le Brn3a a permis de confirmer son expression par les CGRs. (m–o) Les immunobuvardages ainsi que les analyses densitométriques ont démontré une augmentation de l'expression de REDD2 dès les premières 48h après la lésion, alors que l'expression de REDD1 demeure inchangée. Le panneau inférieur montré comme référence est le même blot traité avec un anticorps contre la β -actine pour confirmer le chargement égal de protéine. Axo 48 h, Axo 72 h : analyses réalisées à 48 et 72 h, respectivement après axotomie. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (ANOVA, ***P<0,001; n=3–5 souris par groupe). Échelle : (a et b)=50 μ m et (c–h)=25 μ m. CNE, couche nucléaire externe; CPE, couche plexiforme externe; CNI, couche nucléaire interne; CPI, couche plexiforme interne; CCG, couche de cellules ganglionnaires.

III.1.6. UNE INHIBITION SÉLECTIVE DE REDD2 RESTAURE L'ACTIVITÉ DE MTOR

Afin de déterminer si une augmentation de REDD2 est impliquée dans la diminution de l'activité de mTOR dans les CGRs, nous avons cherché à réduire l'expression de la REDD2 en utilisant un petit ARN interférent (pARNi) suivi par l'analyse de la pS6. Tout d'abord, afin de vérifier l'efficacité de notre méthode, nous avons examiné si des pARNi introduits de manière intraoculaire pouvaient être incorporés par les CGRs chez la souris. Une injection de pARNi contrôle liée au Cy3 (siCtl-Cy3) entraîne un marquage de CGRs visible dès 3 heures après administration (Figure 12a). En effet, la co-localisation du Cy3 avec un traceur rétrograde des CGRs, le fluorogold (FG) appliqué sur le collicule supérieur, nous a permis de confirmer que les pARNi sont rapidement incorporés par les CGRs (Figure 12b-d).

Ensuite, nous voulions déterminer si un pARNi dirigé contre la REDD2 (siREDD2) pourrait inhiber l'expression de la REDD2 *in vivo*. L'analyse des immunobuvardages des homogénats de rétines provenant de yeux traités avec le siREDD2 au moment de l'axotomie, indique une diminution significative de l'expression de REDD2 dans les rétines traitées. Cependant, l'injection du pARNi contrôle (siCtl) n'a pas d'effet (Figure 12e, f). Aussi, il faut noter que le siREDD2 n'a eu aucun effet sur l'expression de la protéine REDD1, ce qui valide la spécificité de pARNi (Figure 12e, g). Des marquages immunologiques de rétines axotomisées confirment que la réduction de REDD2 a lieu dans les CGRs, marquées ici avec le Brn3a, traitées avec le siREDD2 mais pas avec le siCtl (Figure 12h-m). Dans ces expériences, les CGRs sont marquées avec le Brn3a.

Nous avons ensuite investigué si l'inhibition de REDD2 par l'utilisation du pARNi pouvait restaurer l'activité de mTOR. Nos résultats démontrent que, dans des rétines

axotomisées traitées avec le siREDD2, le nombre de CGRs exprimant le pS6 était considérable par rapport à celles traitées avec le siCtl (Figure 12n, o). L'analyse quantitative démontre une augmentation de 45% du nombre de CGRs axotomisées exprimant le pS6 lorsqu'en présence du siREDD2 en comparaison avec les rétines contrôles (Figure 12p, Tableau 1), alors que le nombre de cellules horizontales exprimant le pS6 n'a pas changé (Figure 12q). Ces résultats démontrent que l'inhibition du REDD2 augmente l'activité de la protéine kinase mTOR dans les CGRs lésées, et suggèrent que l'augmentation de REDD2 induite par l'axotomie entraîne la perte de la fonction de mTOR dans ces neurones.

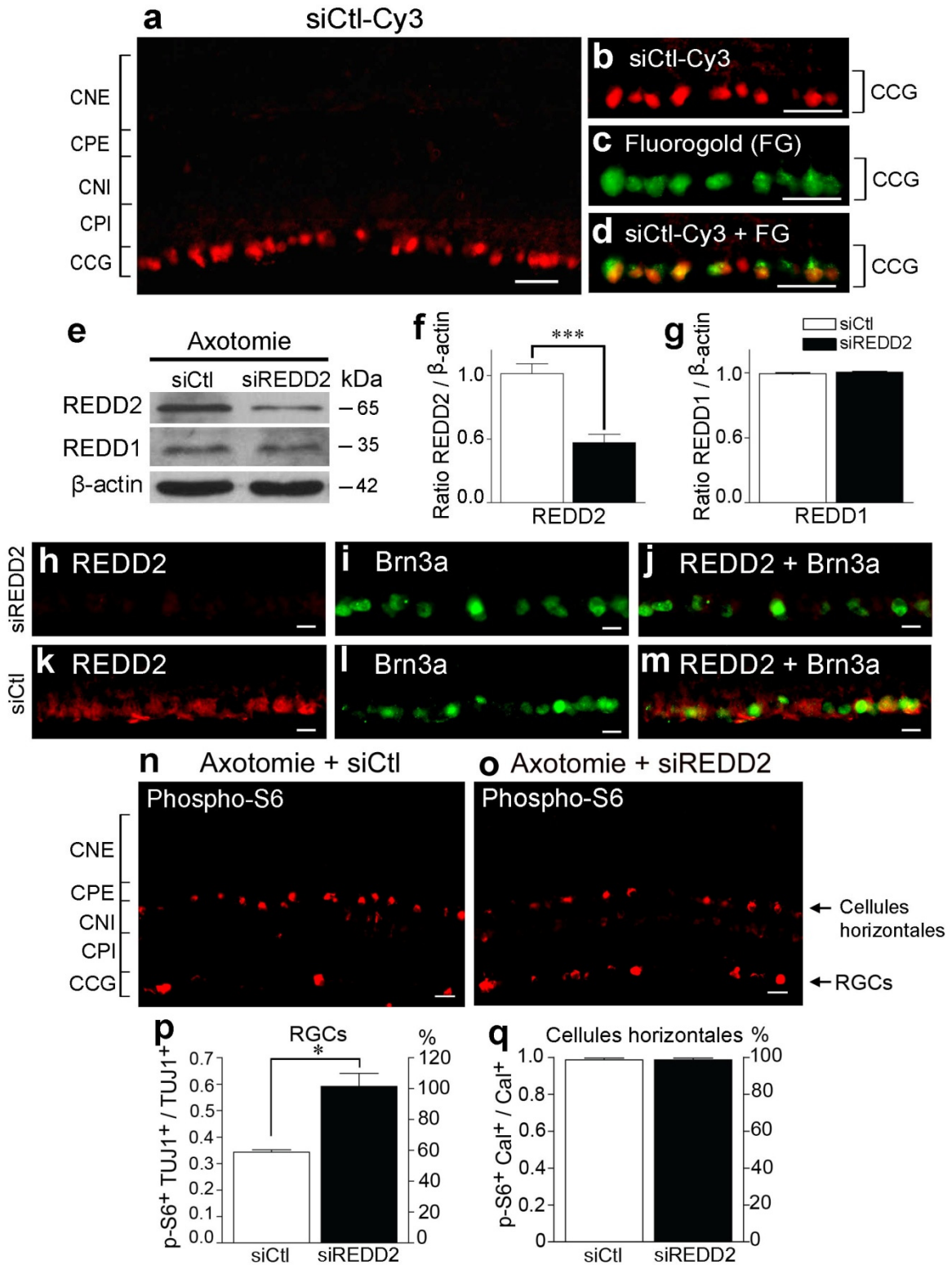


FIGURE 12. Le REDD2 knockdown de REDD2 restaure l'activité de mTOR. (a–d)

L'administration intravitreuse du siCtl-Cy3 résulte en son incorporation rapide et efficace dans les CGRs, marquées ici avec le Fluorogold (FG). (e et f) Des immunobuvardages et leurs analyses densitométriques montrent que l'injection du pARNi contre la REDD2 (siREDD2) engendre une réduction de la REDD2 dans la rétine, alors que la siCtl n'a aucun effet sur l'expression de REDD2 rétinienne (Test t de Student, ***P<0,01; n=4–5 souris par groupe). (e et g) La siREDD2 n'a ni diminué ni augmenté l'expression protéique de la siREDD1, confirmant ainsi la spécificité du pARNi. Le panneau inférieur montré ici comme référence est la même membrane blot traitée avec un anticorps contre la β -actine pour confirmer le chargement égal de protéine. (h–j) Le knock-down du REDD2 à l'aide du siREDD2 a lieu dans les CGRs, visualisées ici avec le Brn3a, mais pas dans les rétines traitées avec le siCtl (k–m). (n et o) Les rétines axotomisées traitées avec le siREDD2 montrent plus de CGRs exprimant la phospho-S6 comparativement aux rétines traitées avec le siCtl. (p) L'analyse quantitative démontre une augmentation du nombre de CGRs (positives pour le TUJ1) exprimant la phospho-S6 de 45% en présence de siREDD2 comparativement à la rétine contrôle. Le nombre de cellules horizontales exprimant la phospho-S6 n'a pas changé (q). Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (Test t de Student, *P<0,05; n=4 souris par groupe). Échelle : (a–d)=50 μ m; (h–o)=25 μ m. CNE, couche nucléaire externe; CPE, couche plexiforme externe; CNI, couche nucléaire interne; CPI, couche plexiforme interne; CCG, couche de cellules ganglionnaires.

III.1.7. L'ACTIVITÉ DE mTOR RESTAURE L'ARBRE DENDRITIQUE

Nous voulions savoir si l'augmentation de l'activité de la protéine kinase mTOR induite par le siREDD2 avait un effet sur la morphologie de l'arbre dendritique des CGRs après la lésion axonale. La caractérisation de la morphologie neuronale 3 jours après axotomie démontre que les rétines traitées avec le siREDD2 ont des CGRs avec des dendrites plus longues et des arbres dendritiques plus élaborés que ceux des CGRs de rétines traitées avec le siCtl (Figure 13a, b). L'administration de la siREDD2 et de la rapamycine, un inhibiteur du complexe 1 de la protéine mTOR (mTORC1) (Chung et al., 1992), bloque complètement l'effet du siREDD2 ce qui suggère que cette réponse est spécifique à mTORC1 (Figure 13c). L'analyse quantitative des paramètres dendritiques révèle que le siREDD2 protège la longueur dendritique totale à 32% et l'aire dendritique à 34% des dommages engendrés par la lésion axonale, ceci en comparaison aux CGRs lésées traitées avec le siCtl ou la combinaison de siREDD2 et la rapamycine (Figure 13d, f ; Tableau 2). L'administration du siREDD2 ou de la rapamycine seule dans des rétines non lésées (rétines intactes) n'a pas induit de changements significatifs dans la longueur dendritique totale et l'aire dendritique (Figure 13e, g). La reconstruction et l'analyse des arbres dendritiques ont été faites en double aveugle.

Afin d'investiguer la contribution des dendrites proximales et distales aux changements induits par l'axotomie et des effets du siREDD2, nous avons examiné la longueur dendritique de dendrites proximales (ordres 1 à 3) en comparaison aux dendrites distales (ordres 4 à 10). Cette analyse démontre que les changements qui surviennent après l'axotomie et la modulation de la voie de signalisation REDD2 – mTOR ont lieu au niveau distal (Figure 13h). De plus, l'analyse de Sholl montre un déplacement de la courbe vers la droite indiquant une

augmentation de la complexité dendritique dans les CGRs axotomisées traitées avec le siREDD2 par rapport aux CGRs traitées avec du siCtl ou la combinaison de siREDD2 et rapamycine (Figure 13i). L'augmentation de la complexité des arbres dendritiques est plus apparente à une distance supérieure à 100 μm à partir du soma, ce qui corrèle avec les changements notés dans les dendrites distales. Curieusement, l'arbre dendritique de CGRs lésées traitées avec du siREDD2 était plus complexe que celui de CGRs intactes provenant de rétines n'ayant reçu aucun traitement (Figure 13i, courbe en rouge versus courbe en noir, tableau 2). L'administration du siREDD2 dans des yeux intacts n'a pas engendré de changements de complexités dendritiques (data non montré). Ces résultats ont identifié l'axe REDD2-mTORC1 comme un régulateur important de la morphologie dendritique des CGRs dans des neurones endommagés et mettent en évidence que l'augmentation de l'activité de mTOR dépendante de REDD2 secourt les dendrites des RGC après l'axotomie.

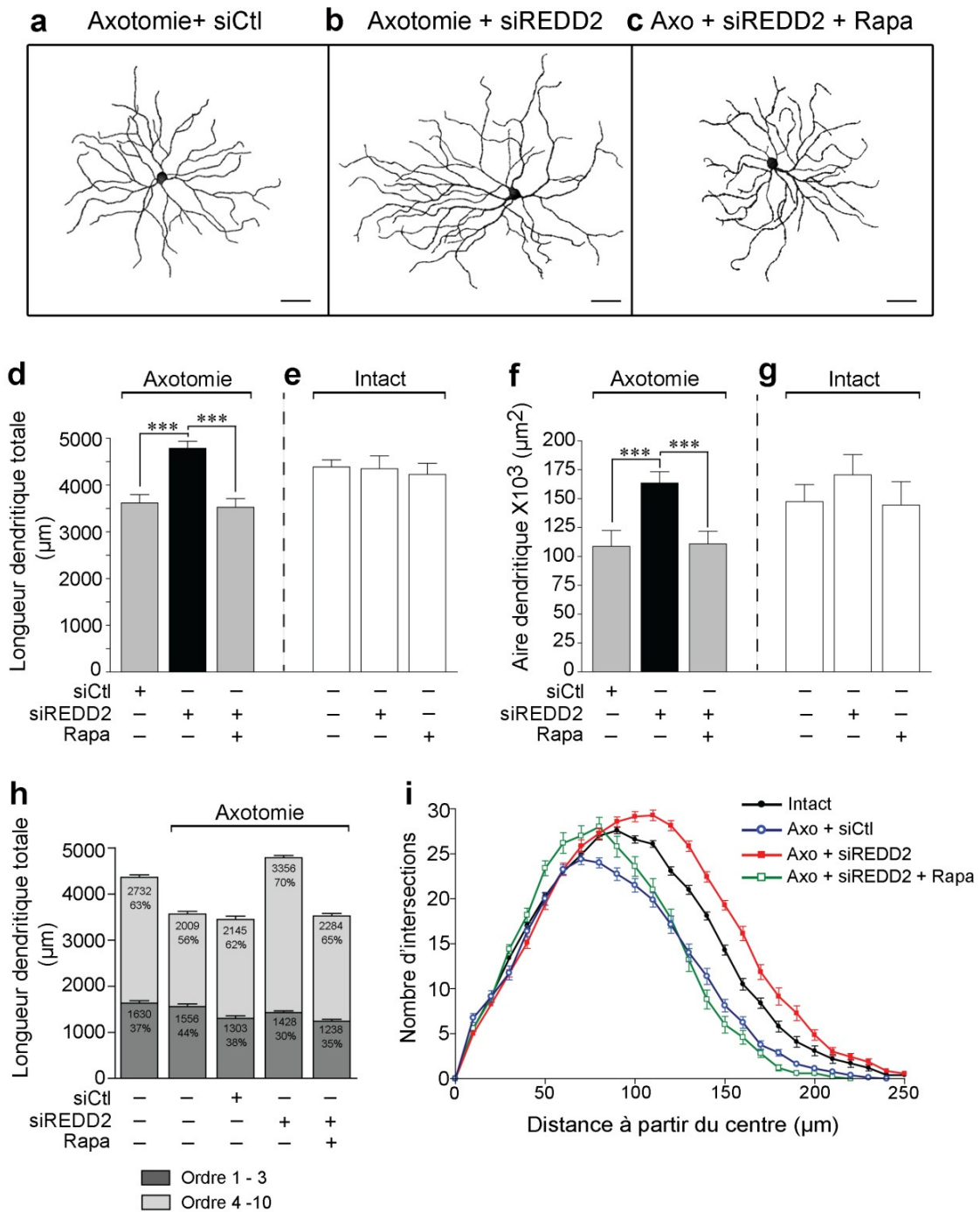


Figure 5 - Morquette et al.

FIGURE 13. L'augmentation de l'activité de mTORC1 médiée par REDD2 restaure l'arbre dendritique des CGRs lésés. (a et b) Les CGRs traitées avec du siREDD2 (n=20 cellules) ont des arbres dendritiques élaborés plus longs que ceux des neurones contrôles avec le siCtl (n=18 cellules).

c) La co-administration de siREDD2 avec la rapamycine (n=19 cellules), un inhibiteur de mTORC1, bloque l'effet du siREDD2 sur la morphologie dendritique (4-5 souris par groupe). (d et f) La longueur et l'aire dendritique augmentent dans les rétines traitées avec du siREDD2 comparativement à celles traitées avec le siCtl ou la combinaison siREDD2 et rapamycine. (e-g) L'administration de siREDD2 (n=19 cellules) ou rapamycine seule (n=17 cellules) n'a induit aucun changement au niveau de la longueur ou l'aire dendritique dans des neurones intacts non lésés (4-5 souris par groupe). h) L'analyse de la contribution des dendrites proximales (ordre 1-3) et distales (ordres 4-10) montre les changements dus à la lésion ainsi qu'aux réponses au siREDD2 ont lieu au niveau des dendrites distales. i) L'analyse de sholl révèle une augmentation de la complexité des CGRs lésés traitées avec le siREDD2 par rapport aux cellules exposées au siCtl ou la combinaison siREDD2 et rapamycine. Toutes les analyses sont faites à 3 jours post-axotomie. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (ANOVA, $**P < 0,001$). Voir Tableau 2 pour les valeurs de N. Échelle : (a-c)=50 μ m. Axo : axotomie.

III.1.8. L'ACTIVATION DE MTOR INDUITE PAR LA REDD2 RESTAURE LA FONCTION NEURONALE DES CGRS

Par la suite, afin de mesurer l'impact de la préservation dendritique sur la fonction des CGRs, nous avons fait des mesures électrophysiologiques sur des CGRs à centre ON. Pour ce faire, des mesures de cellules individuelles de type *whole-cell patch clamp* ont été réalisées 3 jours après lésion en présence ou absence de traitement au moment de l'axotomie. Pour y arriver, les rétines sont placées dans une chambre à enregistrement avec les CGRs face vers le haut et visualisées avec une lumière à épifluorescence, pour identifier les CGRs positives pour les YFP, ainsi que le DIC afin de voir la position de l'électrode d'enregistrement. L'identification de chaque cellule enregistrée et son patron dendritique dans la CPI est confirmée post-hoc suivie d'une injection d'Alexa Fluor 594 par une pipette d'enregistrement (Figure 14a-e). L'analyse des propriétés intrinsèques des CGRs, incluant le potentiel de repos et la résistance, n'ont pas montré de différence significative entre les neurones intacts et axotomisés en présence ou absence de traitements de siREDD2 (Figure 14f, g). Par contre, la stimulation lumineuse a démontré une plus grande fréquence de décharge dans les CGRs axotomisées par rapport aux contrôles non lésés (intactes : 22 ± 6 Hz, axotomie : 61 ± 9 Hz, moyenne \pm S.E.M., Figure 14h, i). De manière intéressante, le traitement du siREDD2 restaure la fréquence de décharge des CGRs axotomisées à un niveau similaire à ceux des neurones intacts (axotomie + siREDD2 : 22 ± 4 Hz, Figure 14j, k Tableau 1). Aucun changement significatif n'a été observé dans l'amplitude des potentiels d'action (Figure 14l). De façon intrigante, nos tentatives d'enregistrer dans des rétines traitées avec du siCtl ou PBS ont été sans succès. Ces cellules avaient un potentiel de repos très bas et ne répondaient pas aux critères

minimaux (> 40 expériences). Pris ensemble, ces résultats indiquent que l'axotomie entraîne une hyperexcitabilité précoce et que la protection des arbres dendritiques induite par le siREDD2 restaure la réponse à la lumière de ces neurones.

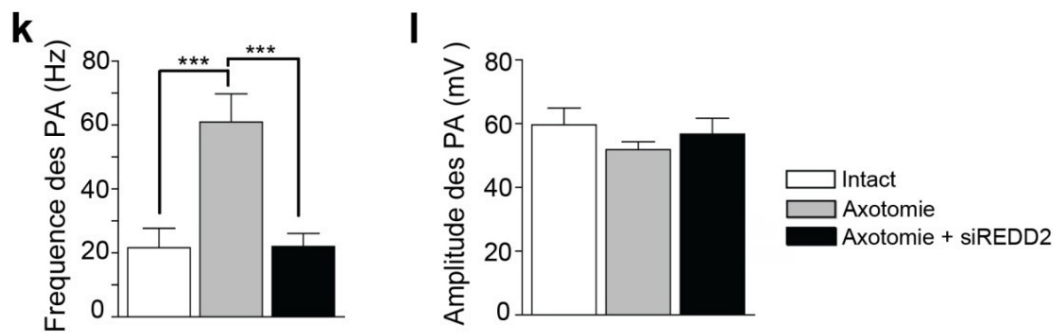
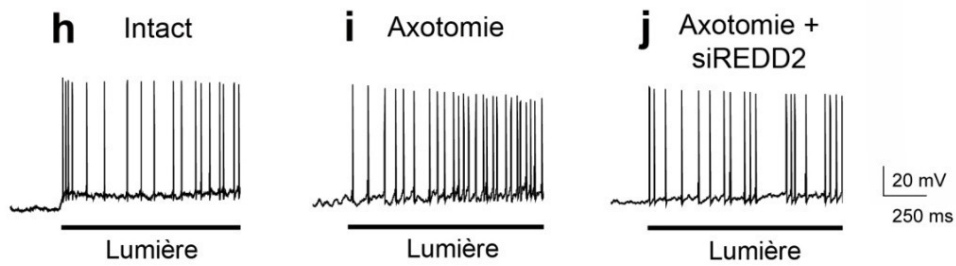
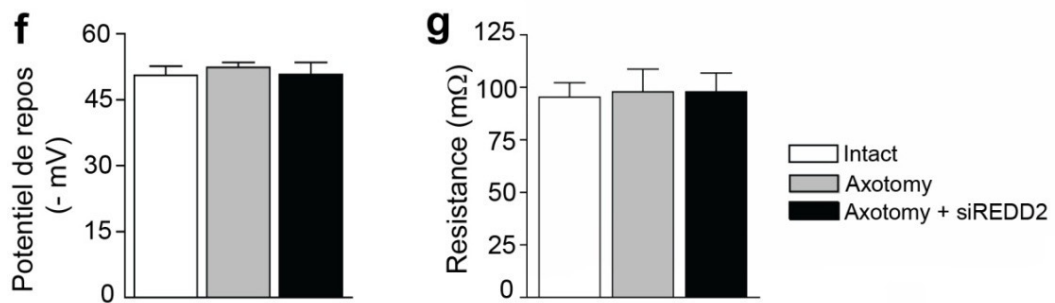
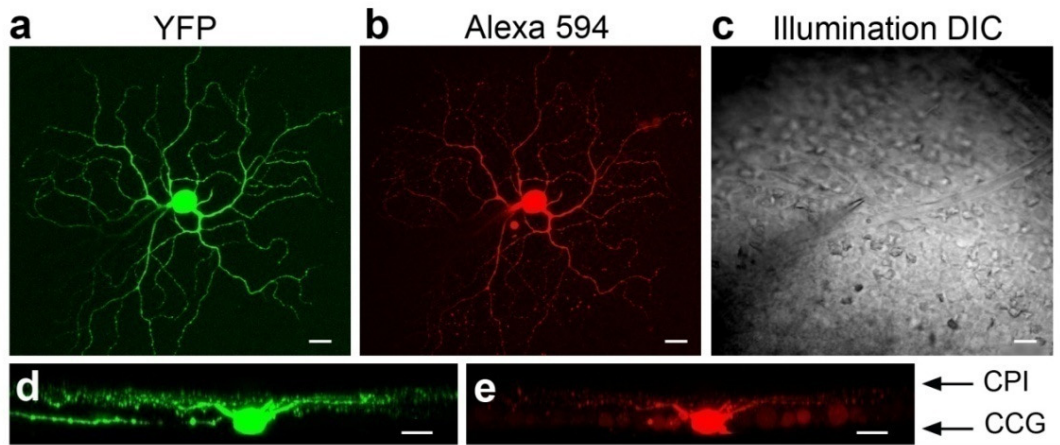


FIGURE 14. L'activation de mTOR dépendante de REDD2 restaure la fonction des

CGRs. (a–c) Des enregistrements en mode de "cellule entière" ont été effectués sur des CGRs-YFP préalablement visualisées avec de l'épifluorescence et de l'optique infrarouge DIC (differential interference contrast), afin de positionner les électrodes. (b, d et e) L'identité de chaque cellule enregistrée est confirmée après l'injection de l'Alexa Fluor 594 avec la même pipette d'enregistrement. L'analyse des propriétés intrinsèques des cellules ganglionnaires, c'est-à-dire le potentiel de repos membranaire (f) et la résistance (g), ne montre aucune différence significative entre les cellules intactes et axotomisées avec ou sans traitement du siREDD2. (h et i) La stimulation lumineuse démontre une augmentation de la fréquence des potentiels d'action suscités dans les CGRs axotomisées (n=7 cellules) comparativement ou cellules intactes non lésées (n=7 cellules). (j and k) Dans les neurones lésés, le traitement au siREDD2 restaure la fréquence de décharge induite par la lumière à des niveaux similaires à de neurones intacts enregistrés (n=7 cellules). (l) Aucun changement n'est observé au niveau de l'amplitude des potentiels d'action. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (ANOVA, ***P<0,001). Les cellules enregistrées proviennent de 5 à 7 souris par groupe. Échelle : (a–e)=20 μ m.

III.1.9. L'ACTIVATION DE mTOR INFLUENCE LA SURVIE NEURONALE

L'apoptose des CGRs suite à la lésion axonale a été associée au rétrécissement des corps cellulaires et du noyau (Janssen et al., 2013). Aussi, le rôle de la protéine kinase dans la régulation de la dimension des somas neuronaux est connu (Kwon et al., 2003). Par conséquent, nous avons tout d'abord examiné les dimensions du soma des CGRs après axotomie et analysé si l'activité de mTOR dépendante du siREDD2 induisait une différence. Nos résultats ne montrent aucun changement significatif au niveau de la dimension des corps cellulaires à 3 jours post-lésion en présence ou absence de siREDD2 (Figure 15a, Tableau 1). Aussi, afin de déterminer si la protection des arbres dendritiques induite par le siREDD2 a un effet sur la survie des CGRs, nous avons examiné des rétines à 5 jours et 7 jours post lésion. Des rétines étalées provenant d'yeux traités avec le siREDD2 au moment de l'axotomie ont montré une densité de CGR plus élevée que la densité de ceux traités avec le siCtl (Figure 15b-e). En effet, des analyses quantitatives ont démontré que le siREDD2 promeut la survie des CGRs par rapport au siCtl à 5 jours (siREDD2 : 91% de survie, 2700 ± 128 RGCs/mm², CGRs/mm² ; siCtl 45%, 1344 ± 27 CGRs/mm²) après la lésion du nerf optique (Figure 15f, Tableau 1). Prises ensemble, ces données suggèrent que la protection des arbres dendritiques médiée par mTOR atténue la perte des CGRs après une lésion axonale.

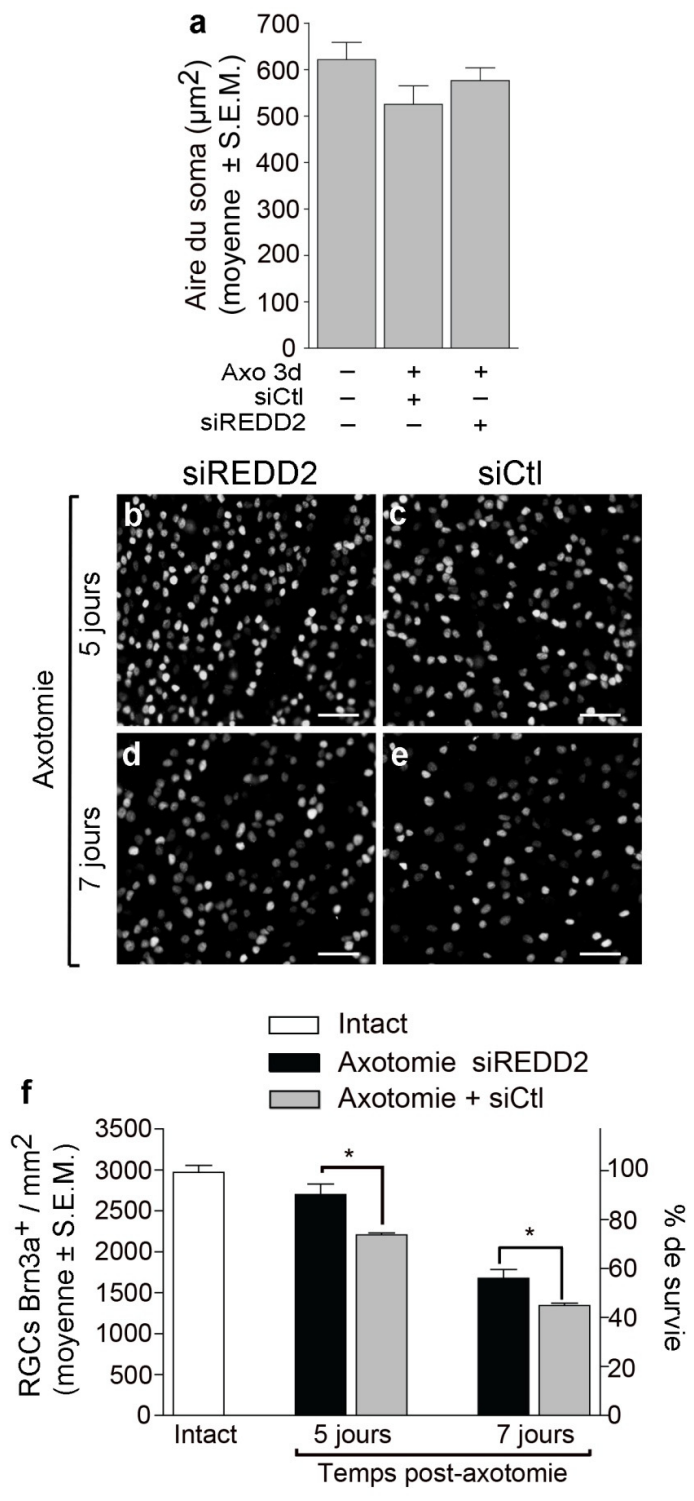


FIGURE 15. L'activation de mTOR prolonge la survie neuronale. (a) Aucun changement n'est rapporté pour la dimension des somas des CGRs axotomisées traitées avec ou sans du siREDD2 (axotomie seule : n=18 cellules; Axo+siREDD2 : n=20 cellules; intact : n=17 cellules; 3–5 souris par groupe). (b–e) Les rétines étalées d'yeux traités avec du siREDD2 montrent une densité plus élevée de CGR exprimant le Brn3a par rapport à ceux traités avec du siCtl. (f) L'analyse quantitative démontre que le siREDD2 promeut la survie d'une proportion substantielle de CGR comparativement à celle traitée avec le siCtl, ceci à 5 et 7 jours après axotomie. Les données sont exprimées en terme de densité (CGRs/mm² ; moyenne ± S.E.M., ANOVA, *p<0,05; n=3–5 souris par groupe). La densité des CGRs dans les rétines intactes est montrée ici comme référence (100% de survie). Échelle : (b–e)=50 µm.

III.1.10. DISCUSSION

Les altérations qui surviennent au niveau des structures dendritiques sont une caractéristique de plusieurs maladies du cerveau. Cependant, les mécanismes moléculaires qui induisent ces pathologies dendritiques sont peu connus. Dans cette perspective, les données présentées ici supportent plusieurs évidences. Tout d'abord, nous avons montré qu'une lésion axonale entraîne une rétraction dendritique qui survient rapidement dans une grande proportion des CGRs, ceci avant le début de mort neuronale. Deuxièmement, nous avons démontré qu'une lésion des axones des CGRs induit l'augmentation de l'expression de la protéine REDD2, ce qui coïncide avec une diminution marquée de l'activité de mTOR dans ces neurones. Troisièmement, nous avons montré que la sur-régulation de REDD2 est sous-jacente à des aberrations dendritiques parce que l'inhibition de REDD2 par des pARNi restaure l'activité de

mTOR et restaure la structure ainsi que la complexité des arbres dendritiques. Enfin, l'inhibition de REDD2 entraînant l'activation de mTOR rétablit les réponses physiologiques des CGRs lésées à des stimuli lumineux et augmente leur survie. Mis ensemble, ces résultats suggèrent un nouveau rôle pour le REDD2 dans la régulation de la morphologie dendritique via la modulation de l'activité de mTOR après une lésion axonale.

Les dendrites sont des structures très dynamiques durant le développement, qui s'étendent et se rétractent rapidement en réponse à des stimuli intrinsèques et environnementaux (Wong and Wong, 2000, Cline, 2001). Cependant, elles deviennent relativement stables durant l'âge adulte et subissent très peu de changement sur de longues périodes (Koleske, 2013). Après lésions et durant la neurodégénérescence, la stabilité de l'arbre dendritique est compromise. Par exemple, la mort sélective des CGRs est une caractéristique de la maladie du glaucome (Almasieh et al., 2012) et le rétrécissement de l'arbre dendritique a été observé chez le primate, le chat et les rongeurs dans des modèles de cette maladie (Weber et al., 1998a, Shou et al., 2003, Morgan et al., 2006, Li et al., 2011, Della Santina et al., 2013, Feng et al., 2013, Williams et al., 2013) ainsi que dans la rétine de patients glaucomateux (Pavlidis et al., 2003). Les axones des CGRs dans la partie proximale du nerf optique sont supposément le site primaire des dommages dans le glaucome (Nickells et al., 2012). De même, nous avons montré ici que l'axotomie entraîne une rétraction dendritique rapide des CGRs : des données qui concordent avec les changements dendritiques précoces observés après un écrasement du nerf optique (crush) (Leung et al., 2011, Kalesnykas et al., 2012). Malgré la grande diversité morphologique de l'arbre dendritique des CGRs dans la rétine de souris (Sun et al., 2002b, Coombs et al., 2006), peu de marqueurs moléculaires reconnaissent plusieurs différents sous-types à la fois

ont été identifiés. En effet, parmi le NF-H, la mélanopsine, le JAM-B et autres (section I.1.2), seul le NF-H permet de cibler plusieurs sous-types de neurones qui sont identifiables par leur morphologie. Les neurones exprimant le NF-H représentent une proportion importante des CGRs. Il a été proposé que les différents sous-types de CGRS possèdent différentes susceptibilités aux lésions. Dans la rétine axotomisée de félin, les cellules α qui contiennent un soma et un arbre dendritique large subissent une diminution significative de leur arbre dendritique. Cependant, les cellules β qui possèdent un soma moyen avec un arbre dendritique plus compact sont moins affectées (Weber and Harman, 2008). Nos résultats montrent que les CGRs qui expriment le NF-H, regroupent des cellules avec des arbres dendritiques de dimension moyenne à large et subissent une atrophie qui ressemble à celle des cellules α , lorsqu'axotomisée. Une autre étude rapporte le rétrécissement des dendrites des CGRs exprimant le NF-H qui a lieu deux mois après l'induction de la pression intraoculaire à l'aide de laser, ceci à un moment où la mort des CGRs ainsi que la perte de leur axone sont déjà avancées, dans le cadran supérieur de la rétine provenant d'yeux avec une haute PIO. Nous avons observé un rétrécissement des arbres dendritiques des CGRs dans tous les cadrans; ceci indépendamment de l'excentricité rétinale, ce qui peut expliquer les différences entre ces modèles distincts avec le fait que nos analyses aient été faites très tôt après une lésion axonale à un moment précédent la neurodégénérescence massive des somas.

L'identification des voies de signalisation qui sont impliquées dans le maintien des arbres dendritiques est essentielle pour la compréhension des bases moléculaires de ces changements pathologiques et pour identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Nos données suggèrent que la voie REDD2-mTOR est importante pour la stabilité dendritique des CGRs

adultes. Nous montrons que les dommages axonaux des CGRs entraînent une augmentation du REDD2, une diminution de mTOR et une rétraction dendritique spécifiquement dans ces neurones. L'expression de la protéine REDD2 est fortement augmentée en présence d'hypoxie, via le *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 α) (Shoshani et al., 2002), ainsi qu'en présence de stress oxydatif et osmotique, (Cuaz-Pérolin et al., 2004, Imen et al., 2009). La lésion du nerf optique augmente l'expression du HIF-1 α et les dérivées réactives de l'oxygène dans les CGRs (Ergorul et al., 2010, Kanamori et al., 2010), ce qui pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression de REDD2 rapportée ici. La protéine REDD2 étant un inhibiteur probant de mTOR, nous avons déterminé si l'augmentation de REDD2 induite par l'axotomie peut amener à une diminution de mTOR et conjointement la rétraction dendritique. Nous montrons que les CGRs adultes ont une activité constitutive de mTOR qui est nettement réduite après axotomie, ceci en accord avec une étude montrant une réduction de mTOR dans les CGRs suite à un écrasement du nerf optique (Park et al., 2008). Nos expériences de perte de fonction grâce à l'utilisation de pARNi contre la REDD2 démontrent aussi une restauration sélective de l'activité de mTOR dans les CGRs lésées conjointement avec une protection des arbres dendritiques. En outre, l'administration de la rapamycine a complètement inhibé l'effet du siREDD2 sur la restauration des dendrites. Nos données suggèrent que la perte de la fonction de mTOR dépendante de REDD2 engendre un rétrécissement des dendrites des CGRs et que mTORC1 est nécessaire pour la stabilité des dendrites des CGRs adultes.

Une étude récente supporte le rôle du mTOR dans la régénérescence des axones des CGRs (Park et al., 2010, Morgan-Warren et al., 2013). Par exemple, la suppression de la phosphatase and tension homolog, TSC1 ou TSC2, tous deux des régulateurs négatifs de

mTOR, induit une régénération robuste des axones des CGRs dans le tractus du nerf optique lésé (Park et al., 2008, Kurimoto et al., 2010, Park et al., 2010, Morgan-Warren et al., 2013). Plus récemment, Leibinger *et al* (Leibinger et al., 2012) ont montré qu'une stimulation inflammatoire prévient la diminution de l'activité de mTOR suite à une axotomie des CGRs et que la signalisation de mTOR est importante pour maintenir les CGRs dans un état régénératif actif. De plus amples études s'avèrent nécessaires pour identifier les cibles de mTOR qui sont impliqués dans la repousse axonale ou la stabilité et le maintien dendritique. Néanmoins, un rôle central de mTOR est la régulation de la traduction protéique. Ainsi, il mTORC1 pourrait induire la traduction de protéines structurelles ou de signalisation dans les dendrites pour assurer le maintien de l'arbre dendritique et dans les axones pour favoriser la régénération. Plusieurs molécules qui contribuent à la stabilité dendritique durant le développement ont été identifiées. Ceci inclue les protéines associées aux microtubules 1A et 2 (MAP-1A et MAP-2), l'intégrine $\alpha3\beta1$, la calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII), la nuclear Dbf2-related kinases and the guanine deaminase cypin (Koleske, 2013). Ce serait intéressant d'investiguer si ces molécules sont des cibles de mTOR dans ce contexte et s'ils sont dérégulés après lésion du SNC. D'autre part, mTOR pourrait directement réguler l'interaction protéine-protéine importante pour le maintien dendritique. En effet, mTOR peut favoriser l'interaction entre les microtubules et les protéines de liaison à l'actine, interaction nécessaire pour une morphologie dendritique adéquate (Swiech et al., 2011). Ceci suggérant ainsi un rôle de mTOR autre que la synthèse protéique (Malik et al., 2013).

Nos résultats électrophysiologiques montrent qu'après une lésion axonale, les CGRs subissent une augmentation de leur fréquence de décharge caractéristique des neurones hyperexcités. Cette découverte corrobore avec une étude récente qui montre une augmentation

significative de l'activité spontanée des potentiels d'actions des CGRs dans un modèle d'hypertension oculaire induit à l'aide de microbilles chez la souris (Ward et al., 2014). Cette hyperactivité des CGRs contraste avec la réduction de décharges spontanées enregistrées à l'aide de multiélectrode array dans un modèle similaire de glaucome chez la souris (Della Santina et al., 2013), une nuance qui pourrait être due à la différence de méthodologie et des sous-types cellulaires analysés. Remarquablement, le traitement avec le siREDD2 restaure le taux de décharge à un niveau semblable à celui trouvé chez les neurones intacts, c'est-à-dire non lésés. Cela dit, un aspect intrigant de nos résultats est que nous avons été dans l'impossibilité d'enregistrer des décharges de CGR lésées traitées avec du siCtl. Nous ne pouvons pas conclure toutefois que le siCtl est toxique puisque nous n'avons pas été capables non plus de faire des enregistrements dans des rétines injectées avec du PBS. Ces données suggèrent que la combinaison de l'axotomie et de l'injection intraoculaire est néfaste pour les propriétés électrophysiologiques des CGRs, une réponse qui peut être abolie en présence de REDD2. La perte de réponse à la lumière des CGRs sujettes à l'axotomie et l'injection intravitréale, suggère que des lésions multiples au niveau de l'œil sont néfastes pour la fonction des CGRs, une observation qui mériterait plus d'investigation.

L'excitabilité du neurone est le résultat de l'équilibre entre plusieurs facteurs incluant le potentiel de repos, la résistance et les dimensions du soma. Les anomalies dendritiques rapportées ici n'étaient accompagnées d'aucun des facteurs cités ci-dessus. Ainsi, l'hyperexcitabilité induite par l'axotomie et l'effet du REDD2 ne semblent pas être dus à des changements de propriétés intrinsèques ou des changements de dimension de soma. Nos résultats suggèrent par contre que le déficit fonctionnel serait dû aux changements de l'intégrité

des dendrites et probablement le réarrangement des afférences synaptiques. En effet, l'hyperexcitabilité serait le résultat d'une augmentation des connexions excitatrices ou d'une diminution des synapses inhibitrices. De manière intéressante, il a préalablement été démontré que mTOR supprime la traduction dendritique des canaux potassiques Kv1.1 (Raab-Graham et al., 2006), un effet qui peut augmenter les décharges et la synchronisation du réseau (Metz et al., 2007, Cudmore et al., 2010). Plus récemment, il a été montré que la signalisation de TSC1-mTOR régule l'équilibre entre la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice, qui peut mener à une hyperactivité lorsqu'elle fait défaut (Bateup et al., 2013).

En conclusion, nos données supportent un modèle selon lequel la lésion axonale des CGRs entraîne une augmentation de REDD2 qui à son tour engendre l'inhibition de mTOR entraînant la rétraction des arbres dendritiques, un dysfonctionnement neuronal et ainsi la mort des neurones rétiniens adultes. Nos résultats permettent de mettre en lumière un nouveau mécanisme dans la régulation de la pathologie dendritique qui pourrait s'avérer importante dans les maladies neurodégénératives telles que le glaucome.

Tableau 1 : Nombre (N) d'animaux utilisés par expérience

Groupe	Traitement	N	# Figure
Analyse de survie des CGRs (YFP)	Intact	11	9a
	Axotomie (3 jours)	7	9a
	Axotomie (5 jours)	4	9a
Analyse de Survie des CGRs (Brn3a)	Intact	11	9b
	Axotomie (3 jours)	3	9b
	Axotomie (5 jours)	3	9b
Immunohistochimie (NF-H + YFP)	Intact	7	9c-e
Analyse d'arbre dendritique	Intact	5	9h-j
	Axotomie (3 jours)	5	9h-j
Immunohistochimie (Phospho-S6 + TUJ1)	Intact	4	10a-i, m, r
	Axotomie (3 jours)	4	10a-i, n, o-r
Immunohistochimie (Phospho-S6 + Calbindin)	Intact	3	10j-l, s
	Axotomie (3 jours)	3	10j-l, s
Immunohistochimie (REDD2, REDD1)	Intact	3	11a
	Axotomie (3 jours)	3	11b-k
Analyse de western blot (REDD2, REDD1)	Intact	5	11l-n
	Axotomie (2 jours)	4	11l-n
	Axotomie (3 jours)	4	11l-n
Incorporation du pARNi (siCtl-Cy3 + Fluorogold)	Intact + siCtl-Cy3	4	12a-d
Analyse de western blot (REDD2, REDD1)	Axotomie + siCtl	4	12e-g
	Axotomie + siREDD2	5	12e-g
Immunohistochimie (Phospho-S6 + Brn3a)	Axotomie + siCtl	4	12k-n
	Axotomie + siREDD2	4	12h-j, o
Immunohistochimie (Phospho-S6 + Calbindin)	Axotomie + siCtl	3	12q
	Axotomie + siREDD2	3	12q
Analyse d'arbre dendritique	Axotomie + siCtl	5	13a, d-i
	Axotomie + siREDD2	5	13b, d-i
	Axotomie + siREDD2 + Rapa	4	13c, d-i
	Intact + siREDD2	5	13d-i
	Intact + Rapamycine (Rapa)	5	13d-i
Électrophysiologie	Intact	7	14a-h, k, l
	Axotomie	5	14f, g, i, k, l
	Axotomie + siREDD2	5	14f, g, j, k, l
	Axotomie + siCtl	20	N/A
Analyse de soma	Intact	5	15a
	Axotomie + siCtl	5	15a
	Axotomie + siREDD2	5	15a
Analyse de survie des CGRs (Brn3a)	Axotomie (5 jours) + siREDD2	4	15b, f
	Axotomie (5 jours) + siCtl	3	15c, f
	Axotomie (7 jours) + siREDD2	5	15d, f
	Axotomie (7 jours) + siCtl	4	15e, f

Tableau 2 : Paramètres dendritiques

Groupe	Traitement	Longueur dendritique totale (μm) (moy. \pm SEM)	Aire dendritique ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$) (moy. \pm SEM)	Analyse de Sholl (aire sous la courbe) (moy. \pm SEM)	Nombre d'animau x (N)	Nombre de CGR (n)
Intact	-	4391,7 \pm 118,0	149,7 \pm 10,5	3413,8 \pm 128,6	5	17
Intact	siRedd2	4348,4 \pm 275,1	170,5 \pm 17,5	3138,6 \pm 237,7	5	19
Intact	Rapamycine	4225,6 \pm 237,1	144,4 \pm 20,2	3057,1 \pm 241,8	5	17
Axotomie	-	3706,9 \pm 190,2	111,8 \pm 9,9	2682,0 \pm 128,6	5	21
Axotomie	siCtl	3613,6 \pm 225,8	108,6 \pm 13,8	2565,7 \pm 216,4	5	18
Axotomie	siRedd2	4597,5 \pm 229,2	163,5 \pm 9,7	3713,8 \pm 138,5	5	20
Axotomie	siRedd2 + Rapamycine	3523,0 \pm 185,0	110,8 \pm 10,9	2770,0 \pm 219,6	4	19

III.2. DEUXIÈME ÉTUDE

I.1.2. RÉSUMÉ

La présence de la cytokine pro-inflammatoire TNF α a été démontrée dans plusieurs pathologies neurodégénératives du système nerveux central dont le glaucome (Shohami et al., 1999, Tan et al., 2007, Brodacki et al., 2008, Sawada et al., 2010, Balaiya et al., 2011, Çomoğlu et al., 2013, Fukazawa et al., 2013, Xin et al., 2013, Belkhelfa et al., 2014). L'augmentation du TNF α et de ces récepteurs TNFR1 entraînent la dégénérescence du nerf optique et la mort des CGRs par apoptose (Tezel and Wax, 2003). En effet, le TNF α libéré par les cellules gliales augmente dans la rétine et la partie proximale du nerf optique (Tezel and Wax, 2003); aussi, le TNFR1 est surrégulé dans les CGRs et leur axone dans les rétines d'humains glaucomateux (Tezel et al., 2001, Tezel and Wax, 2003). D'autres études ont aussi démontré une augmentation du TNF α et son récepteur TNFR1 dans des rétines soumises à une augmentation de la PIO. Bien que plusieurs pistes soient considérées, les mécanismes moléculaires via lesquels le TNF α contribue à la dégénérescence des CGRs sont peu connus (Tezel and Wax, 2003).

Le but de notre étude est de déterminer l'effet du TNF α exogène sur la morphologie de l'arbre dendritique des CGRs et d'investiguer les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces changements. Nos résultats démontrent que le TNF α induit une rétraction des arbres dendritiques des CGRs précoces associés à une réduction de l'activité de mTOR dans les CGRs lésés. Ainsi ces résultats ont permis de mettre à jour plusieurs évidences. Premièrement qu'un agent néfaste pour le nerf optique et les somas, le TNF α , peut induire l'altération des arbres dendritiques des CGRs adultes *in vivo*. Ces altérations ont lieu avant que la mort neuronale

commence dans la rétine. Aussi, nos données suggèrent un lien entre le TNF α et la protéine kinase mTOR, nous permettant du coup d'identifier le TNF α comme déclencheur de la perte de l'activité de mTOR dans ce type de lésion.

III.2.1. LE TNF α EXOGÈNE INDUIT LA MORT DES CGRS

Afin de déterminer le patron de mort des CGRs induit par administration du TNF α *in vivo*, nous avons injecté 0,2 ng/ μ L de TNF α murin recombinant dans l'humeur vitrée de souris adultes de type sauvage. Nos résultats montrent que la densité des CGRs marquées avec du Brn3a, un marqueur sélectif des CGRs, diminue de 26% à 7 jours post-injection (2513 ± 48 ; n=3), alors qu'il ne provoque pas de changement significatif à 3 jours (3109 ± 191 ; n=5) après l'injection du TNF α par rapport à l'intact (3436 ± 71 ; n=9; Figure 16). Ainsi ces données montrent que le TNF α induit la mort des CGRs à 1 semaine. Ce qui représente une fenêtre d'opportunité pour investiguer les changements dendritiques subséquents.

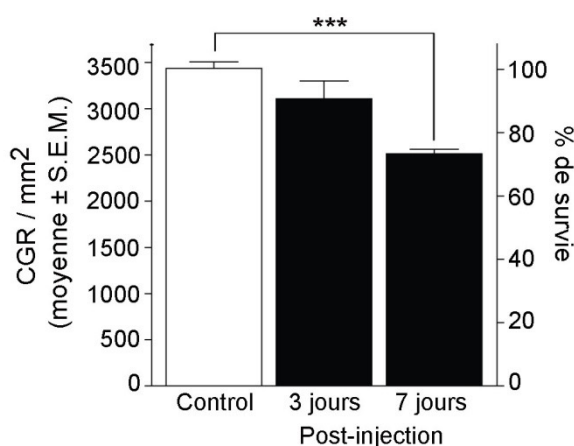
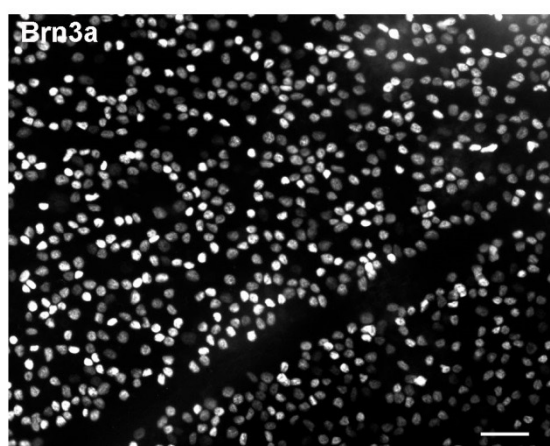


FIGURE 16. Le TNF α exogène induit la mort neuronale des CGRs à une semaine.

Marquage d'une rétine étalée avec le Brn3a, un marqueur sélectif des CGRs. b) Du TNF α (0,2 ng/ μ l) exogène injecté dans l'humeur vitrée de souris induit la mort des cellules ganglionnaires à une semaine (7 jours) mais pas à 3 jours post-injection comparativement aux contrôles traités avec du PBS. Les données sont exprimées en densité (CGRs/ mm^2 ; moyenne \pm S.E.M., ANOVA, *** $p < 0,001$; La densité des CGRs dans les rétines contrôles sont montrées ici comme référence (100% de survie). Échelle a) = 50 μ m.

III.2.2. ALTÉRATIONS DENDRITIQUES DES CGRS EN PRÉSENCE DE TNF α EXOGÈNE

Afin de déterminer si le TNF α induit des altérations au niveau de la morphologie dendritique des CGRs, nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente jaune (Yellow Fluorescent Protein, YFP) sous le contrôle du promoteur Thy-1 dans les CGRs (Feng et al., 2000) comme précédemment. Rappelons que seulement 1% des CGRs expriment la protéine fluorescente chez ces souris, ce qui permet la visualisation complète de l'arbre dendritique d'une CGR sans enchevêtrement avec les branches dendritiques de neurones avoisinants (Annexe B, figure 1). Par ailleurs, les CGRs co-exprimant les YFP et NF-H sont photographiées et reconstruites en 3D à l'aide du logiciel Imaris (Bitplane).

Nos résultats démontrent que les arbres dendritiques des CGRs rétrécissent après une injection intraoculaire de TNF α (Figure 17a-b), avec une réduction de 40% de la longueur dendritique totale ($3118 \pm 393 \mu\text{m}$; $n=18$) et 50% de réduction de l'aire dendritique ($96 \pm 14 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; $n=18$) respectivement en comparaison aux CGRs contrôles (longueur : 5237 ± 237

μm ; aire : $191 \pm 24 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; n=14) (Figure 17c-d). L'analyse de Sholl montre un déplacement de la courbe vers la gauche indiquant une réduction de la complexité des neurones, avec une diminution significative de l'aire sous la courbe (Figure 17e-f). Par ailleurs, une analyse plus poussée des changements au niveau de la complexité dendritique montre une diminution du nombre d'ordres dans la partie distale de l'arbre dendritique des CGRs en présence de $\text{TNF}\alpha$ (données non montrées). Ces résultats démontrent que la rétraction des CGRs commence très tôt après la lésion et ceci avant que la mort neuronale ne commence dans la rétine.

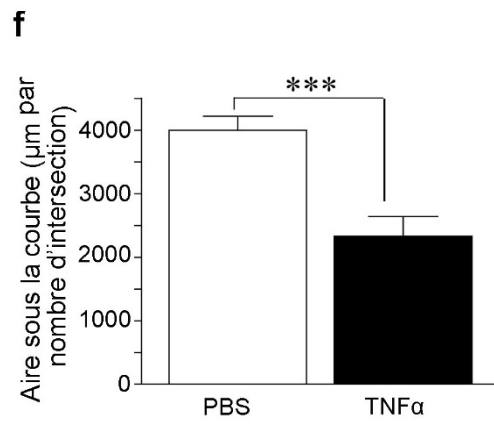
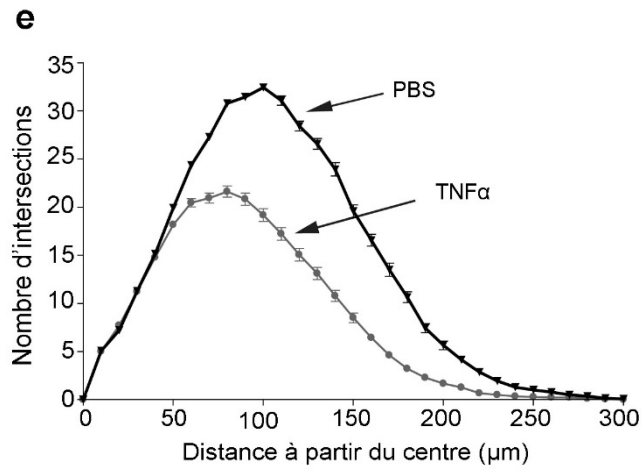
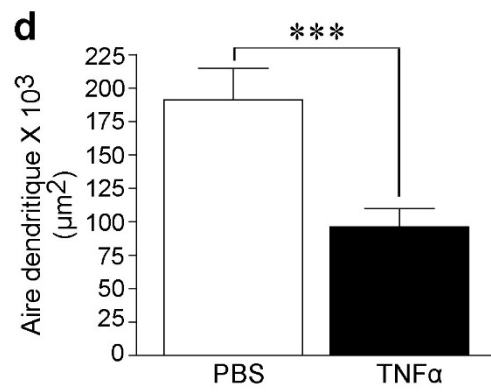
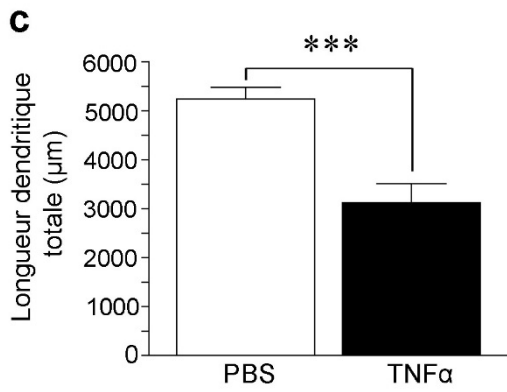
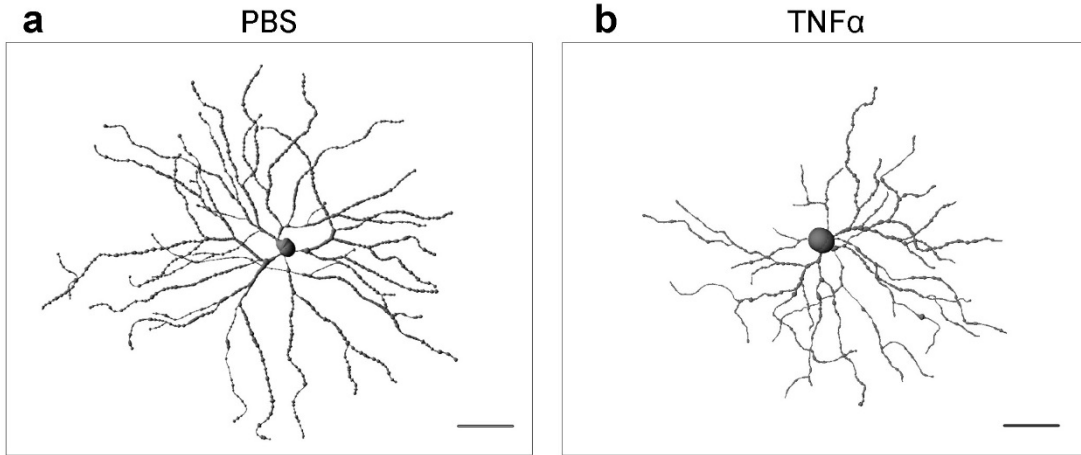


FIGURE 17. Le TNF α induit un rétrécissement précoce des arbres dendritiques des

CGRs. (a et b) Tracé de CGR provenant d'yeux traités avec du TNF α ou son véhicule (PBS).

Trois (3) jours post-injection l'arbre dendritique des cellules ganglionnaires en présence de TNF α est visiblement plus petit. L'analyse quantitative révèle une diminution significative de la longueur dendritique totale (c) et de l'aire dendritique (d). Aussi l'analyse de Sholl montre un déplacement de la courbe vers la gauche des CGRs traitées avec le TNF α (e-f). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (Test t de Student, ***P<0,001).

III.2.3. L'INJECTION DU TNF α INDUIT LA RÉDUCTION DU pS6 DANS LES CGRS

Afin d'établir si la rétraction dendritique corrèle avec des changements de l'activité de mTOR dans les CGRs, nous avons examiné l'expression de la Phospho-S6^(ser240/244) (pS6) dans des rétines des CGRs intactes et axotomisées. Le double marquage de pS6 avec l'anticorps contre le Brn3a démontre sa présence dans les CGRs (Figure 18a-c). Aussi, nous avons constaté une réduction de l'activité de pS6 dans les CGRs 3 jours après l'injection de TNF α . La quantification des CGRs qui expriment les pS6 et Brn3a par rapport à celles qui expriment seulement le Brn3a démontre une réduction de 23% dans les CGRs adultes (Figure 18 d, e).

Pris ensemble, ces résultats démontrent qu'une lésion biochimique du nerf optique et donc des axones et des corps cellulaires des CGRs induit des altérations précoces des arbres dendritiques des CGRs. Ainsi, ces changements corrèlent avec une diminution de p-S6 suggérant une diminution de l'activité de la protéine kinase mTOR dans ces neurones lésés.

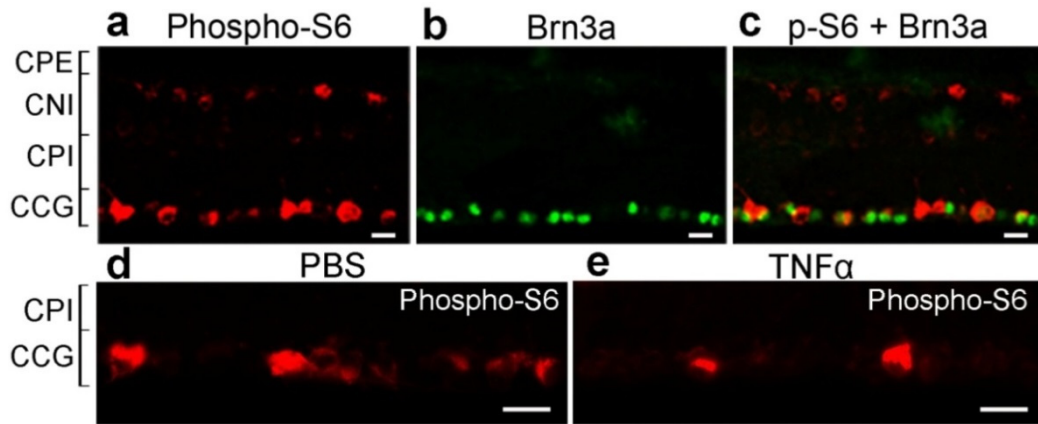


FIGURE 18. L'expression de pS6 diminue en présence de TNF α dans les CGRs *in vivo*.

(a-c) Le marquage de la phospho-S6 est visible dans les CNI et CCG. Le co-marquage entre les pS6 et Brn3a révéla sa présence dans le CGR. (d-e) L'injection de TNF α (0,2 ng/ μ l) dans le vitrée entraîne une diminution de l'expression de pS6 dans les cellules ganglionnaires. Échelle : (a-e) = 50 μ m. CPE, couche plexiforme externe; CNE, couche nucléaire externe; CPE, couche plexiforme externe; CNI, couche nucléaire interne; CPI, couche plexiforme interne; CCG, couche de cellules ganglionnaires.

III.2.4. DISCUSSION

Les données présentées dans cette deuxième partie montrent que le TNF α induit la réduction de l'arbre dendritique des CGRs conjointement avec une perte de l'activité de mTOR. Aussi cette réduction est précoce puisqu'elle précède le début de mort des CGRs dans la rétine lésée. Nous avons mis en évidence pour la première fois, à notre connaissance, l'effet néfaste du TNF α sur les dendrites de neurones matures du SNC.

La mort des CGRs résultant de la présence de TNF α est présentement connue. Dans des modèles de glaucome expérimental, l'expression de TNF α par les cellules gliales induit la mort des CGRs et l'altération de leur axone qui peut être amoindrie en présence d'Etanercept, un inhibiteur du TNF α . Aussi, nos résultats montrent qu'en présence de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de TNF α , 20% de CGRs meurent à 7 jours post-injection. Cependant, à 3 jours post-injection, nous n'avons pas remarqué de mort significative. Lorsque nous analysons l'effet du TNF α sur les arbres dendritiques des CGRs à ce moment (c'est-à-dire à 3 jours), nous remarquons une diminution de 40% de leur longueur dendritique totale et de 50 % de l'aire dendritique. Aussi, l'étude de la complexité par l'analyse de Sholl des CGRs traitées avec le TNF α révèle un déplacement de la courbe vers la gauche par rapport aux CGRs traitées avec du PBS. Ainsi, en présence de cette cytokine, l'arbre dendritique des cellules ganglionnaires devient plus petit. La diminution du nombre d'ordres dans la partie distale de ces neurones pourrait suggérer une perte de connexions synaptiques.

Quels seraient les mécanismes moléculaires par lesquels le TNF α pourrait agir pour médier ces changements dendritiques *in vivo*? Des évidences suggèrent que le TNF α pourrait médier son action en agissant sur le cytosquelette. Par exemple, dans le compartiment axonal le TNF α induit une désorganisation des microtubules avec l'accumulation de neurofilaments (Kitaoka et al., 2006). Par ailleurs, la présence de TNF α recombinant ou de cellules gliales sécrétant du TNF α induit une diminution importante de la longueur et du nombre des neurites de ces neurones de l'hippocampe en développement (Neumann et al., 2002). Cette diminution des neurites serait dépendante de la voie RhoA GTPase puisqu'en présence de son inhibiteur, le C3 transférase, TNF α ne peut induire cet effet sur les neurites (Neumann et al., 2002). D'un

autre côté, le TNF α pourrait agir au niveau de la transmission synaptique (Tancredi et al., 1992) pour induire une instabilité dendritique à l'origine de la rétraction notée ici.

Bien que nous ignorions le mécanisme exact par lequel le TNF α induit le remodelage dendritique, nos données montrent une réduction de l'expression de p-S6 conjointement à 3 jours post-injection. Ceci suggère un lien entre TNF α avec la protéine kinase mTORC1. Cependant, afin de confirmer ce lien une expérience supplémentaire devrait être faite : c'est-à-dire l'analyse par immunohistologie de p-S6 dans des coupes transversales de rétines traitées avec le TNF α et la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1. Les résultats de cette expérience nous permettront de confirmer si la baisse de p-S6 en présence de TNF α est associée à l'activité de mTOR. Ainsi, la perte de mTOR, qui pourrait induire une altération de l'expression des protéines synaptiques, représente une cible à explorer pour les stratégies de neuroprotection dendritique.

En conclusion, cette étude bien que succincte met en évidence pour la première fois l'effet néfaste précoce du TNF α sur la morphologie des CGRs adultes. Aussi, la réduction de pS6 en présence de cette cytokine suggère un lien avec mTOR. Cependant, d'autres expériences devront être entreprises pour confirmer ce lien. Ceci pourrait avoir une implication importante pour la compréhension, le dépistage et l'établissement de stratégies neuroprotectrices de la maladie du glaucome.

CHAPITRE 4

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

IV.1. L'ALTÉRATION DENDRITIQUE PRÉCÈDE LA MORT NEURONALE DES CGRS APRÈS LÉSION AXONALE.

Les altérations dendritiques ont été préalablement rapportées dans des pathologies neurodégénératives tels l'Alzheimer, le Parkinson et le glaucome (Weber et al., 1998a, Uylings and de Brabander, 2002, Moolman et al., 2004, Baloyannis, 2009). Dans la rétine de patients glaucomateux et dans des modèles de glaucome expérimental, un remodelage de l'arbre dendritique des CGRs a aussi été rapporté (Weber et al., 1998a, Shou et al., 2003, Morgan et al., 2006, Li et al., 2011, Liu et al., 2011, Kalesnykas et al., 2012, Feng et al., 2013). Une question fondamentale demeure toutefois; à savoir si une lésion axonale peut être à l'origine de ces altérations dendritiques précoces dans le processus de dégénérescence des CGRs adultes. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente jaune (YFP) sous le contrôle du promoteur Thy-1, soumises à une axotomie du nerf optique. Aussi, nous avons effectué nos analyses sur les cellules ganglionnaires qui expriment le neurofilament H (NF-H), un marqueur moléculaire exprimé par 4 sous-types de cellules ganglionnaires qui représente soit 36% des CGRs.

Dans notre première étude, nous avons démontré une diminution de l'arbre dendritique de cellules ganglionnaires rétiniennes 3 jours après la lésion axonale. Nos résultats montrent une réduction de 25% de la longueur dendritique totale et de 15% de l'aire dendritique avec un déplacement de la courbe de Sholl vers la gauche pour les CGRs lésées en comparaison avec les cellules ganglionnaires de rétines intactes, caractéristiques d'une diminution de leur complexité. Ces altérations dendritiques ont lieu avant le début de mort neuronale puisqu'à 3 jours nous n'avons observé aucune mort significative dans la rétine.

Aussi, dans notre deuxième étude impliquant l'effet du TNF α sur le remodelage des dendrites des cellules ganglionnaires, nous sommes arrivés à une conclusion semblable. Nous avons démontré que le TNF α injecté dans l'œil de souris YFPH entraîne une diminution de la longueur dendritique totale et une diminution de l'aire dendritique de 40 % et 50% respectivement par rapport aux contrôles. De même, l'analyse de Sholl montre une diminution de la complexité de ces neurones en présence de TNF α . Ces altérations qui ont lieu avant que la mort neuronale ne débute, puisque le TNF α injecté à une concentration de 0,2 ng/ μ l n'induit pas encore de morts dans la rétine à 3 jours post-injection. Par ailleurs, des études ont démontré que l'augmentation du TNF α rétinien entraîne une dégénérescence du nerf optique (Madigan et al., 1996a, Madigan et al., 1996b, Yuan and Neufeld, 2000). Ainsi, nos résultats montrent que l'axotomie et le TNF α induisent un remodelage dendritique des cellules ganglionnaires. Il serait cependant intéressant d'examiner si l'effet du TNF α sur la dégénérescence dendritique est une conséquence directe ou non de son action néfaste sur des neurones du SNC.

Notons que, dans un modèle de glaucome expérimental chez le primate une étude a aussi mis en évidence le rétrécissement de l'arbre dendritique des cellules parasols, ceci avant le début de la mort des CGRs dans la rétine (Weber et al., 1998a). Or, la lésion axonale des CGRs et l'augmentation du TNF α rétinien sécrété par les cellules gliales font partie de la pathophysiologie du glaucome. Nos résultats suggèrent donc que ces deux affectations pourraient agir conjointement pour médier le rétrécissement précoce observé dans le glaucome et représentent des cibles qu'on gagnerait à étudier. Quelles sont donc les voies de signalisation impliquées dans ce remodelage dendritique?

IV.2. ACTIVITÉ DE MTOR DÉPENDANTE DE REDD2

L'activité de mTOR joue un rôle connu important dans les neurones du SNC. Plusieurs études ont montré son activation via la voie PI3K/PTEN/Akt dans le SNC (Park et al., 2008) et particulièrement son importance durant le développement neuronal. En effet, il agit en contrôlant les dimensions des corps cellulaires, la synthèse de protéines locales dans les dendrites, la plasticité synaptique et la croissance dendritique ainsi que la régénérescence axonale (Kwon et al., 2003, Takei et al., 2004, Jaworski et al., 2005, Urbanska et al., 2008). L'expression de mTOR dans les cellules ganglionnaires rétiniennes adultes a été rapportée par Park et collaborateurs, qui ont aussi démontré une expression de mTOR plus faible chez les CGRs adultes par rapport au développement (Park et al., 2008). Aussi, ils ont montré une diminution de mTOR dans les cellules ganglionnaires lésées qu'ils rétablissent via la voie PI3K/Akt. Dans notre étude, nous avons détecté une plus grande proportion de CGRs positive pour la pS6 comparativement à l'étude de Park. Cette différence est principalement due aux sites de phosphorylation du pS6 détectés. Nous avons détecté la phosphorylation au niveau des sérines 240/244 comparativement à la détection des sérines 235/236 l'étude de Park (Park et al., 2008). Cela dit, dans ces deux études la tendance reste la même, c'est-à-dire nous démontrons une diminution de pS6 dans les CGRs et donc de l'activité de mTOR.

En outre, notre étude montre aussi un lien entre l'expression de mTOR et la protéine REDD2 sélectivement dans les CGRs lésées. En effet, nous détectons l'activité de mTOR dans les corps cellulaires des cellules horizontales et des CGRs de rétines saines. Cependant après la coupure axonale nous montrons que l'expression de mTOR est perturbée seulement dans les CGRs. Nos résultats démontrent aussi une augmentation de l'expression de REDD2 dès les 48

premières heures, responsable de la diminution de mTOR. Il a préalablement été montré qu'en réponse à un stress cellulaire tel que l'hypoxie, l'expression de REDD augmente via le facteur inductible de l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor-1 alpha*; HIF-1 α) (Shoshani et al., 2002, Brugarolas et al., 2004). Aussi, en activant le complexe TSC1/TSC2, la protéine REDD2 entraîne une réduction de l'activité de mTOR (Kwon et al., 2003, Corradetti et al., 2005). Or, une augmentation du HIF-1 α a été rapportée dans le modèle de glaucome expérimental (Ergorul et al., 2010, Kanamori et al., 2010) et chez les humains (Tezel and Wax, 2004). Nous pensons que ceci pourrait expliquer l'origine de la modulation de REDD2 dans notre étude. À notre connaissance, nous sommes les premiers à rapporter l'expression de REDD2 dans le SNC. Mis ensemble, ces résultats montrent une diminution de mTOR dépendante de REDD2 dans les cellules ganglionnaires rétiniennes lésées *in vivo*.

De manière intéressante, nos données montrent que l'activité de mTOR a une relation inverse avec l'expression de REDD2. En effet, l'augmentation de REDD2 dans les CGRs corrèle avec la diminution détectée de mTOR. Parallèlement, l'inhibition de l'expression de REDD2 avec le siREDD2 dans la rétine induit une augmentation de l'activité de mTOR. De plus, la modulation de mTOR a lieu précisément dans les CGRs lésées, mais pas dans les cellules horizontales. Nous mettons donc en évidence un nouveau rôle de REDD2 dans la modulation de l'expression de mTOR dans le SNC adulte.

IV.3. LA PROTÉINE MTOR IMPORTANTE POUR LA STABILITÉ ET LE MAINTIEN DES DENDRITES ADULTES

Contrairement à la période développementale durant laquelle les dendrites sont dynamiques, les dendrites de neurones adultes sont plutôt stables, ne subissant que quelques remodelages (Cline, 2001, Jan and Jan, 2003). Cependant, la neuroplasticité dendritique a été rapportée dans plusieurs désordres neurodégénératifs, dont le glaucome. Les mécanismes régulant le rétrécissement dendritique des neurones adultes après l'axotomie du nerf optique ne sont pas connus. La formation et la stabilisation des dendrites durant le développement font intervenir des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Des programmes génétiques comme l'expression de *hamlet* ou des facteurs extrinsèques comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou l'activité neuronale en sont des exemples (Wu and Cline, 1998, Wong and Ghosh, 2002, Cohen-Cory and Lom, 2004, Lin et al., 2013). Durant le développement, mTOR participe à la formation des dendrites en agissant sur leur croissance et leur élaboration, et pourrait intervenir au premier stade de la stabilité neuronale notamment sur le cytosquelette (Jaworski et al., 2005, Jaworski and Sheng, 2006, Swiech et al., 2011). Cela dit, l'implication de mTOR dans la stabilité ou le maintien de ces structures adultes n'était pas clair jusqu'à notre étude. Ici, nous avons identifié l'importance de la voie REDD2/mTOR pour le maintien des dendrites lésées, puisqu'une diminution de mTOR dépendante de REDD2 coïncide avec le rétrécissement dendritique. En conséquence, le traitement des rétines lésées avec l'injection du siREDD2 bloque l'expression de REDD2, et l'augmentation de l'activité de mTOR qui en résulte est à l'origine de la protection dendritique montrée dans la première étude.

Comment mTOR pourrait agir pour induire la stabilité dendritique de neurones adultes? Plusieurs pistes sont envisageables sachant qu'une diminution de mTOR troublerait l'activation de ses effecteurs et des voies sous-jacentes. Tout d'abord, la régulation de la synthèse de protéines pourrait être perturbée, ce qui engendrerait la déstabilisation des dendrites. Un exemple est celui de la protéine BDNF. Il a été démontré que mTOR est importante pour la synthèse du facteur neurotrophique BDNF dans des cultures primaires de neurones corticaux (Takei et al., 2004). Parallèlement, dans un modèle de lésion de la rétine, la présence de BDNF préserve la morphologie des dendrites des CGRs α et β dans la rétine de chats (Weber and Harman, 2008). Ceci suggère que le BDNF est important pour la stabilité dendritique et pourrait médier son action en activant mTOR. Ainsi, nous pouvons inférer que la diminution de la signalisation du BDNF résultant de la diminution de l'expression de son récepteur TrkB suite à une axotomie (Cui et al., 2002), pourrait affecter en retour l'activation de mTOR. Sachant que mTOR est aussi impliqué dans l'expression de BDNF il en résulterait une diminution plus prononcée de l'expression de BDNF dans les rétines lésées. Cependant, il est clair que ces deux protéines sont liées fonctionnellement c'est-à-dire que l'activité de mTOR induit l'initiation de la traduction et la synthèse de protéine telle que le BDNF. Conjointement, le BDNF peut induire l'activation de mTOR via la voie PI3K/Akt (Takei et al., 2004). Dans ce contexte de la coupure du nerf optique, BDNF exogène transporté de manière rétrograde des terminaisons axonales vers le corps cellulaire des CGRs n'arrivera pas à destination. Il s'en suit donc un déficit de ce neurotrophine dans le soma des CGRs responsables de la diminution de l'activité de mTOR. Cet évènement pourrait être le premier.

Un autre exemple est celui des synapses. Il a été démontré que mTOR agit au niveau de la traduction du PSD-95, une protéine du domaine post-synaptique impliquée dans la transmission synaptique excitatrice (Rosen and Stevens, 2010). De ce fait, connaissant l'importance des synapses pour la stabilité des dendrites durant le développement, une diminution de la synthèse de ces protéines dans les neurones matures pourrait avoir un effet perturbateur. Fait intéressant, dans notre étude nous montrons la présence de mTOR dans le compartiment dendritique des CGRs, une caractéristique qui suggère son implication dans la synthèse de protéines locales, comme rapportée dans d'autres neurones du SNC (Takei et al., 2004, Lin and Koleske, 2010). D'ailleurs, mTOR régule la traduction d'ARN messenger présent dans le compartiment dendritique tel que la protéine post-synaptique PSD-95, la CAMKII et la protéine Kv1.1 (Van Buskirk and Cioffi, 1992, Raab-Graham et al., 2006, Ren and Danias, 2010, Rosen and Stevens, 2010). Enfin, mTOR pourrait aussi agir sur des molécules du cytosquelette telles que les protéines associées aux microtubules (MAP2), la CAMKII, IQGAP1 et Clip-170 pour médier le maintien dendritique (Swiech et al., 2011). Mis ensemble, nous avons identifié la voie REDD2/mTOR comme importante dans le maintien des dendrites de neurones matures lésés. Toutefois, les mécanismes exacts régulant le remodelage dendritique doivent encore être élucidés (Figure 19).

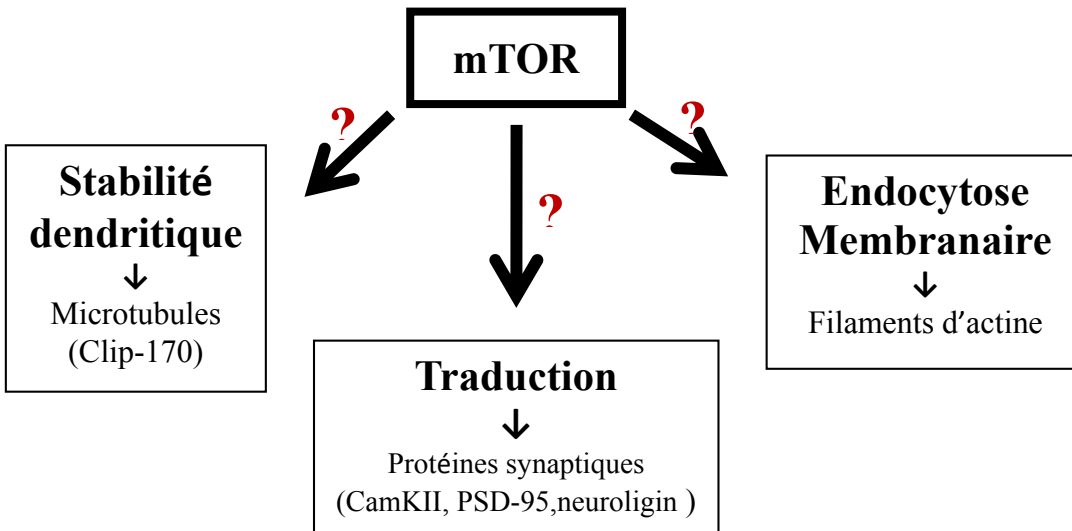


FIGURE 19. Schéma des différentes voies sur lesquelles mTOR pourrait agir pour induire le maintien d'arbres dendritiques de neurones adultes lésés. (Source : Junie Barbara Morquette)

IV.4. MTOR ET LA NEUROPROTECTION DES CGRS LÉSÉES *IN VIVO*.

IV.4.1. L'UTILISATION DE PARNi : UN OUTIL THÉRAPEUTIQUE

Dans la première étude, nous avons utilisé de petits ARN d'interférence comme outils pour médier les stratégies de neuroprotection dendritique et de survie neuronale. Dans un premier temps, nous avons montré qu'une fois introduits dans le vitré, ces pARNi sont rapidement incorporés par les cellules ganglionnaires dans la rétine. Aussi, ces pARNi dirigés contre la protéine REDD2 (siREDD2) se sont révélés efficaces : le siREDD2 produit son effet

très tôt, avec une action ciblée et spécifique pour inhiber la synthèse de la protéine REDD2. Dans notre étude, nous avons démontré que le siREDD2 n'a aucun effet sur l'expression de son homologue, le REDD1. Aussi l'utilisation de pARNi dirigé contre une séquence aléatoire (siCtl) n'a aucun effet sur l'expression de REDD2. Une question demeure toutefois à savoir s'il pourrait y avoir d'autres cibles (*off targets*) du siREDD2 responsable de l'activation de mTOR et de la neuroprotection morphologique et fonctionnelle qui en découle dans les CGRs lésées. Afin d'écarter l'éventualité de l'implication de *off targets*, quelques contrôles supplémentaires pourraient être faits (2003). Tout d'abord, nous pourrions utiliser plusieurs siREDD2 ciblant différentes régions. D'autre part, il s'agirait de faire une expérience de protection (rescue) par l'augmentation de REDD2 dans la rétine lésée traitée avec du siREDD2. Plusieurs pistes sont envisageables telles que l'utilisation de AAV-REDD2, l'utilisation de souris transgéniques et l'utilisation d'un agent pharmacologique. Nous pensons que le dernier pourrait s'avérer avantageux dans l'étude des altérations précoces. Redd2 est exprimé en réponse à l'hypoxie (Shoshani et al., 2002). La desferrioxamine (DFO) un chélateur du fer (Fe^{2+}) mime l'effet de l'hypoxie et induit l'augmentation de REDD2 dans des macrophages dérivés de monocytes humains (Cuaz-Pérolin et al., 2004). Ainsi on pourrait tenter d'induire une augmentation de REDD2 dans les rétines lésées traitées par les siREDD2. L'implication de *off targets* serait alors évidente si les effets de siREDD2 sont encore visibles en présence de l'induction de REDD2. Cela dit, dans notre étude les siREDD2 se sont révélés des outils intéressants pour augmenter l'activité de mTOR et médier les stratégies de neuroprotection à cause de leur rapidité et action ciblée.

Dans la littérature, les voies de signalisation impliquant la PI3K/PTEN/Akt sont aussi utilisées pour augmenter l'expression de mTOR, notamment avec l'utilisation de souris knockouts ou avec des souris knockouts conditionnelles, dans lesquelles l'expression du gène PTEN est supprimée (Hay and Sonenberg, 2004, Jaworski et al., 2005, Park et al., 2008, Punzo et al., 2009). Cependant, dans ces modèles l'expression de mTOR demeure constitutive. Or, il est évident maintenant qu'une trop grande activation de mTOR mène à des aberrations neuronales. Un exemple est celui des neurones ganglionnaires de la corne dorsale (DRGs) du système nerveux périphérique (Abe et al., 2010). Lorsque ces neurones sont lésés, il s'en suit une augmentation de l'activité de mTOR qui entraîne une régénération axonale efficace. Cependant, l'activité de mTOR qui se fait via la suppression de TSC2 dans ces neurones entraîne une déficience lors de l'innervation de leurs cibles. Les auteurs suggèrent alors un contrôle minutieux de mTOR qui permettrait une régénérescence et l'innervation appropriée de ces axones (Abe et al., 2010). Un autre exemple est celui de souris knockouts pour le TSC2 chez lesquelles l'expression de mTOR est constitutive. Dans ces souris, plusieurs anomalies semblables à celle de la maladie humaine de la sclérose tubéreuse ont été rapportées (Zeng et al., 2011). De ce fait, nous pensons que l'utilisation de siREDD2 représente une option thérapeutique qui serait à considérer.

IV.4.2. LA NEUROPROTECTION DES DENDRITES ET LA SURVIE DES CGRS LÉSÉES VIA siREDD2

La neuroprotection des dendrites des neurones lésés est un concept assez nouveau. En effet, plusieurs études ont rapporté des altérations dendritiques lors de pathologies

neurodégénératives, dont le glaucome. Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a encore mis en évidence des stratégies de neuroprotection dendritique en ciblant les voies de signalisation impliquées. Dans notre étude, nous montrons que l'augmentation de mTOR dépendante de REDD2 induit une neuroprotection dendritique dans les neurones lésés. De manière intéressante, l'injection de siREDD2 dans les rétines intactes n'a aucun effet sur la structure des dendrites des CGRs. De même, l'administration de la rapamycine n'a aucun effet sur les dendrites de CGRs non endommagées de souris traitées pendant 3 jours. Ensemble, ceci suggère que la modulation de l'activité de mTOR, et donc ici son augmentation dépendante de REDD2 agirait sur des mécanismes de stabilité et de maintien dendritique qui sont perturbés précisément en situation de lésion neuronale.

Par ailleurs, nos résultats démontrent aussi un rôle de la voie mTOR/REDD2 dans la survie des CGRs axotomisées. En effet, l'utilisation de siREDD2 a permis de prolonger la survie à 5 jours et à 7 jours. Dans d'autres études, la survie des CGRs par l'augmentation de l'activité de mTOR de manière constitutive via la voie mTOR/PTEN/Akt, montre un effet de survie plus prolongée (Park et al., 2008). La différence avec notre étude réside dans le fait que le siREDD2 agit sur une plus courte durée, mais reste néanmoins assez efficace pour jouer un rôle de neuroprotection dendritique et de survie de neurones adultes lésés. Il serait intéressant d'examiner l'effet sur la survie dans un modèle de lésion progressive tel que le glaucome.

Est-ce que l'activité de mTOR contribue au maintien dendritique, à la survie neuronale ou au deux ? Comme mentionné dans la section 1.4.4, des études ont démontré que durant le développement mTOR agit sur le cytosquelette et sur la synthèse de protéines synaptiques pour médier la stabilisation dendritique (Jaworski et al., 2005, Swiech et al., 2011). De plus, notre

étude démontre l'implication de mTOR dans le maintien des structures dendritiques. Parallèlement, l'effet de mTOR dans la survie a été démontré dans plusieurs études, dont une dans un modèle de lésion du nerf optique par écrasement.

Ici nous montrons donc que l'utilisation du siREDD2 est efficace pour induire la neuroprotection du soma et des structures dendritiques des CGRs lésés. Qu'en est-il de leur fonction ?

IV.4.3. NEUROPROTECTION FONCTIONNELLE DES CELLULES GANGLIONNAIRES AXOTOMISÉES

Dans le but d'établir une corrélation entre la structure et la fonction des CGRs adultes lésés, nous avons examiné les propriétés physiologiques de ces neurones. L'étude électrophysiologique des CGRs de type patch-clamp dans le mode *cellule entière*, nous a révélé que les cellules ganglionnaires adultes lésés *in vivo* ont une fréquence de décharge augmentée en réponse à des stimuli lumineux. Cette hyperactivité est liée à un changement des propriétés extrinsèques de la cellule et non des propriétés intrinsèques. En effet, aucun changement n'a été enregistré au niveau de leur potentiel de repos membranaire et de leur résistance cellulaire. Par contre, les CGRs lésés ont une plus grande fréquence de décharges en réponse à la lumière. Corroborant nos résultats, une étude récente montre une augmentation significative de l'activité spontanée des potentiels d'actions des CGRs lésés dans un modèle d'hypertension oculaire induite à l'aide de microbilles chez la souris (Ward et al., 2014). Fait intéressant, les sujets glaucomateux humains souffrent souvent de sensibilité à la lumière, phénomène connu sous le nom de photophobie, qui serait possiblement une conséquence de cette hyperexcitabilité. De

plus, dans un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer une hyperexcitabilité neuronale en lien avec une dégénérescence des dendrites des neurones pyramidaux CA1 a aussi été rapportée il y a quelques mois (Šišková et al. 2014). Somme toute, l'hyperexcitabilité rapportée dans notre étude a aussi été rapportée dans d'autres modèles de neurodégénérescence. Ceci suggère ainsi qu'il existe une corrélation entre la structure et la physiologie des neurones lésés, ce qui pourrait donc avoir des implications pour les maladies neurodégénératives.

Quels seraient les facteurs impliqués dans cette hyperexcitabilité? Vu que seules les propriétés extrinsèques sont impliquées, nous pensons que cette hyperexcitabilité des CGRs serait liée aux nombres et à la force des synapses présentes sur leurs dendrites. Dans un neurone sain, il existe un équilibre entre les synapses excitatrices et inhibitrices. Toutefois, dans les cas pathologiques, la rupture de cet équilibre perturbe le fonctionnement de la cellule. Dans notre contexte, l'hyperexcitabilité des CGRs axotomisées pourrait être due à un déséquilibre entre les synapses excitatrices et inhibitrices. Dans un modèle de glaucome expérimental, Fu et al. ont démontré une diminution de l'expression de la protéine c-Fos, un marqueur de connectivité neuronale (Fu et al., 2009). Parallèlement, dans un modèle de la maladie d'Alzheimer, une perte d'épines dendrique conjointement à une hypexcitabilité et une neurodégénérescence dendritique de neurones pyramidaux CA1 ont été rapporté dans des souris transgéniques. Ceci suggère un lien entre l'hyperexcitabilité et la perte synaptique. De même, dans un modèle d'hypertension oculaire chez le rat, Park et al. montrent à l'aide de la microscopie électronique, une diminution de la zone active au niveau de terminaisons de cellules bipolaires conjointement avec une diminution des vésicules synaptiques liées : les *docked synapses* (Park et al., 2014). Fait intéressant, certaines de nos données non présentées dans cette thèse montrent une

diminution du VGLUT1 (*vesicular glutamatergic transporter -1*) au niveau des dendrites YFP des CGRs lésées (Annexe B, Figure 2). Rappelons que le VGLUT1 est une protéine vésiculaire des synapses en ruban, important pour le transport du glutamate au niveau des terminaisons présynaptiques. Une diminution de marqueurs présynaptiques ne nous indique pas pour autant ce qui se passe au niveau de la réponse des CGRs. Cette diminution en présynaptique pouvant être le résultat d'une compensation synaptique. C'est principalement pour cette raison que l'étude de postsynaptiques est aussi nécessaire. À partir de ces études, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'hyperexcitabilité des CGRs lésées pourrait être en lien avec la modulation de protéines synaptiques. Une manière de le vérifier serait de quantifier l'expression de protéines post-synaptiques présentes dans les synapses excitatrices (PSD-95) et dans les synapses inhibitrices (GABA α 2) respectivement par marquages immunohistochimiques. D'où la question quelle serait la place de mTOR dans cette modulation?

Ici, nous montrons une corrélation entre la voie mTOR/REDD2 et le fonctionnement physiologique des CGRs. En effet, la diminution de mTOR dans les CGRs 3 jours post-axotomie corrèle avec l'hyperexcitabilité de ces neurones lésés lorsque soumis à des stimuli lumineux. L'influence de mTOR sur l'excitabilité des neurones a déjà été démontrée dans quelques études. Par exemple, dans des neurones de l'hippocampe mTOR supprime la traduction dendritique des canaux potassiques Kv1.1 (Raab-Graham et al., 2006). Or la suppression de ces canaux peut induire une augmentation de la décharge et la synchronisation du réseau (Metz et al., 2007, Cudmore et al., 2010). Parallèlement, la voie de signalisation TSC1/mTOR peut moduler l'équilibre entre la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice (Bateup et al., 2013). Dans un futur proche, il serait intéressant de déterminer si

la modulation de la voie REDD2/TSC2/mTOR serait liée à un déséquilibre de l'homéostasie synaptique dans un modèle de lésion menant à l'hyperexcitabilité.

Finalement, nous avons mis en évidence l'importance de l'activité de mTOR dépendante de REDD2 dans la neuroprotection de la fonction des cellules ganglionnaires lésées. L'injection vitréenne de siREDD2 dans les yeux endommagés restaure l'activité neuronale des cellules ganglionnaires lésées à un niveau semblable à celui de cellules intactes. Cela dit, nous avons été dans l'impossibilité d'enregistrer des décharges de CGRs lésées, traitées avec du siCtl ou avec du PBS. Ces données suggèrent que la combinaison de l'axotomie et de l'injection intraoculaire est néfaste pour les propriétés électrophysiologiques des CGRs. La perte de réponse à la lumière des CGRs sujettes à l'axotomie et à l'injection intravitréale suggère que des lésions multiples au niveau de l'œil sont néfastes pour la fonction des CGRs. Cette observation mériterait toutefois davantage d'investigation. Cela dit, nous avons démontré qu'en présence de siREDD2 le fonctionnement normal des cellules ganglionnaires est préservé malgré la lésion.

Quelles sont donc les implications possibles de nos résultats pour les maladies neurodégénératives telles que le glaucome et la maladie d'Alzheimer? Dans ces maladies le remodelage dendritique a déjà été rapporté. Selon notre étude, nous montrons que les altérations dendritiques peuvent être des signes précoces de la dégénérescence neuronale. Il importe de noter que nous ne savons pas encore si les altérations dendritiques précèdent ou succèdent aux pertes synaptiques rapportées dans la littérature. Toutefois, nous pensons que la détection précoce de la neuroplasticité ouvre une potentielle fenêtre d'intervention thérapeutique. Les

évidences lors du développement dendritique montrent que la formation et la stabilisation des dendrites sont étroitement liées à la présence des synapses d'après l'hypothèse synaptotrophique (Vaughn et al., 1988). Cependant quand on envisage la séquence de la perte dendritique et synaptique, on peut spéculer qu'il serait possible que des changements moléculaires surviennent dans les dendrites avant une perte synaptique. Dans ce cas, des mécanismes induisant la rétraction dendritique commenceraient, avant le déficit fonctionnel ou morphologique des synapses. En plus, on pourrait spéculer qu'une baisse du transport de certains ARNm ou de la traduction de certaines protéines synaptiques qui en résulteraient dans les dendrites pourraient être impliquées. De plus amples expériences sont nécessaires pour tester ces hypothèses.

Il est clair que la cytokine pro-inflammatoire, le $TNF\alpha$, induit la dégénérescence dendritique et pourrait aussi contribuer à la neurodégénérescence rapportée dans le glaucome et d'autres maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer. Quel pourrait être la suite de ce projet ? La suite pourrait se faire dans un modèle de glaucome puisque la présence de $TNF\alpha$ y a déjà été rapportée. Il faudrait donc valider l'expression de $TNF\alpha$ dans ce modèle expérimental, s'assurer qu'il y a remodelage des structures dendritiques en lien avec la présence de $TNF\alpha$. Pour cela, une expérience simple serait d'investiguer la morphologie dendritique, dans ce modèle de glaucome, chez des souris ayant reçu un traitement avec un inhibiteur de $TNF\alpha$ tel que l'étanercept ou Xpro. Ensuite, il serait intéressant d'investiguer si le $TNF\alpha$ produit son effet sur les dendrites via la voie REDD2/mTOR. À notre connaissance, la voie de signalisation mTOR/REDD2 n'a pas été rapportée dans le glaucome. Cependant, dans le glaucome ou l'inflammation l'expression de HIF-1 α a été rapportée. Il serait judicieux d'établir

si l'expression de HIF-1 α un activateur de l'expression de REDD2 pourrait être le médiateur de TNF α (Figure 20).

Somme toute, il serait intéressant d'investiguer dans quelle mesure la neuroprotection dendritique et synaptique via l'activation de la voie REDD2/mTOR pourrait médier la survie et la fonction de neurones adultes lésés, dans un cas pathologique.

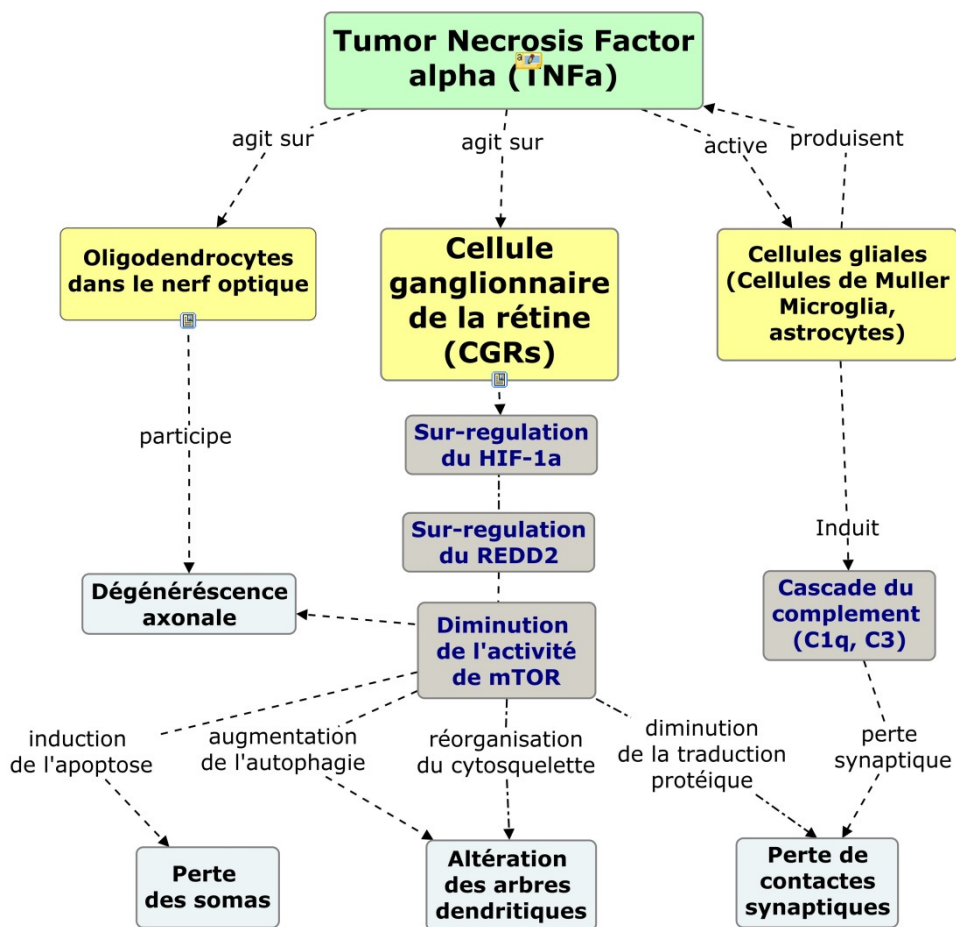


FIGURE 20. Carte conceptuelle des voies de signalisation envisageable par lesquelles le TNF α induit le remodelage des dendrites des CGRs. (Source : Junie Barbara Morquette)

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans cette thèse, nous montrons qu'un remodelage dendritique précoce survient dans les CGRs ayant subi une axotomie ou en présence de $TNF\alpha$. De plus, nous avons mis en évidence l'implication de la voie REDD2/mTOR dans la survie, le maintien dendritique et la fonction des neurones adultes.

Lors d'un dommage axonal, les CGRs subissent des changements morphologiques, physiologiques et biochimiques. Dans cette thèse, nous avons mis en évidence que le remodelage dendritique des CGRs lésées survient avant l'atrophie ou la mort (perte) de leur soma. Aussi, l'axotomie engendre une hyperactivité suite à des changements au niveau des propriétés extrinsèques. Parallèlement, nous avons montré l'importance de la voie de signalisation de REDD2/mTOR comme étant importante dans ces changements puisque l'expression de mTOR dépendante de REDD2 diminue après la lésion. Aussi, une thérapie génique utilisant un *petit ARN interférent* contre REDD2 (flèche et cercle en vert de la figure 21) entraîne une réactivation de l'expression de mTOR. En plus de préserver les structures dendritiques, l'activation de mTOR via REDD2 protège la fonction cellulaire et prolonge la survie des cellules ganglionnaires. Ainsi, dans cette thèse nous montrons un nouveau rôle de mTOR dans le maintien des structures dendritiques de neurones lésés.

En perspective, nous pensons que d'autres études seraient nécessaires pour identifier des acteurs clés, en aval de REDD2/mTOR, responsables de la stabilisation et du maintien des neurones adultes sains ou restaurés. Par exemple, il serait intéressant de comprendre quelles protéines du cytosquelette sont impliquées ou d'examiner l'expression des protéines synaptiques (Figure 19). D'ailleurs, une expérience dont le résultat pourrait s'avérer intéressant

serait d'analyser par immunohistochimie l'expression de protéines post-synaptiques excitatrices (par ex. le PSD-95) et inhibitrices (par ex. le récepteur GABA-a) dans les CGRs lésées et traitées. L'analyse devrait être effectuée sur coupes transversales à des intervalles de temps différents, dont à 3 jours post-axotomie. On comprendrait alors si la rétraction dendritique précoce, en lien avec la baisse de mTOR, corrèle avec un déséquilibre de l'homéostasie synaptique.

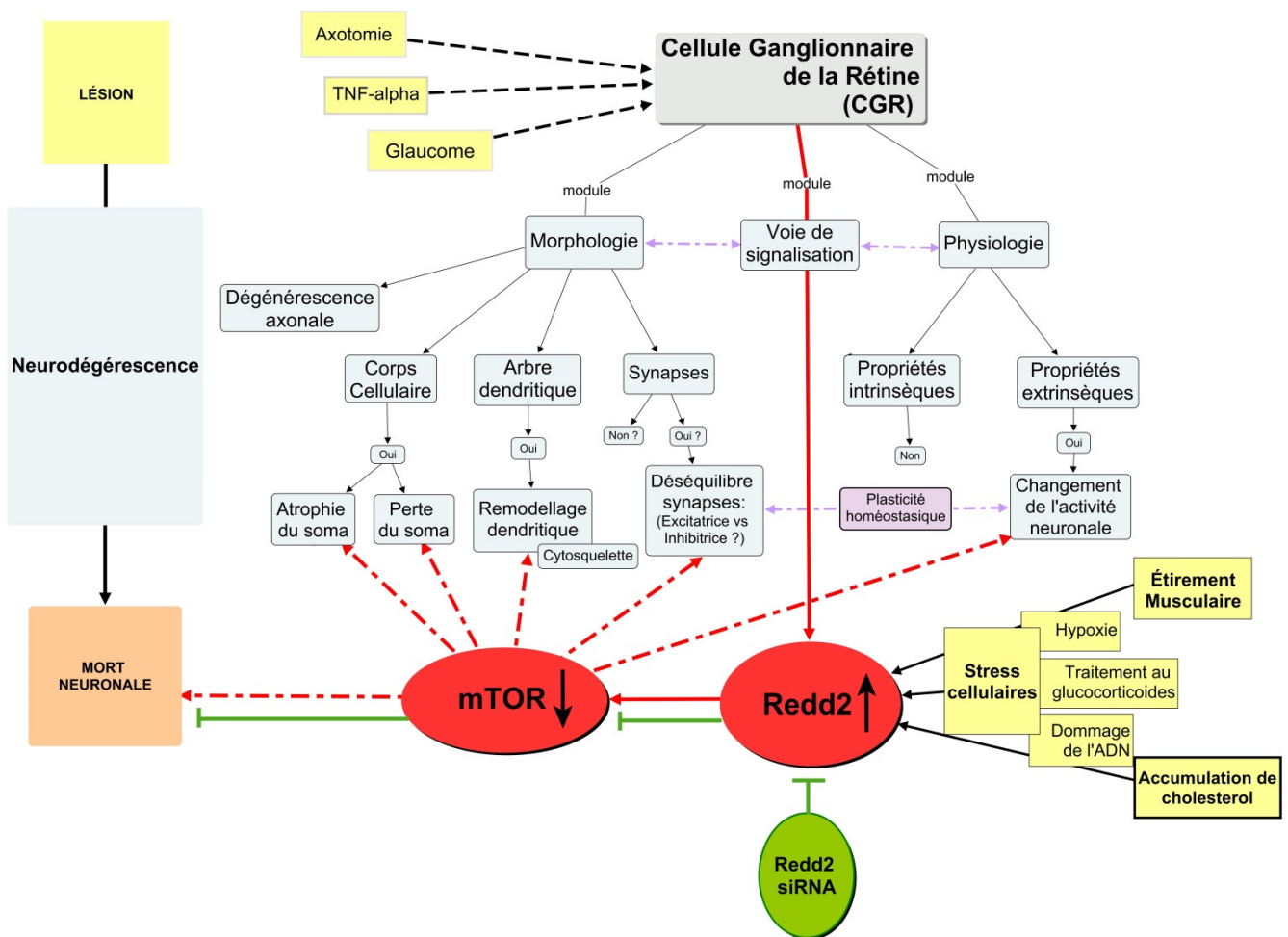


FIGURE 21. Résumé des conclusions de la thèse. (Source : Junie Barbara Morquette)

Par ailleurs, nous avons aussi mis en évidence que le TNF α peut induire une altération dendritique. Ceci n'a jamais été démontré auparavant et nous croyons que cela apporte une nouvelle compréhension de la dégénérescence neuronale dans la neuro-inflammation (Annexe B, Figure 3).

Tout compte fait, les évidences présentées dans cette thèse contribuent à la compréhension de la pathologie dendritique dans la neurodégénérescence. Nous pensons aussi que cela ouvre une nouvelle perspective dans l'élaboration de stratégies de neuroprotection de maladies neurodégénératives telles que le glaucome, l'Alzheimer et le Parkinson dans lesquels la pathologie dendritique est de plus en plus évidente.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe N, Borson SH, Gambello MJ, Wang F, Cavalli V (2010) Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Activation Increases Axonal Growth Capacity of Injured Peripheral Nerves. *Journal of Biological Chemistry* 285:28034-28043.
- Agarwal R, Agarwal P (2012) Glaucomatous neurodegeneration: An eye on tumor necrosis factor- α . *Indian Journal of ophtalmology* 60:255-261.
- Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, Stevens B, Tenner AJ (2008) The complement cascade: Yin–Yang in neuroinflammation – neuro-protection and -degeneration. *Journal of Neurochemistry* 107:1169-1187.
- Almasieh M, MacIntyre JN, Pouliot M, Casanova C, Vaucher E, Kelly MEM, Di Polo A (2013) Acetylcholinesterase Inhibition Promotes Retinal Vasoprotection and Increases Ocular Blood Flow in Experimental Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54:3171-3183.
- Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A (2012) The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research* 31:152-181.
- Almasieh M, Zhou Y, Kelly ME, Casanova C, Di Polo A (2010) Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Death & Disease* 1:e27-e27.
- Amthor FR, Oyster CW, Takahashi ES (1984) Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Research* 298:187-190.
- Arancio O, Chao MV (2007) Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. *Current Opinion in Neurobiology* 17:325-330.
- Baas PW, Lin S (2011) Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron. *Developmental Neurobiology* 71:403-418.
- Balaiya S, Edwards J, Tillis T, Khetpal V, Chalam KV (2011) Tumor necrosis factor- α levels in aqueous humor of primary open angle glaucoma. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)* 5:553-556.
- Balazsi A, Rootman J, Drance S, Schulzer M, Douglas G (1984) The effect of age on the nerve fiber population of the human optic nerve. *Am J Ophtalmol* 97:760-766.
- Baloyannis SJ (2009) Dendritic pathology in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 283:153-157.

- Bansal A, Singer JH, Hwang BJ, Xu W, Beaudet A, Feller MB (2000) Mice Lacking Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits Exhibit Dramatically Altered Spontaneous Activity Patterns and Reveal a Limited Role for Retinal Waves in Forming ON and OFF Circuits in the Inner Retina. *J Neurosci* 20:7672-7681.
- Barnes CA (1994) Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends in Neurosciences* 17:13-18.
- Bateup HS, Johnson CA, Denefrio CL, Saulnier JL, Kornacker K, Sabatini BL (2013) Excitatory/inhibitory synaptic imbalance leads to hippocampal hyperexcitability in mouse models of Tuberous Sclerosis. *Neuron* 78:510-522.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of Synaptic Strength by Glial TNF α . *Science* 295:2282-2285.
- Beattie MS, Ferguson AR, Bresnahan JC (2010) AMPA-receptor trafficking and injury-induced cell death. *European Journal of Neuroscience* 32:290-297.
- Belkhelfa M, Rafa H, Medjeber O, Arroul-Lammali A, Behairi N, Abada-Bendib M, Makrelouf M, Belarbi S, Masmoudi AN, Tazir M, Touil-Boukoffa C (2014) IFN- γ and TNF- α Are Involved During Alzheimer Disease Progression and Correlate with Nitric Oxide Production: A Study in Algerian Patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 34:839-847.
- Benoit ME, Tenner AJ (2011) Complement Protein C1q-Mediated Neuroprotection Is Correlated with Regulation of Neuronal Gene and MicroRNA Expression. *The Journal of Neuroscience* 31:3459-3469.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14:4368-4374.
- Blanch RJ, Ahmed Z, Berry M, Scott RAH, Logan A (2012) Animal Models of Retinal Injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:2913-2920.
- Bodnarenko SR, Chalupa LM (1993) Stratification of ON and OFF ganglion cell dendrites depends on glutamate-mediated afferent activity in the developing retina. *Nature* 364:144-146.
- Bodnarenko SR, Jeyarasasingam G, Chalupa LM (1995) Development and regulation of dendritic stratification in retinal ganglion cells by glutamate-mediated afferent activity. *J Neurosci* 15:7037-7045.
- Bonfanti L, Strettoi E, Chierzi S, Cenni MC, Liu X-H, Martinou J-C, Maffei L, Rabacchi SA (1996) Protection of Retinal Ganglion Cells from Natural and Axotomy-Induced Cell

Death in Neonatal Transgenic Mice Overexpressing bcl-2. *The Journal of Neuroscience* 16:4186-4194.

- Boycott BB, Wässle H (1974) The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* 240:397-419.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A (2009) Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research* 28:423-451.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stępien A (2008) Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neuroscience Letters* 441:158-162.
- Brugarolas J, Lei K, Hurley LR, Manning DB, Reiling HJ, Hafen E, Witters AL, Ellisen WL, Kaelin J, William (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *GENES & DEVELOPMENT* 18:2893-2904.
- Burke SN, Barnes CA (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30-40.
- Cajal SR (1952) *Histology du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Edition Francaise revue et mise a jour par l'auteur: Instituto Ramon y Cajal.
- Casson RJ (2006) Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 34:54-63.
- Cavallotti C, Artico M, Pescosolido N, Feher J (2001) Age-related changes in rat retina. *Jpn J Ophthalmol* 45:68-75.
- Cavallotti C, Artico M, Pescosolido N, Leali F, Feher J (2004) Age-related changes in the human retina. *Can J Ophthalmol* 39:61-68.
- Cellerino A, Galli-Resta L, Colombaioni L (2000) *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):RC92. The dynamics of neuronal death: a time-lapse study in the retina.
- Cellerino A1, Galli-Resta L, Colombaioni L. *J Neurosci* 20:RC92.
- Cepko C (2014) Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nat Rev Neurosci* 15:615-627.
- Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:589-595.

- Chalupa LM, Gunhan E (2004) Development of On and Off retinal pathways and retinogeniculate projections. *Prog Retin Eye Res* 2004 Jan;23(1):31-51 23:31-51.
- Chen G, Goeddel DV (2002) TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 296:1634-1635.
- Cheng L, Sapielha P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A (2002) TrkB Gene Transfer Protects Retinal Ganglion Cells from Axotomy-Induced Death In Vivo. *J Neurosci* 22:3977-3986.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death. *Annual Review of Neuroscience* 13:171-182.
- Chow DK, Groszer M, Pribadi M, Machniki M, Carmichael ST, Liu X, Trachtenberg JT (2009) Laminar and compartmental regulation of dendritic growth in mature cortex. *Nature neuroscience* 12:116-118.
- Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J (1992) Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69:1227-1236.
- Cline HT (2001) Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 11:118-126.
- Cohen-Cory S, Lom B (2004) Neurotrophic regulation of retinal ganglion cell synaptic connectivity: from axons and dendrites to synapses *International Journal Developmental Biology* 48:947-956.
- Coleman AL, Miglior S (2008) Risk Factors for Glaucoma Onset and Progression. *Survey of Ophthalmology* 53:S3-S10.
- Coleman PD, Flood DG (1987) Neuron numbers and dendritic extend in normal aging and alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 8:521-545.
- Çomoğlu SS, Güven H, Acar M, Öztürk G, Koçer B (2013) Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 553:63-67.
- Coombs J, van der List D, Wang GY, Chalupa LM (2006) Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience* 140:123-136.
- Coombs JL, Van Der List D, Chalupa Leo M (2007) Morphological properties of mouse retinal ganglion cells during postnatal development. *The Journal of Comparative Neurology* 503:803-814.
- Corradetti MN, Inoki K, Guan K-L (2005) The Stress-induced Proteins RTP801 and RTP801L Are Negative Regulators of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 280:9769-9772.

- Cuaz-Pérolin C, Furman C, Larigauderie G, Legedz L, Lasselin C, Copin C, Jaye M, Searfoss G, Yu KT, Duverger N, Nègre-Salvayre A, Fruchart J-C, Rouis M (2004) REDD2 Gene Is Upregulated by Modified LDL or Hypoxia and Mediates Human Macrophage Cell Death. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24:1830-1835.
- Cudmore RH, Fronzaroli-Molinieres L, Giraud P, Debanne D (2010) Spike-Time Precision and Network Synchrony Are Controlled by the Homeostatic Regulation of the D-Type Potassium Current. *The Journal of Neuroscience* 30:12885-12895.
- Cueva Vargas J, Osswald I, Unsain N, Barker P, Bowie D, Di Polo A (2011) Tumor necrosis factor-alpha and calcium permeable AMPA receptors mediate retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO Supp)* 52.
- Cui Q, Tang LS, Hu B, So K-F, Yip HK (2002) Expression of trkA, trkB, and trkC in Injured and Regenerating Retinal Ganglion Cells of Adult Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1954-1964.
- Cui Qi, Yip HK, Zhao RCH, So K-F, Harvey AR (2003) Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 22:49-61.
- Curcio CA, Millican CL, Allen KA, Kalina RE (1993) Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34:3278-3296.
- Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J (2003) Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 31:2705-2716.
- Dacey DM, Packer OS (2003) Colour coding in the primate retina: diverse cell types and cone-specific circuitry. *Current Opinion in Neurobiology* 13:421-427.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience* 16:2983-2994.
- Dandona L, Dandona R (2006) What is the global burden of visual impairment? *BMC Medicine* 4:6.
- De Brabander J, Kramers R, Uylings H (1998) Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 10:1261-1269.
- Deiters VS, Guillery RW (2013) Otto Friedrich Karl Deiters (1834–1863). *Journal of Comparative Neurology* 521:1929-1953.

- Del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Ji D, Manso AG, Osborne NN (2013) RTP801 immunoreactivity in retinal ganglion cells and its down-regulation in cultured cells protect them from light and cobalt chloride. *Brain Research Bulletin* 98:132-144.
- Della Santina L, Inman DM, Lupien CB, Horner PJ, Wong ROL (2013) Differential Progression of Structural and Functional Alterations in Distinct Retinal Ganglion Cell Types in a Mouse Model of Glaucoma. *The Journal of Neuroscience* 33:17444-17457.
- Derouiche A, Rauen T (1995) Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 42:131-143.
- DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW (2008) Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. *Genes & Development* 22:239-251.
- Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *PNAS* 95:3978-3983.
- Diao L, Sun W, Deng Q, He S (2004) Development of the mouse retina: Emerging morphological diversity of the ganglion cells. *Journal of Neurobiology* 61:236-249.
- Dräger UC, Olsen JF (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 20:285-293.
- Drake CT, Milner TA, Patterson SL (1999) Ultrastructural Localization of Full-Length trkB Immunoreactivity in Rat Hippocampus Suggests Multiple Roles in Modulating Activity-Dependent Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience* 19:8009-8026.
- Dreher B, Sefton AJ, Ni SY, G. N (1985) The morphology, number, distribution and central projections of Class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav Evol* 26:10-48.
- Editorial (2003) Whither RNAi? *Nat Cell Biol* 5:489-490.
- Eliasieh K, Liets LC, Chalupa LM (2007) Cellular Reorganization in the Human Retina during Normal Aging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48:2824-2830.
- Ergorul C, Ray A, Huang W, Wang D, Ben Y, Cantuti-Castelvetri I, Grosskreutz C (2010) Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) and Some HIF-1 Target Genes are Elevated in Experimental Glaucoma. *J Mol Neurosci* 42:183-191.
- Famiglietti EJ, Kolb H (1976) Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 194:193-195.

- Farris S, Lewandowski G, Cox CD, Steward O (2014) Selective Localization of Arc mRNA in Dendrites Involves Activity- and Translation-Dependent mRNA Degradation. *The Journal of Neuroscience* 34:4481-4493.
- Feng G, Mellor R, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen Q, Wallace M, Nerbonne J, Lichtman J, Sanes J (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41 - 51.
- Feng L, Zhao Y, Yoshida M, Chen H, Yang JF, Kim TS, Cang J, Troy JB, Liu X (2013) Sustained Ocular Hypertension Induces Dendritic Degeneration of Mouse Retinal Ganglion Cells That Depends on Cell Type and Location. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54:1106-1117.
- Fischer D, Heiduschka P, Thanos S (2001) Lens-Injury-Stimulated Axonal Regeneration throughout the Optic Pathway of Adult Rats. *Experimental Neurology* 172:257-272.
- Fu Q, Li X, Shi J, Xu G, Wen W, Lee D, So K (2009) Synaptic degeneration of retinal ganglion cells in a rat ocular hypertension glaucoma model. *Cell Mol Neurobiol* 29:575 - 581.
- Fukazawa H, Tsukie T, Higashida K, Fujikura M, Ono S (2013) An immunohistochemical study of increased tumor necrosis factor- α in the skin of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience* 20:1371-1376.
- Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011) Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: Quantitative and topographic time course analyses. *Experimental Eye Research* 92:377-387.
- Gao H, Hollyfield JG (1992) Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 33:1-17.
- Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D (2002) Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 4:699-704.
- Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC (1994) Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol* 25:431-438.
- Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma S (1995) Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61:33 - 44.
- Goldberg JL (2004) Intrinsic neuronal regulation of axon and dendrite growth. *Current Opinion in Neurobiology* 14:551-557.

- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002) Amacrine-Signaled Loss of Intrinsic Axon Growth Ability by Retinal Ganglion Cells. *Science* 296:1860-1864.
- Grill JD, Riddle DR (2002) Age-related and laminar-specific dendritic changes in the medial frontal cortex of the rat. *Brain Research* 937:8-21.
- Guo Y, Johnson E, Cepurna W, Jia L, Dyck J, Morrison J (2009) Does elevated intraocular pressure reduce retinal TRKB-mediated survival signaling in experimental glaucoma? *Experimental Eye Research* 89:921-933.
- Gupta N, Ly T, Zhang Q, Kaufman P, Weinreb R, Ycel Y (2007) Chronic ocular hypertension induces dendrite pathology in the lateral geniculate nucleus of the brain. *Experimental Eye Research* 84:176-184.
- Hansen M, Hsu A-L, Dillin A, Kenyon C (2005) New Genes Tied to Endocrine, Metabolic, and Dietary Regulation of Lifespan from a *Caenorhabditis elegans* Genomic RNAi Screen. *PLoS Genet* 1:e17.
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110:177-189.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *The EMBO Journal* 20:5887-5897.
- Harvey AR, Hellström M, Rodger J (2009) Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway. In: *Progress in Brain Research*, vol. Volume 175 (Joost Verhaagen, E. M. H. I. H. J. W. A. B. B. G. J. B. and Dick, F. S., eds), pp 151-161: Elsevier.
- Hattar S, Liao H-W, Takao M, Berson DM, Yau K-W (2002) Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science* 295:1065-1070.
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 18:1926-1945.
- Hendry SH, Calkins DJ (1998) Neuronal chemistry and functional organization in the primate visual system. *Trends in Neurosciences* 21:344-349.
- Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC, Beattie MS (2001) Tumor Necrosis Factor- α Induces cFOS and Strongly Potentiates Glutamate-Mediated Cell Death in the Rat Spinal Cord. *Neurobiology of Disease* 8:590-599.
- Hernandez MR (2000) The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Progress in Retinal and Eye Research* 19:297-321.

- Hochstein S, Shapley RM (1976) Quantitative analysis of retinal ganglion cell classifications. *J Physiol* 262:237-264.
- Holcik M, Gibson H, Korneluk RG (2001) XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 6:253-261.
- Howell G, Soto I, Ryan M, Graham L, Smith R, John S (2013) Deficiency of complement component 5 ameliorates glaucoma in DBA/2J mice. *Journal of Neuroinflammation* 10:76.
- Howell GR, Macalinao DG, Sousa GL, Walden M, Soto I, Kneeland SC, Barbay JM, King BL, Marchant JK, Hibbs M (2011) Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest* 121:1429 - 1444.
- Hüll M, Bähr M (1994) Differential regulation of c-JUN expression in rat retinal ganglion cells after proximal and distal optic nerve transection. *Neuroscience Letters* 178:39-42.
- Ikenoue T, Hong S, Inoki K (2009) Chapter 11 Monitoring Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Activity. In: *Methods in Enzymology*, vol. Volume 452 (Daniel, J. K., ed), pp 165-180: Academic Press.
- Imen J-S, Billiet L, Cuaz-Pérolin C, Michaud N, Rouis M (2009) The regulated in development and DNA damage response 2 (REDD2) gene mediates human monocyte cell death through a reduction in thioredoxin-1 expression. *Free Radical Biology and Medicine* 46:1404-1410.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4:648-657.
- Isenmann S, Kretz A, Cellierino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 22:483-543.
- Ito Y, Shimazawa M, Chen Y-N, Tsuruma K, Yamashita T, Araie M, Hara H (2009) Morphological changes in the visual pathway induced by experimental glaucoma in Japanese monkeys. *Experimental Eye Research* 89:246-255.
- Iturbe U, Preto J, A L (2008) The young Ramón y Cajal as a cell-theory dissenter. *Int Microbiol* 11:143-145.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6:1122-1128.

- Jan Y-N, Jan LY (2003) The Control of Dendrite Development. *Neuron* 40:229-242.
- Janssen KT, Mac Nair CE, Dietz JA, Schlamp CL, Nickells RW (2013) Nuclear Atrophy of Retinal Ganglion Cells Precedes the Bax-Dependent Stage of Apoptosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54:1805-1815.
- Jaworski J, Sheng M (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 34:205-219.
- Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M (2005) Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *J Neurosci* 25:11300-11312.
- Jefferies HBJ, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k.
- Jeon C-J, Strettoi E, Masland RH (1998) The Major Cell Populations of the Mouse Retina. *J Neurosci* 18:8936-8946.
- John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, Davisson M, Roderick TH, Heckenlively JR (1998) Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39:951-962.
- Jontes JD, Buchanan J, Smith SJ (2000) Growth cone and dendrite dynamics in zebrafish embryos: early events in synaptogenesis imaged in vivo. *Nat Neurosci* 3:231-237.
- Jontes JD, Smith SJ (2000) Filopodia, Spines, and the Generation of Synaptic Diversity. *Neuron* 27:11-14.
- Kalesnykas G, Oglesby EN, Zack DJ, Cone FE, Steinhart MR, Tian J, Pease ME, Quigley HA (2012) Retinal Ganglion Cell Morphology after Optic Nerve Crush and Experimental Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:3847-3857.
- Kanamori A, Catrinescu M-M, Kanamori N, Mears KA, Beaubien R, Levin LA (2010) Superoxide is an associated signal for apoptosis in axonal injury.
- Kandel ER, Schwartz J, Jessell T (2000) *Principles of Neural Science*, Fourth Edition
- Kang H, Schuman EM (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267:1658-1662.
- Katz ML, Robison WG (1986) Evidence of cell loss from the rat retina during senescence. *Experimental Eye Research* 42:293-304.
- Kaur C, Foulds WS, Ling E-A (2008) Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)* 2:879-889.

- Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ (2000) Müller Cell Protection of Rat Retinal Ganglion Cells from Glutamate and Nitric Oxide Neurotoxicity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41:3444-3450.
- Kim D, Sarbassov D, Ali S, King J, Latek R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini D (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-175.
- Kim E (2009) Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr Res Pract* 3:64-71.
- Kim I-J, Zhang Y, Meister M, Sanes JR (2010) Laminar Restriction of Retinal Ganglion Cell Dendrites and Axons: Subtype-Specific Developmental Patterns Revealed with Transgenic Markers. *The Journal of Neuroscience* 30:1452-1462.
- Kim SH, Munemasa Y, Kwong JMK, Ahn JH, Mareninov S, Gordon LK, Caprioli J, Piri N (2008) Activation of autophagy in retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience Research* 86:2943-2951.
- Kimura T, Murakami F (2014) Evidence That Dendritic Mitochondria Negatively Regulate Dendritic Branching in Pyramidal Neurons in the Neocortex. *The Journal of Neuroscience* 34:6938-6951.
- Kindler S, Kreienkamp H-J (2012) Dendritic mRNA Targeting and Translation. In: *Synaptic Plasticity*, vol. 970 (Kreutz, M. R. and Sala, C., eds), pp 285-305: Springer Vienna.
- Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kwong JMK, Ross-Cisneros FN, Wang J, Tsai RK, Sadun AA, Lam TT (2006) TNF- α -Induced Optic Nerve Degeneration and Nuclear Factor- κ B p65. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47:1448-1457.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T (2001) Activity-Dependent Transfer of Brain-Derived Neurotrophic Factor to Postsynaptic Neurons. *Science* 291:2419-2423.
- Koleske AJ (2013) Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci* 14:536-550.
- Kong J-H, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH (2005) Diversity of ganglion cells in the mouse retina: Unsupervised morphological classification and its limits. *The Journal of Comparative Neurology* 489:293-310.
- Kuehn MH, Kim CY, Jiang B, Dumitrescu AV, Kwon YH (2008) Disruption of the complement cascade delays retinal ganglion cell death following retinal ischemia-reperfusion. *Experimental Eye Research* 87:89-95.

- Kuehn MH, Kim CY, Ostojic J, Bellin M, Alward WL, Stone EM, Sakaguchi DS, Grozdanic SD, Kwon YH (2006) Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension. *Exp Eye Res* 83:620 - 628.
- Kugler S, Straten G, Kreppel F, Isenmann S, Liston P, Bahr M (2000) The X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) prevents cell death in axotomized CNS neurons in vivo. *Cell Death Differ* 7.
- Kurimoto T, Yin Y, Omura K, Gilbert H-y, Kim D, Cen L-P, Moko L, Kügler S, Benowitz LI (2010) Long-Distance Axon Regeneration in the Mature Optic Nerve: Contributions of Oncomodulin, cAMP, and pten Gene Deletion. *The Journal of Neuroscience* 30:15654-15663.
- Kwon C-H, Zhu X, Zhang J, Baker SJ (2003) mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:12923-12928.
- Lam TT, Abler AS, Kwong JMK, Tso MOM (1999) N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)-Induced Apoptosis in Rat Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40:2391-2397.
- Lambris JD, Adamis AP, Rosen AM, Stevens B (2010) The Role of the Classical Complement Cascade in Synapse Loss During Development and Glaucoma. In: *Inflammation and Retinal Disease: Complement Biology and Pathology*, vol. 703, pp 75-93: Springer New York.
- Laplante M, Sabatini DM (2013) Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science* 126:1713-1719.
- Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A (2009) Inhibition of p75NTR in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 40:410-420.
- Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D (2012) Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation. *Neurobiology of Disease* 46:314-324.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens Injury Stimulates Axon Regeneration in the Mature Rat Optic Nerve. *The Journal of Neuroscience* 20:4615-4626.
- Leske MC (2007) Open-Angle Glaucoma—An Epidemiologic Overview. *Ophthalmic Epidemiology* 14:166-172.
- Leung CK-s, Weinreb RN, Li ZW, Liu S, Lindsey JD, Choi N, Liu L, Cheung CY-l, Ye C, Qiu K, Chen LJ, Yung WH, Crowston JG, Pu M, So KF, Pang CP, Lam DSC (2011)

Long-Term In Vivo Imaging and Measurement of Dendritic Shrinkage of Retinal Ganglion Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52:1539-1547.

Levin LA, Gordon LK (2002) Retinal ganglion cell disorders: types and treatments. *Progress in Retinal and Eye Research* 21:465-484.

Lewin A, Drenser K, Hauswirth W, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery J, LaVail M (1998) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med* 4:967-971.

Li Y, Inoki K, Vacratsis P, Guan K-L (2003) The p38 and MK2 Kinase Cascade Phosphorylates Tuberin, the Tuberous Sclerosis 2 Gene Product, and Enhances Its Interaction with 14-3-3. *Journal of Biological Chemistry* 278:13663-13671.

Li Y, Inoki K, Yeung R, Guan K-L (2002) Regulation of TSC2 by 14-3-3 Binding. *Journal of Biological Chemistry* 277:44593-44596.

Li Z-w, Liu S, Weinreb RN, Lindsey JD, Yu M, Liu L, Ye C, Cui Q, Yung W-h, Pang C-P, Lam DSC, Leung CK-s (2011) Tracking Dendritic Shrinkage of Retinal Ganglion Cells after Acute Elevation of Intraocular Pressure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52:7205-7212.

Libby RT, Anderson MG, Pang I-H, Robinson ZH, Savinova OV, Cosma IM, Snow AMY, Wilson LA, Smith RS, Clark AF, John SWM (2005a) Inherited glaucoma in DBA/2J mice: Pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Visual Neuroscience* 22:637-648.

Libby RT, Li Y, Savinova OV, Barter J, Smith RS, Nickells RW, John SWM (2005b) Susceptibility to Neurodegeneration in a Glaucoma Is Modified by *Bax* Gene Dosage. *PLoS Genet* 1:e4.

Liets LC, Eliasieh K, van der List DA, Chalupa LM (2006) Dendrites of rod bipolar cells sprout in normal aging retina. *PNAS* 103:12156-12160.

Lin Y-C, Koleske AJ (2010) Mechanisms of Synapse and Dendrite Maintenance and Their Disruption in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders. In: *Annual Review of Neuroscience*, vol. 33, pp 349-378.

Lin Y-C, Yeckel MF, Koleske AJ (2013) Abl2/Arg Controls Dendritic Spine and Dendrite Arbor Stability via Distinct Cytoskeletal Control Pathways. *The Journal of Neuroscience* 33:1846-1857.

Liu M, Duggan J, Salt TE, Cordeiro MF (2011) Dendritic changes in visual pathways in glaucoma and other neurodegenerative conditions. *Experimental Eye Research* 92:244-250.

- Liu X, Grishanin RN, Tolwani RJ, Renteria RC, Xu B, Reichardt LF, Copenhagen DR (2007) Brain-Derived Neurotrophic Factor and TrkB Modulate Visual Experience-Dependent Refinement of Neuronal Pathways in Retina. *J Neurosci* 27:7256-7267.
- Livesey FJ, Cepko CL (2001) Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2:109-118.
- Lom B, Cogen J, Sanchez AL, Vu T, Cohen-Cory S (2002) Local and Target-Derived Brain-Derived Neurotrophic Factor Exert Opposing Effects on the Dendritic Arborization of Retinal Ganglion Cells In Vivo. *J Neurosci* 22:7639-7649.
- Lom B, Cohen-Cory S (1999) Brain-Derived Neurotrophic Factor Differentially Regulates Retinal Ganglion Cell Dendritic and Axonal Arborization In Vivo. *The Journal of Neuroscience* 19:9928-9938.
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J (2005) Rheb Binds and Regulates the mTOR Kinase. *Current biology* 15:702-713.
- Lu Y, Christian K, Lu B (2008) BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of Learning and Memory* 89:312-323.
- Lukasiewicz PD (2005) Synaptic mechanisms that shape visual signaling at the inner retina. In: *Progress in Brain Research*, vol. Volume 147 (J. van Pelt, M. K. C. N. L. A. v. O. G. J. A. R. and Roelfsema, P. R., eds), pp 205-218: Elsevier.
- Ly T, Gupta N, Weinreb RN, Kaufman PL, Yücel YH (2011) Dendrite Plasticity in the Lateral Geniculate Nucleus in Primate Glaucoma. *Vision Research* 51:243-250.
- Madigan M, Rao N, Tenhula W, Sadun A (1996a) Preliminary morphometric study of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha)-induced rabbit optic neuropathy. *Neurol Res* 18:233-236.
- Madigan M, Sadun A, Rao NS, Dugel P, WN T, Gill P (1996b) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced optic neuropathy in rabbits. *Neurol Res* 18:176-184.
- Malagelada C, Ryu EJ, Biswas SC, Jackson-Lewis V, Greene LA (2006) RTP801 Is Elevated in Parkinson Brain Substantia Nigral Neurons and Mediates Death in Cellular Models of Parkinson's Disease by a Mechanism Involving Mammalian Target of Rapamycin Inactivation. *The Journal of Neuroscience* 26:9996-10005.
- Malik AR, Urbanska M, Macias M, Skalecka A, Jaworski J (2013) Beyond control of protein translation: What we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834:1434-1448.

- Malik JMI, Shevtsova Z, Bahr M, Kugler S (2005) Long-term in vivo inhibition of CNS neurodegeneration by Bcl-XL gene transfer. *Mol Ther* 11:373-381.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129:1261-1274.
- Mansour-Robaey S, Clarke D, Wang Y, Bray G, Aguayo A (1994a) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1632-1636.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994b) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:1632-1636.
- Markham JA, Juraska JM (2002) Aging and sex influence the anatomy of the rat anterior cingulate cortex. *Neurobiology of Aging* 23:579-588.
- Marquardt T, Gruss P (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in Neurosciences* 25:32-38.
- Martin KRG, Klein RL, Quigley HA (2002) Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 28:267-275.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in Excitotoxicity, Global Cerebral Ischemia, and Target Deprivation: A Perspective on the Contributions of Apoptosis and Necrosis. *Brain Research Bulletin* 46:281-309.
- Masland RH (2001a) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877-886.
- Masland RH (2001g) Neuronal diversity in the retina. *Current Opinion in Neurobiology* 11:431-436.
- Maslim J, Stone J (1988) Time course of stratification of the dendritic fields of ganglion cells in the retina of the cat. *Brain Res Dev Brain Res* 1:87-93.
- Maslim J, Webster M, Stone J (1986) Stages in the structural differentiation of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 1986:254.
- McAllister AK (2000) Cellular and Molecular Mechanisms of Dendrite Growth. *Cereb Cortex* 10:963-973.
- McKinnon S, Lehman D, Tahzib N, Ransom N, Reitsamer H, Liston P, LaCasse E, Li Q, Korneluk R, Hauswirth W (2002) Baculoviral IAP repeat-containing-4 protects optic nerve axons in a rat glaucoma model. *Mol Ther* 5:780-787.

- Meikle L, Pollizzi K, Egnor A, Kramvis I, Lane H, Sahin M, Kwiatkowski DJ (2008) Response of a Neuronal Model of Tuberous Sclerosis to Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitors: Effects on mTORC1 and Akt Signaling Lead to Improved Survival and Function. *The Journal of Neuroscience* 28:5422-5432.
- Metz AE, Spruston N, Martina M (2007) Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Physiology* 581:175-187.
- Mey J, Thanos S (1993) Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Research* 602:304-317.
- Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10:850-860.
- Miyazaki M, Esser KA (2009) REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 296:C583-C592.
- Montgomery S, Bowers W (2012) Tumor Necrosis Factor-alpha and the Roles it Plays in Homeostatic and Degenerative Processes Within the Central Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:42-59.
- Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel J-PG, Shelanski ML (2004) Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol* 33:377-387.
- Moore AW, Jan LY, Jan YN (2002) hamlet, a Binary Genetic Switch Between Single- and Multiple- Dendrite Neuron Morphology. *Science* 297:1355-1358.
- Morgan-Warren PJ, Berry M, Ahmed Z, Scott RAH, Logan A (2013) Exploiting mTOR Signaling: A Novel Translatable Treatment Strategy for Traumatic Optic Neuropathy? *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54:6903-6916.
- Morgan J, Datta A, Erichsen J, Albon J, Boulton M (2006) Retinal ganglion cell remodelling in experimental glaucoma. *Adv Exp Med Biol* 572:397 - 402.
- Morgan JE, Uchida H, Caprioli J (2000) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Br J Ophthalmol* 84:303-310.
- Morquette J, Di Polo A (2008) Dendritic and synaptic protection: is it enough to save the retinal ganglion cell body and axon? *J Neuroophthalmol* 28:144-154.

- Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO (2008) Rat models for glaucoma research. In: Progress in Brain Research, vol. Volume 173 (Carlo Nucci, L. C. N. N. O. and Giacinto, B., eds), pp 285-301: Elsevier.
- Moss ML, Jin SLC, Milla ME, Burkhart W, Carter HL, Chen W-J, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su J-L, Warner J, Willard D, Becherer JD (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-[alpha]. *Nature* 385:733-736.
- Mumm JS, Williams PR, Godinho L, Koerber A, Pittman AJ, Roeser T, Chien C-B, Baier H, Wong ROL (2006) In Vivo Imaging Reveals Dendritic Targeting of Laminated Afferents by Zebrafish Retinal Ganglion Cells. *Neuron* 52:609-621.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a Marker of Retinal Ganglion Cells: Qualitative and Quantitative Time Course Studies in Naïve and Optic Nerve-Injured Retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50:3860-3868.
- Nagaraju M, Saleh M, Porciatti V (2007) IOP-Dependent Retinal Ganglion Cell Dysfunction in Glaucomatous DBA/2J Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48:4573-4579.
- Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI (2006) Tumor Necrosis Factor- α Mediates Oligodendrocyte Death and Delayed Retinal Ganglion Cell Loss in a Mouse Model of Glaucoma. *The Journal of Neuroscience* 26:12633-12641.
- Nellist M, Goedbloed M, Halley D (2003) Regulation of tuberous sclerosis complex (TSC) function by 14-3-3 proteins. *Biochem Soc Trans* 31:587-591.
- Nelson R, Famiglietti EV, Jr., Kolb H (1978) Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol* 41:472-483.
- Nemesure B, Honkanen R, Hennis A, Wu SY, Leske MC (2007) Incident Open-angle Glaucoma and Intraocular Pressure. *Ophthalmology* 114:1810-1815.
- Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde Y-A (2002) Tumor Necrosis Factor Inhibits Neurite Outgrowth and Branching of Hippocampal Neurons by a Rho-Dependent Mechanism. *The Journal of Neuroscience* 22:854-862.
- Newman E, Reichenbach A (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences* 19:307-312.

- Nickells R (1996) Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. *J Glaucoma* 5:345-356.
- Nickells RW (2007) From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Canadian Journal of Ophthalmology / Journal Canadien d'Ophtalmologie* 42:278-287.
- Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SW (2012) Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Annu Rev Neurosci* 35:153 - 179.
- Niell C, Meyer M, Smith S (2004) In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat Neurosci* 7:254 - 260.
- Nouri-Mahdavi K, Hoffman D, Coleman AL, Liu G, Li G, Gaasterland D, Caprioli J (2004) Predictive factors for glaucomatous visual field progression in the Advanced Glaucoma Intervention Study. *Ophthalmology* 111:1627-1635.
- Ogoshi F, Yin HZ, Kuppumbatti Y, Song B, Amindari S, Weiss JH (2005) Tumor necrosis-factor-alpha (TNF- α) induces rapid insertion of Ca²⁺-permeable α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)/kainate (Ca-A/K) channels in a subset of hippocampal pyramidal neurons. *Experimental Neurology* 193:384-393.
- Otori Y, Shimada S, Tanaka K, Ishimoto I, Tano Y, Tohyama M (1994) Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 27:310-314.
- Park H-Y, Kim J, Park C (2014) Alterations of the synapse of the inner retinal layers after chronic intraocular pressure elevation in glaucoma animal model. *Molecular Brain* 7:53.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z (2010) PTEN/mTOR and axon regeneration. *Experimental Neurology* 223:45-50.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z (2008) Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway. *Science* 322:963-966.
- Parrish JZ, Emoto K, Kim MD, Jan YN (2007) Mechanisms that Regulate Establishment, Maintenance, and Remodeling of Dendritic Fields. *Annual Review of Neuroscience* 30:399-423.
- Pavlidis M, Stupp T, Naskar R, Cengiz C, Thanos S (2003) Retinal Ganglion Cells Resistant to Advanced Glaucoma: A Postmortem Study of Human Retinas with the Carbocyanine Dye DiI. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44:5196-5205.

- Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ (2000) Obstructed Axonal Transport of BDNF and Its Receptor TrkB in Experimental Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41:764-774.
- Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A (2005) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons *in vivo*. *Journal of Neurochemistry* 93:72-83.
- Perry VH (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience* 6:931-944.
- Perry VH, Linden R (1982) Evidence for dendritic competition in the developing retina. *Nature* 297:683-685.
- Poitry-Yamate C, Poitry S, Tsacopoulos M (1995) Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15:5179-5191.
- Poo M-m (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
- Pun RYK, Rolle IJ, LaSarge CL, Hosford BE, Rosen JM, Uhl JD, Schmeltzer SN, Faulkner C, Bronson SL, Murphy BL, Richards DA, Holland KD, Danzer SC (2012) Excessive activation of mTOR in postnatally-generated granule cells is sufficient to cause epilepsy. *Neuron* 75:1022-1034.
- Punzo C, Kornacker K, Cepko CL (2009) Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci* 12:44-52.
- Quigley H (1999) Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 18:39 - 57.
- Quigley H, Addicks E, Green W, Maumenee A (1981) Optic nerve damage in human glaucoma II: The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 99:635 - 649.
- Quigley H, Nickells R, Kerrigan L, Pease M, Thibault D, Zack D (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:774 - 786.
- Quigley HA (2011) Glaucoma. *Lancet* 377:1367 - 1377.
- Quigley HA, Iglesia DS (2004) Stem cells to replace the optic nerve. *Eye* 18:1085-1088.
- Raab-Graham KF, Haddick PC, Jan YN, Jan LY (2006) Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites. *Science* 314:144-148.
- Raisman G (1969) Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Research* 14:25-48.

- Rajan I, Cline HT (1998) Glutamate Receptor Activity Is Required for Normal Development of Tectal Cell Dendrites In Vivo. *The Journal of Neuroscience* 18:7836-7846.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *The Journal of Comparative Neurology* 474:304-324.
- Reese BE (2011) Development of the Retina and Optic Pathway. *Vision Res* 51:613-632.
- Reichstein D, Ren L, Filippopoulos T, Mittag T, Danias J (2007) Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Experimental Eye Research* 84:13-21.
- Reiling JH, Hafen E (2004) The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes & Development* 18:2879-2892.
- Reiling JH, Sabatini DM (2007) Stress and mTOR signaling. *Oncogene* 25:6373-6383.
- Ren L, Danias J (2010) A Role for Complement in Glaucoma? In: *Inflammation and Retinal Disease: Complement Biology and Pathology*, vol. 703 (Lambris, J. D. and Adamis, A. P., eds), pp 95-104: Springer New York.
- Renwick J, Narang MA, Coupland SG, Xuan JY, Baker AN, Brousseau J, Petrin D, Munger R, Leonard BC, Hauswirth WW, Korneluk RG, Tsilfidis C (2005) XIAP-mediated neuroprotection in retinal ischemia. *Gene Ther* 13:339-347.
- Repka M, Quigley H (1989) The effect of age on normal human optic nerve fiber number and diameter. *Ophthalmology* 96:26-32.
- Rodieck R, Binmoeller K, Dineen J (1985) Parasol and midget ganglion cells of the human retina. *J Comp Neurol* 1:115-132.
- Roh M, Zhang Y, Murakami Y, Thanos A, Lee SC, Vavvas DG, Benowitz LI, Miller JW (2012) Etanercept, a Widely Used Inhibitor of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Prevents Retinal Ganglion Cell Loss in a Rat Model of Glaucoma. *PLoS ONE* 7:e40065.
- Rosen A, Stevens B (2010) The Role of the Classical Complement Cascade in Synapse Loss During Development and Glaucoma. In: *Inflammation and Retinal Disease: Complement Biology and Pathology*, vol. 703 (Lambris, J. D. and Adamis, A. P., eds), pp 75-93: Springer New York.
- Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Fang S, Parsa AT (2010) Complement and the central nervous system: emerging roles in development, protection and regeneration. *Immunol Cell Biol* 88:781-786.

- Samuel MA, Zhang Y, Meister M, Sanes JR (2011) Age-Related Alterations in Neurons of the Mouse Retina. *The Journal of Neuroscience* 31:16033-16044.
- Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A (2003) Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24:656-672.
- Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ (2010) The Microbead Occlusion Model: A Paradigm for Induced Ocular Hypertension in Rats and Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51:207-216.
- Sarbassov DD, Ali S, Kim D-H, Guertin D, Latek R, Erdjument Bromage H, Tempst P, Sabatini D (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology* 14:1296-1302.
- Sawada H, Fukuchi T, Tanaka T, Abe H (2010) Tumor Necrosis Factor- α Concentrations in the Aqueous Humor of Patients with Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51:903-906.
- Schwartz M, Yoles E, Levin L (1999) 'Axogenic' and 'somagenic' neurodegenerative diseases: definitions and therapeutic implications. *Mol Med Today* 5:470-473.
- Sefton A, Lam K (1984) Quantitative and morphological studies on developing optic axons in normal and enucleated albino rats. *Exp Brain Res* 57:107-117.
- Sehgal S, Baker H, Vézina C (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 28:727-732.
- Seki M, Lipton SA (2008) Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma. In: *Progress in Brain Research*, vol. Volume 173 (Carlo Nucci, L. C. N. N. O. and Giacinto, B., eds), pp 495-510: Elsevier.
- Sernagor E, Eglén SJ, Wong ROL (2001) Development of Retinal Ganglion Cell Structure and Function. *Progress in Retinal and Eye Research* 20:139-174.
- Sheng Z-H, Cai Q (2012) Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13:77-93.
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM (1999) Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 10:119-130.
- Shoji M, Okada M, Ohta A, Higuchi K, Hosokawa M, Honda Y (1998) A Morphological and Morphometrical Study of the Retina in Aging SAM Mice. *Ophthalmic Research* 30:172-179.

- Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kalinski H, Kamer I, Rozen A, Mor O, Keshet E, Leshkowitz D, Einat P, Skaliter R, Feinstein E (2002) Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-Responsive Gene, RTP801, Involved in Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 22:2283-2293.
- Shou T, Liu J, Wang W, Zhou Y, Zhao K (2003) Differential Dendritic Shrinkage of α and β Retinal Ganglion Cells in Cats with Chronic Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3005-3010.
- Shumway SD, Li Y, Xiong Y (2003) 14-3-3 β Binds to and Negatively Regulates the Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) Tumor Suppressor Gene Product, Tuberin. *Journal of Biological Chemistry* 278:2089-2092.
- Šišková Z, Justus D, Kaneko H, Friedrichs D, Henneberg N, Beutel T, Pitsch J, Schoch S, Becker A, von der Kammer H, Remy S (2014) Dendritic Structural Degeneration Is Functionally Linked to Cellular Hyperexcitability in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron* 84:1023-1033.
- Slaughter M, Miller R (1981) 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science* 211:182-185.
- Soto I, Howell GR (2014) The Complex Role of Neuroinflammation in Glaucoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4.
- Stasi K, Nagel D, Yang X, Wang R-F, Ren L, Podos SM, Mittag T, Danias J (2006) Complement Component 1Q (C1Q) Upregulation in Retina of Murine, Primate, and Human Glaucomatous Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47:1024-1029.
- Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML (2006) Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:977 - 985.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke Alan M, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- Stuart G, Spruston N, Hausser M (2008) *Dendrites*, 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB (1997) Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Research* 37:3483-3493.

- Sun W, Li N, He S (2002a) Large-scale morphological survey of rat retinal ganglion cells. *Visual Neuroscience* 19:483-493.
- Sun W, Li N, He S (2002b) Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *The Journal of Comparative Neurology* 451:115-126.
- Swiech L, Blazejczyk M, Urbanska M, Pietruszka P, Dortland BR, Malik AR, Wulf PS, Hoogenraad CC, Jaworski J (2011) CLIP-170 and IQGAP1 Cooperatively Regulate Dendrite Morphology. *The Journal of Neuroscience* 31:4555-4568.
- Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1784:116-132.
- Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H (2004) Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Mammalian Target of Rapamycin-Dependent Local Activation of Translation Machinery and Protein Synthesis in Neuronal Dendrites. *The Journal of Neuroscience* 24:9760-9769.
- Takei N, Nawa H (2014) mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7.
- Tan Z, Beiser A, Vasan R, Roubenoff R, Dinarello C, Harris T, Benjamin E, Au R, Kiel D, Wolf P, Seshadri S (2007) Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology* 68:1902-1908.
- Tancredi V, D'Arcangelo G, Grassi F, Tarroni P, Palmieri G, Santoni A, Eusebi F (1992) Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 9:176-178.
- Tang Z, Bereczki E, Zhang H, Wang S, Li C, Ji X, Branca RM, Lehtiö J, Guan Z, Filipcik P, Xu S, Winblad B, Pei J-J (2013) Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Mediates Tau Protein Dyshomeostasis: IMPLICATION FOR ALZHEIMER DISEASE. *The Journal of Biological Chemistry* 288:15556-15570.
- Tay D, So K, Jen L, Lau K (1986) The postnatal development of the optic nerve in hamsters: an electron microscopic study. *Brain Res* 395:268-273.
- Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J (2002) Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:13571-13576.
- Terzibasi E, Calamusa M, Novelli E, Domenici L, Strettoi E, Cellerino A (2009) Age-dependent remodelling of retinal circuitry. *Neurobiology of Aging* 30:819-828.

- Tezel G (2013) Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma. *Current Opinion in Pharmacology* 13:23-31.
- Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB (2001) TNF- α and TNF- α Receptor-1 in the Retina of Normal and Glaucomatous Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42:1787-1794.
- Tezel G, Wax M (2004) Hypoxia-inducible factor 1alpha in the glaucomatous retina and optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 122:1348-1356.
- Tezel G, Wax MB (2000) The Mechanisms of hsp27 Antibody-Mediated Apoptosis in Retinal Neuronal Cells. *The Journal of Neuroscience* 20:3552-3562.
- Tezel G, Wax MB (2003) Glial Modulation of Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma. *Journal of Glaucoma* 12:63-68.
- Tezel G, Yang X, Luo C, Cai J, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, Pierce WM (2010) Hemoglobin Expression and Regulation in Glaucoma: Insights into Retinal Ganglion Cell Oxygenation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51:907-919.
- Tezel G, Yang X, Luo C, Peng Y, Sun SL, Sun D (2007) Mechanisms of Immune System Activation in Glaucoma: Oxidative Stress-Stimulated Antigen Presentation by the Retina and Optic Nerve Head Glia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48:705-714.
- Tian N, Copenhagen D (2001) Visual deprivation alters development of synaptic function in inner retina after eye opening. *Neuron* 32:439 - 449.
- Tian N, Copenhagen DR (2003) Visual Stimulation Is Required for Refinement of ON and OFF Pathways in Postnatal Retina. *Neuron* 39:85-96.
- Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328:131-136.
- Turner DL, Snyder EY, Cepko CL (1990) Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4:833-845.
- Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J (2008) Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68:264-288.
- Usrey WM (2002) Spike timing and visual processing in the retinogeniculocortical pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 357:1729-1737.
- Uylings HBM, de Brabander JM (2002) Neuronal Changes in Normal Human Aging and Alzheimer's Disease. *Brain and Cognition* 49:268-276.

- Van Buskirk EM, Cioffi GA (1992) Glaucomatous Optic Neuropathy. *American Journal of Ophthalmology* 113:447-452.
- VanVeldhuisen PC, Ederer F, Gaasterland DE, Sullivan EK, Beck A, Prum BE, Cyrlin MN, Weiss H, (AGIS) (2000) The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. the relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *American Journal of Ophthalmology* 130:429-440.
- Vaughn JE, Barber RP, Sims TJ (1988) Dendritic development and preferential growth into synaptogenic fields: A quantitative study of Golgi-impregnated spinal motor neurons. *Synapse* 2:69-78.
- Vézina C, Kudelski A, Sehgal S (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28:721-726.
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Miralles de Imperial J, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2012) Understanding glaucomatous damage: Anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Progress in Retinal and Eye Research* 31:1-27.
- Villegas-Pérez M, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray G, Aguayo A (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24:23-36.
- Volgyi B, Chheda S, Bloomfield S (2009) Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol* 512:664 - 687.
- Vorwerk C, Gorla M, Dreyer E (1999) An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1:S142-150.
- Wang G-Y, Liets LC, Chalupa LM (2001) Unique Functional Properties of On and Off Pathways in the Developing Mammalian Retina. *J Neurosci* 21:4310-4317.
- Ward NJ, Ho KW, Lambert WS, Weitlauf C, Calkins DJ (2014) Absence of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Accelerates Stress-Induced Axonopathy in the Optic Projection. *The Journal of Neuroscience* 34:3161-3170.
- Wassle H (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5:747-757.
- Wassle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina.
- Watanabe M, Fukuda Y (2002) Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats. *Progress in Retinal and Eye Research* 21:529-553.

- Wax M, Tezel G (2002) Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy. *Mol Neurobiol* 26:45-55.
- Weber A, Chen H, Hubbard WC, Kaufman PL (2000) Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41:1370-1379.
- Weber A, Kaufman P, Hubbard W (1998a) Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2304 - 2320.
- Weber AJ, Harman CD (2005) Structure-Function Relations of Parasol Cells in the Normal and Glaucomatous Primate Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:3197-3207.
- Weber AJ, Harman CD (2008) BDNF Preserves the Dendritic Morphology of alpha \pm and beta Ganglion Cells in the Cat Retina after Optic Nerve Injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49:2456-2463.
- Weber AJ, Harman CD, Viswanathan S (2008) Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina. *The Journal of Physiology* 586:4393-4400.
- Weber AJ, Kaufman JP, Hubbard WC (1998f) Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39:2304.
- Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA (2014) The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. *JAMA* 311:1901-1911.
- Weisse I (1995) Changes in the aging rat retina. *Ophthalmic Research* 27:154-163.
- Wheeler D, Knapp E, Bandaru VVR, Wang Y, Knorr D, Poirier C, Mattson MP, Geiger JD, Haughey NJ (2009) Tumor necrosis factor- α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry* 109:1237-1249.
- Williams PA, Howell GR, Barbay JM, Braine CE, Sousa GL, John SWM, Morgan JE (2013) Retinal Ganglion Cell Dendritic Atrophy in DBA/2J Glaucoma. *PLoS ONE* 8:e72282.
- Wong ROL, Ghosh A (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3:803-812.
- Wong WT, Wong ROL (2000) Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Current Opinion in Neurobiology* 10:118-124.
- Wu GY, Cline HT (1998) Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science* 279:222-226.

- Xin X, Gao L, Wu T, Sun F (2013) Roles of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms, tumor necrosis factor alpha level in aqueous humor, and the risks of open angle glaucoma: A meta-analysis. *Molecular Vision* 19:526-535.
- Xu H-P, Tian N (2004) Pathway-Specific Maturation, Visual Deprivation, and Development of Retinal Pathway. *Neuroscientist* 10:337-346.
- Xu H-P, Tian N (2008) Glycine receptor-mediated synaptic transmission regulates the maturation of ganglion cell synaptic connectivity. *The Journal of Comparative Neurology* 509:53-71.
- Xu Y, Liu C, Chen S, Ye Y, Guo M, Ren Q, Liu L, Zhang H, Xu C, Zhou Q, Huang S, Chen L (2014) Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson's disease. *Cellular Signalling* 26:1680-1689.
- Yan X, Tezel G, Wax MB, Edward DP (2000) Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor α in glaucomatous optic nerve head. *Archives of ophthalmology* 118:666-673.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-Derived Factors Stimulate Optic Nerve Regeneration. *The Journal of Neuroscience* 23:2284-2293.
- Yuan L, Neufeld A (2001) Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neurosci Res* 64:523-532.
- Yuan L, Neufeld AH (2000) Tumor necrosis factor- α : A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 32:42-50.
- Yucel YH, Zhang Q, Gupta N, Kaufman PL, Weinreb RN (2000) Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Archives of ophthalmology* 118:378-384.
- Zeng L-H, Rensing NR, Zhang B, Gutmann DH, Gambello MJ, Wong M (2011) Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of Tuberous Sclerosis Complex. *Human Molecular Genetics* 20:445-454.

ANNEXES

ANNEXE A

REDD2-MEDIATED INHIBITION OF MTOR PROMOTES DENDRITE RETRACTION INDUCED BY AXONAL INJURY

Cell Death and Differentiation (2014), Sept 26, Epub ahead of print

(Premier auteur)

**REDD2-MEDIATED INHIBITION OF MTORC1 PROMOTES
DENDRITIC RETRACTION INDUCED BY AXONAL INJURY.**

Barbara Morquette^{a, b, c}, Philippe Morquette^{a, c}, Jessica Agostinone^{a, b, c}, Elena Feinstein^d, R. Anne McKinney^e, Arlette Kolta^{a, c, f} and Adriana Di Polo^{a, b, c*}.

^aDepartment of Neuroscience, ^bUniversity of Montreal Hospital Research Center (CR-CHUM), ^cGroupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC), University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; ^dQuark Pharmaceuticals Inc., Research Division, Ness Ziona, Israel; ^eDepartment of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, ^fDepartment of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: REDD2-induced mTOR loss leads to dendritic pathology

***Correspondence to :**

Adriana Di Polo

Department of Neuroscience

CHUM Research Center

University of Montreal

900, rue Saint-Denis, R09.480

Montreal, Québec, H2X 0A9

Canada.

Phone : (514) 343-6109, Fax : (514) 343-5755

ABSTRACT

Dendritic defects occur in neurodegenerative diseases accompanied by axonopathy, yet the mechanisms that regulate these pathologic changes are poorly understood. Using Thy1-YFP mice subjected to optic nerve axotomy, we demonstrate early retraction of retinal ganglion cell (RGC) dendrites and selective loss of mammalian target of rapamycin (mTOR) activity, which precede soma loss. Axonal injury triggered rapid upregulation of the stress-induced protein REDD2 (regulated in development and DNA damage response 2), a potent inhibitor of mTOR. Short interfering RNA-mediated REDD2 knockdown restored mTOR activity and rescued dendritic length, area and branch complexity in a rapamycin-sensitive manner. Whole-cell recordings demonstrated that REDD2 depletion leading to mTOR activation in RGCs restored their light response properties. Lastly, we show that REDD2-dependent mTOR activity extended RGC survival following axonal damage. These results indicate that injury-induced stress leads to REDD2 upregulation, mTOR inhibition and dendrite pathology causing neuronal dysfunction and subsequent cell death.

Keywords: Dendrites, Retinal Ganglion Cell, Axonal Injury, Mammalian Target of Rapamycin, Regulated in development and DNA damage response.

INTRODUCTION

During normal neural development there is selective elimination of dendritic and axonal branches without loss of the neuron itself.¹ This developmental pruning refines neuronal processes and ensures precise connectivity. Most of our current knowledge about structural changes in dendrites stems from studies of dendritic remodeling during development^{2,3}. In contrast, little is known about how dendritic arbors are affected by trauma or disease in the adult central nervous system (CNS). Defects in dendritic arborization and connectivity are being recognized as one of the first stages of neurodegeneration. Indeed, dendritic abnormalities and loss of synapses have been reported in neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and depression, as well as in neurodegenerative conditions including Alzheimer's disease, stroke and glaucoma^{4,5}. Despite the fact that dendritic defects are likely to have devastating consequences on neuronal function and survival, the mechanisms that regulate dendrite degeneration in mature CNS neurons are poorly understood.

Recent studies have identified the mammalian target of rapamycin (mTOR) as a critical component of dendritic tree development^{6, 7, 8, 9}. A substantial reduction in the number of dendritic branches and arbor shrinkage were observed in developing hippocampal neurons when mTOR was inhibited^{6,7}. In addition, mTOR has been recently implicated in the regulation of dendritic spine morphology, synaptogenesis and synaptic plasticity^{10,11}. The emerging developmental role of mTOR in the regulation of dendritic dynamics prompted us to put forward the hypothesis that dysregulation of mTOR function might contribute to dendritic pathology in adult neurons following injury.

Many of the signals that impinge upon mTOR activity act through the tuberous sclerosis complex (TSC1/2), a negative regulator of mTOR function. For instance, stress signals such as hypoxia and energy depletion activate TSC1/2 through the REDD (regulated in development and DNA damage response) proteins^{12, 13, 14}, leading to the loss of mTOR activity. REDD2, a member of this family also known as DDIT4L or RTP801L, is an attractive target because in addition to being a potent mTOR inhibitor, it is implicated in stress responses leading to cell death^{15,16}. Although REDD2 is enriched in skeletal muscle and has been shown to inhibit mTOR signaling in response to leucine and stretch¹⁷, its expression and function in the nervous system is currently unknown.

We used a model of acute optic nerve lesion *in vivo* to ask whether axonal damage had a direct effect on retinal ganglion cell (RGC) dendrite morphology and, if so, to identify the molecular mechanisms that regulate this injury-induced response. Our data demonstrate that axonal damage leads to substantial retraction of RGC dendritic arbors before soma loss. Optic nerve lesion led to selective REDD2 upregulation in RGCs, which coincided with the loss of mTOR activity. Short interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of REDD2 restored mTOR function in injured neurons and fully rescued their dendritic arbors, increasing dendritic length, field area and branch complexity. REDD2 depletion also abrogated pathologic RGC hyperexcitability and restored the light response properties of these neurons. Collectively, these data identify the REDD2-mTOR signaling pathway as a critical regulator of dendritic arbor morphology in adult central neurons undergoing axonal damage.

RESULTS

RGC dendritic arbors retract soon after axonal injury and before cell death

To establish whether axonal injury induces structural changes in RGC dendrites, we carried out a detailed analysis of dendritic arbors in transgenic mice that selectively express yellow fluorescent protein (YFP) in RGCs under control of the Thy1 promoter (Thy1-YFPH)¹⁸. In this mouse strain, RGC-specific YFP expression is detected in a small number of RGCs (<1%), thus allowing visualization of individual dendritic arbors without interference from overlapping dendrites in neighboring neurons. A key question is to determine whether dendritic atrophy is a prerequisite or a consequence of RGC soma degeneration. For this purpose, we first established the time course of axotomy-induced RGC loss in Thy1-YFPH mice. Figure 1a shows that at 3 days after complete optic nerve axotomy, the intensity of the YFP label or the number of YFP-positive RGCs did not differ from those in non-injured (intact) retinas (injured : 63 ± 4 RGCs; intact : 66 ± 4 RGCs, mean \pm S.E.M., analysis of variance (ANOVA), $P > 0.05$; Table 1), whereas at 5 days after lesion there was substantial neuronal loss accounting for 35% of the RGC population (injured : 44 ± 3 RGCs, ANOVA, $P < 0.001$). This time course of injury-induced RGC death was confirmed using an antibody against the transcription factor Brn3a, an RGC-specific marker¹⁹ (Figure 1b). Therefore, analysis of dendritic arbors was carried out at 3 days after axotomy, a time when no changes in the intensity or number of YFP-labeled RGCs were observed, and before overt neuronal soma loss.

Fourteen different morphologic RGC subtypes have been identified in the mouse retina^{20,21}, all of which are found in Thy1-YFPH transgenic retinas²¹. Neurofilament H (NF-H,

SMI-32) is the only marker that labels several structural classes, specifically four subtypes identified by cluster analysis²¹, which encompass a significant portion of the total RGC population (36% : 1213±101 RGCs/mm²). Therefore, YFP-positive RGCs that colabeled with an antibody against NF-H and had a clearly identifiable axon were selected for dendritic arbor imaging and three-dimensional reconstruction. RGCs located in both central and peripheral retina were included in our analysis and measurements were performed blinded to manipulations. YFP+/NF-H+ RGCs had medium to large monostratified dendritic arbors with smooth dendrites lacking spines, a common feature of adult RGCs²¹(Figures 1c–e). Following axotomy, RGC dendritic arbors were visibly smaller than those in non-injured, intact neurons (Figures 1f and g). Analysis of total dendritic length and total dendritic area demonstrated a reduction of 15% (3707 μm) and 25% ($112 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), respectively, compared with control RGCs (length : 4320 μm; area : $150 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) (Figures 1h and i and Tables 1 and 2). Sholl analysis, which measures the number of dendrites that cross-concentric circles at increasing distances from the soma, revealed a leftward shift indicating a reduced arbor complexity in axotomized neurons (Figure 1j and Table 2). These changes were not dependent on retinal location or eccentricity. Our results demonstrate that RGC dendritic retraction occurs soon after axonal injury and before cell death *in vivo*.

Selective loss of mTOR activity in injured RGCs

mTOR interacts with intracellular partners to regulate several cellular processes, of which the best characterized is protein synthesis. mTOR phosphorylates the p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) leading to phosphorylation of the ribosomal protein S6, which stimulates mRNA

translation rates²². Antibodies that recognize phosphorylated S6^(Ser240/244) are widely accepted functional readouts of mTOR activity²³. Therefore, to establish whether RGC dendritic retraction correlates with changes in mTOR activity in these neurons, we examined phospho-S6^(Ser240/244) expression in intact and axotomized retinas. Phospho-S6 labeling was detected predominantly in two retinal cell populations, one located in the ganglion cell layer (GCL) and another in the outermost part of the inner nuclear layer (INL) (Figure 2a). Double labeling of phospho-S6 with an antibody against tubulin isoform β III (TUJ1), a selective marker for RGCs in the retina^{24,25}, revealed that adult mouse RGC soma and dendrites are endowed with robust mTOR activity (Figures 2b–i). Phospho-S6 labeling in the INL colocalized with the calcium-binding protein calbindin, a marker for horizontal cells (Figures 2j–l).

A marked decrease in phospho-S6-positive RGCs was observed at 3 days after axotomy, before the onset of cell death, whereas phospho-S6 expression in horizontal cells remained unchanged (Figures 2m and n). Colabeling of axotomized retinas with phospho-S6 and TUJ1 confirmed that phospho-S6 downregulation reflected loss of mTOR activity in RGCs and not RGC loss (Figures 2o–q). Quantification of the number of RGCs that expressed both phospho-S6 and TUJ1 with respect to all TUJ1-positive cells demonstrated that ~50% of RGCs in the intact retina have detectable levels of mTOR activity (Figure 2r and Table 1). Importantly, optic nerve injury led to 40% decrease in the number of RGCs expressing phospho-S6 (Figure 2r). In contrast, the number of horizontal cells expressing both phospho-S6 and calbindin did not change with axotomy (Figure 2s). These data indicate that selective damage to RGC axons leads to the downregulation of mTOR activity in these neurons but not in other retinal cells.

REDD2 is upregulated in injured RGCs

Inhibition of mTOR during stress occurs through stabilization or activation of the TSC1/TSC2 complex. REDD1 and REDD2 likely inhibit mTOR by controlling the release of TSC2 from its association with inhibitory factors, thereby stabilizing the interaction between TSC1 and TSC2²⁶. To test the hypothesis that REDD2 might be involved in mTOR inhibition in RGCs, we first examined the expression of REDD2 in intact and axotomized retinas. While low levels of REDD2 were detected in the GCL of non-injured retinas, a marked increase in REDD2-positive labeling was observed at 3 days after axotomy (Figures 3a and b). Colabeling of retinal sections with REDD2 and the RGC-specific marker Brn3a demonstrated that REDD2 expression selectively increases in injured RGCs (Figures 3c–e). REDD2 was also observed in the outer plexiform layer (OPL) and colocalized with horizontal cell proximal dendrites labeled with calbindin (Figures 3a and f–h), but there was no detectable change in REDD2 expression in horizontal cell processes after axonal injury (Figures 3b and f–h). REDD1, a family member that shares 38% homology with REDD2^{27,28}, was selectively expressed in the GCL (Figure 3i). Colabeling with the RGC-specific marker Brn3a confirmed that RGCs expressed REDD1 (Figures 3k and l), as reported previously²⁹. REDD2 upregulation in damaged RGCs was confirmed by western blot analysis of retinal homogenates as early as 48 h after axotomy (Figures 3m and n). In contrast, the expression of REDD1 did not change after lesion (Figures 3m and o). These results demonstrate selective injury-induced REDD2 upregulation in RGCs.

REDD2 knockdown restores mTOR activity

To establish whether REDD2 upregulation mediated loss of mTOR activity in RGCs, we sought to reduce REDD2 expression by using siRNA followed by analysis of retinal phospho-S6. First, we examined whether siRNA delivered intraocularly was taken up by mouse RGCs. A single intravitreal injection of non-targeting (scrambled) Cy3-tagged control siRNA (siCtl-Cy3) resulted in Cy3 labeling in RGCs as early as 3 h after administration (Figure 4a). The colocalization of Cy3 and the retrograde tracer Fluorogold (FG), following FG application to the superior colliculus, confirmed that siRNA was rapidly taken up by RGCs (Figures 4b–d). Next, we assessed the ability of siRNAs against REDD2 (siREDD2) to knockdown retinal REDD2 protein expression *in vivo*. Western blot analysis of retinal homogenates from eyes that received siREDD2 at the time of axotomy showed a significant reduction of REDD2 protein, whereas non-tagged siCtl had no effect (Figures 4e and f). Importantly, siREDD2 did not reduce the protein levels of REDD1, validating the specificity of this siRNA (Figures 4e and g). Immunohistochemistry of axotomized retinas confirmed that REDD2 downregulation occurred in RGCs, visualized with Brn3a, following treatment with siREDD2 but not siCtl (Figures 4h–m). We next investigated whether siRNA-mediated knockdown of REDD2 resulted in recovery of mTOR function. Axotomized retinas treated with siREDD2 displayed a larger number of phospho-S6-positive RGCs compared with retinas injected with siCtl (Figures 4n and o). Quantitative analysis demonstrated a 45% increase in the number of axotomized RGCs expressing phospho-S6 in the presence of siREDD2 compared with control retinas (Figure 4p and Table 1), whereas the number of phospho-S6-positive horizontal cells did not change (Figure 4q). These data demonstrate that REDD2 knockdown increases mTOR activity in

injured RGCs, and suggests that axotomy-induced REDD2 upregulation leads to the loss of mTOR function in these neurons.

REDD2-dependent increase in mTOR function rescues dendrites

We asked whether siREDD2-induced upregulation of mTOR activity had an effect on dendritic arbor structure after axonal injury. Characterization of neuronal morphology at 3 days after axotomy demonstrated that siREDD2-treated retinas contained RGCs with longer dendrites and more elaborate arbors than control retinas treated with siCtl (Figures 5a and b). Coadministration of siREDD2 and rapamycin, an inhibitor of the mTOR complex 1 (mTORC1),³⁰ completely blocked the effect of siREDD2 on dendritic rescue, suggesting that this response was mTORC1-specific (Figure 5c). Quantitative analysis of dendritic arbor parameters revealed that siREDD2 protected 32% of the total dendritic length and 34% of the dendritic field area from injury-induced damage compared with siCtl or a combination of siREDD2 and rapamycin (Figures 5d and f and Table 2). Administration of siREDD2 or rapamycin alone in non-injured, intact retinas did not elicit significant changes in dendritic length or field area (Figures 5e and g). Dendritic arbor reconstruction and measurements were carried out blinded to treatments.

To assess the contribution of proximal and distal dendrites to axotomy-induced changes and the effect of siREDD2, we examined the dendritic length of proximal dendrites (orders 1–3) compared with distal dendrites (orders 4–10). This analysis demonstrated that most of the changes occurring after axotomy and following modulation of the REDD2-mTOR pathway take

place in distal dendrites (Figure 5h). Furthermore, Sholl analysis revealed a rightward shift indicative of increased arbor complexity in axotomized siREDD2-treated retinas with respect to axotomized retinas treated with siCtl or a combination of siREDD2 and rapamycin (Figure 5i). Increased arbor complexity was more apparent at $>100\ \mu\text{m}$ from the cell soma, consistent with changes taking place in distal dendritic segments. Intriguingly, the dendritic arbors of injured RGCs that received siREDD2 displayed higher complexity than those in intact, non-injured retinas without treatment (Figure 5i, red curve *versus* black curve; Table 2). siREDD2 administration to intact eyes did not alter dendritic arbor complexity (not shown). These data identify the REDD2–mTORC1 axis as a critical regulator of RGC dendritic arbor morphology in injured neurons, and provide evidence that REDD2-dependent increase in mTORC1 activity rescues RGC dendrites after axotomy.

siREDD2-mediated mTOR activation restores neuronal function

To assess the impact of dendritic arbor rescue on RGC function, we performed whole-cell recordings from single ON-center RGCs at 3 days after axotomy and concurrent intraocular injection of siREDD2 or siCtl at the time of injury. Retinas were placed in the recording chamber with the GCL facing up and visualized with epifluorescence, to identify YFP-labeled RGCs, as well as infrared differential interference contrast optics to position the recording electrode. The identity of each recorded cell and its pattern of dendritic arborization in the inner plexiform layer was confirmed *post hoc* following injection of Alexa Fluor 594 through the recording pipette (Figures 6a–e). Analysis of RGC intrinsic properties, including membrane

resting potential and resistance, did not reveal significant differences between intact and axotomized neurons with or without siREDD2 treatment (Figures 6f and g). In contrast, light stimulation elicited firing at a much higher frequency in axotomized RGCs compared with non-injured controls (intact: 22 ± 6 Hz; axotomy: 61 ± 9 Hz, mean \pm S.E.M; Figures 6h and i). Remarkably, siREDD2 treatment restored the light-induced firing frequency in axotomized RGCs to levels similar to those recorded from intact neurons (axotomy+siREDD2: 22 ± 4 Hz; Figures 6j and k and Table 1). No significant change was observed in the amplitude of action potentials (Figure 6l). Intriguingly, attempts to record from axotomized RGCs treated with siCtl or phosphate-buffered saline (PBS) were unsuccessful. These cells had low resting potentials and did not fulfill a minimal criteria for consistency in firing rates (>40 experiments). Taken together, our results indicate that axotomy leads to early RGC hyperexcitability and that siREDD2-mediated rescue of dendritic arbors restores the light response properties of these neurons.

mTOR activation extends neuronal survival

RGC apoptosis after axonal injury has been associated with soma and nuclear shrinkage³¹, and mTOR is known to regulate soma size in neurons³². Therefore, we first examined RGC soma size after axotomy and whether it was susceptible to REDD2-dependent mTOR activity. Our data show that there was no significant change in RGC soma size at 3 days after axotomy in the presence or absence of siREDD2 (Figure 7a and Table 1). To determine if siREDD2-mediated rescue of dendritic arbors had an effect on neuronal survival, we examined retinas at 5 and 7 after axotomy. Flat-mounted retinas from eyes treated with siREDD2 at the time of axotomy consistently showed higher densities of Brn3a-labeled RGCs than those treated with siCtl (Figures 7b–e). Quantitative analysis demonstrated that siREDD2 promoted substantial RGC survival relative to siCtl-treated eyes at 5 days (siREDD2: 91% survival, 2700±128 RGCs/mm²; siCtl: 74%, 2207±22 RGCs/mm²) and 7 days (siREDD2: 56%, 1675±108 RGCs/mm²; siCtl: 45%, 1344±27 RGCs/mm²) after optic nerve injury (Figure 7f and Table 1). Taken together, these data suggest that mTOR-mediated protection of dendritic arbors attenuates RGC loss after axonal damage.

DISCUSSION

Abnormalities in dendritic structure are a characteristic feature of many brain diseases, yet the molecular mechanisms leading to dendritic pathology in injured neurons are poorly understood. In this regard, the data presented here using the adult mouse visual system support several novel conclusions. First, we show that dendritic retraction occurs rapidly in a substantial population of RGCs, before overt cell death, and as a direct consequence of axonal injury.

Second, we demonstrate that damage to RGC axons induces expression of REDD2 coinciding with strong inhibition of mTOR activity in these neurons. Third, we show that REDD2 upregulation underlies the aberrant dendritic phenotype because siRNA-mediated ablation of REDD2 restores mTOR activity and rescues RGC dendritic arbor structure and complexity. Lastly, REDD2 depletion leading to mTOR activation re-establishes the light response properties of injured RGCs and extends their survival. Taken together, these data suggest a novel role for REDD2 in the regulation of dendritic morphology through modulation of mTOR activity after axonal damage.

Dendrites are extremely dynamic during development, expanding and retracting rapidly in response to intrinsic and environmental cues^{33,34}, but they become stable by adulthood and display little or no structural changes over extended time periods³⁵. The stability of dendritic arbors is believed to be compromised following injury or during neurodegeneration. For example, the selective death of RGCs is a cardinal feature of glaucoma³⁶, and shrinkage of RGC dendritic arbors has been observed in primate, cat and rodent models of this disease^{37, 38, 39, 40, 41, 42, 43} as well as in human glaucomatous retinas.⁴⁴ The primary site of damage in glaucoma is believed to be at RGC axons in the optic nerve head.⁴⁵ Consistent with this, we show that axotomy triggers rapid dendritic retraction, a finding that is in agreement with early dendritic changes observed after optic nerve crush.^{46,47} In spite of the large morphologic diversity of RGC dendritic arbors in the mouse retina,^{20,21} few molecular markers for discrete RGC subtypes have been identified and include NF-H, melanopsin and junctional adhesion molecule B.^{21,48,49} Among these, only NF-H labels several structural classes identified by cluster analysis and encompass a substantial RGC population.^{21,48} It has been proposed that different RGC subtypes display distinct susceptibilities to injury. In the axotomized feline retina, α cells,

which are endowed with large somata and dendritic arbors, undergo a significant decrease in dendritic field size, whereas β cells with medium-sized somata and more compact dendritic trees are less affected.⁵⁰ Our results show that NF-H-positive RGCs, which comprise cells with medium- to large-sized dendritic arbors, undergo substantial atrophy after axotomy similar to α cells. A previous study reported dendritic atrophy in NF-H-positive RGCs at 2 months after laser-induced ocular hypertension, a time when there is significant soma and axonal loss, but only in the superior quadrant of hypertensive eyes.⁴³ We observed dendritic arbor shrinkage in all retinal quadrants that was independent of retinal eccentricity, which may reflect differences between these injury models and also that our analysis was carried out early after axonal injury at a time preceding massive neurodegeneration.

The identification of pathways that contribute to RGC dendritic arbor maintenance is essential to understand the molecular basis of pathologic changes and to identify potential therapeutic targets. Our data suggest that the REDD2-mTORC1 pathway is critical for dendritic stability in adult RGCs. We show that damage to RGC axons leads to cell-specific increase of REDD2, mTORC1 inhibition and dendritic retraction. REDD2 is strongly upregulated by hypoxia, via the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)²⁸, as well as oxidative and osmotic stress.^{15,16,51} Optic nerve damage increases HIF-1 α and reactive oxygen species in RGCs,^{52,53} which may account for the axotomy-induced upregulation of REDD2 reported here. Given that REDD2 is a strong inhibitor of mTOR, we asked whether injury-induced REDD2 upregulation led to mTOR inhibition and dendritic retraction. We show that adult RGCs are endowed with constitutive mTOR activity that is markedly reduced after axotomy, consistent with a study showing reduced mTOR in RGCs following optic nerve crush⁵⁴. Our loss of function experiments using siRNA-mediated REDD2 knockdown demonstrate selective

restoration of mTOR activity in injured RGCs accompanied by rescue of dendritic arbors. Moreover, rapamycin administration completely obliterated the effect of REDD2 depletion on dendritic rescue. Our data suggest that REDD2-dependent loss of mTORC1 function underlies RGC dendritic shrinkage, and that mTORC1 is required for the stability of adult RGC dendrites.

Recent work supports a role for mTOR in RGC axon regeneration.^{55,56} For example, deletion of the phosphatase and tensin homolog or TSC1, both negative regulators of mTOR, promoted robust RGC axon regeneration along the injured optic nerve tract.^{54,57} More recently, Leibinger *et al.*⁵⁸ showed that inflammatory stimulation prevented the axotomy-induced decline of mTOR activity in RGCs and demonstrated that mTOR signaling is important to sustain RGCs in an active regenerative state. Further research is required to identify the mTOR-specific targets that contribute to RGC axon regrowth or dendritic stability. A central role of mTOR is to regulate protein translation; thus, it is possible that mTORC1 mediates the translation of structural or signaling proteins in dendrites, to ensure arbor maintenance, and in axons, to promote regeneration. Several molecules that contribute to dendritic arbor stability during development have been identified including the microtubule-associated proteins 1A and 2, integrin $\alpha3\beta1$, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, nuclear Dbp2-related kinases and the guanine deaminase cypin.³⁵ It would be of future interest to assess whether these molecules are translational targets of mTOR and if they are dysregulated in the context of injury in the adult CNS. Alternatively, mTOR may directly regulate protein–protein interactions required for dendritic maintenance. Indeed, mTOR has been shown to enhance the interaction between microtubules and actin-binding proteins required for proper dendritic arbor morphology,⁵⁹ suggesting a role beyond that of protein translation.⁶⁰

Our electrophysiologic data demonstrate that, soon after injury, RGCs display increased firing rates characteristic of hyperexcitable neurons. This finding is consistent with a recent study showing a significant increase in RGC spontaneous firing of action potentials in a mouse model of microbead-induced ocular hypertension.⁶¹ This RGC hyperactivity contrasts with reduced spontaneous firing recorded using extracellular multielectrode arrays in a similar glaucoma model in mice,⁴² a discrepancy that may reflect differences in methodology and cell sampling. Remarkably, siREDD2 treatment restored firing rates to levels similar to those found in intact, non-injured neurons. Intriguingly, we were not able to obtain whole-cell recordings from axotomized RGCs treated with siCtl. We cannot conclude that siCtl is toxic to cells because we were not able to record from PBS-injected eyes either. Our data rather suggest that the combination of axotomy and intraocular injection has a detrimental effect on the electrophysiologic properties of RGCs, a response that is overcome by siREDD2. The loss of light-triggered responses by RGCs subjected to concomitant axotomy and intravitreal injection suggests that multiple eye injuries impair RGC function, an observation that deserves further investigation. The excitability of a neuron is the result of a balance between several factors including resting potential, input resistance and soma size. The observed dendritic abnormalities reported here were not accompanied by detectable changes in any of these parameters; therefore, it is unlikely that axotomy-induced hyperexcitability and the effect of siREDD2 are the result of changes in intrinsic membrane properties or soma size. Our data suggest that functional deficits most likely derive from injury-induced changes in dendritic integrity and rearrangement of synaptic inputs, with hyperexcitability resulting from an increase in excitatory connections or a decrease in inhibitory synapses. Of interest, mTOR has been previously shown to suppress dendritic translation of the potassium channel Kv1.1,⁶² an effect

that could increase burst firing and network synchronization.^{63,64} More recently, TSC1-mTOR signaling was shown to regulate the balance between excitatory and inhibitory synaptic transmission, which, when defective, led to hippocampal network hyperactivity.⁶⁵

In conclusion, our data support a model in which axonal injury-induced upregulation of the stress-responsive REDD2 leads to mTOR inhibition triggering early dendritic arbor retraction, neuronal dysfunction and subsequent death of adult retinal neurons. Our findings shed light onto a novel mechanism regulating dendritic pathology, which may be relevant for neurodegenerative diseases including glaucoma.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the University of Montreal and the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals (<http://www.ccac.ca>). All surgeries were carried out in adult B6.Cg.Tg[Thy1-YFPH]2Jrs/J mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) or wild-type litter mate controls maintained in our animal facility. The number of animals used in each experiment is indicated in Table 1 and in the figure legends.

Axonal injury

Axonal injury was induced by complete transection (axotomy) of the mouse optic nerve leading to apoptotic loss of RGCs.⁶⁶ The left optic nerve was transected at 0.5–1 mm from the

optic nerve head avoiding damage to the ophthalmic artery. The right eye was never operated on and served as intact control. Fundus examinations were performed after axotomy and before the mice were sacrificed to verify the integrity of the retinal circulation after surgery. Animals with compromised blood supply were excluded from the study.

Immunohistochemistry

Flat-mounted retinas

Mice were perfused transcardially with 4%paraformaldehyde (PFA), the eyes were immediately collected and the retinas were carefully dissected out. Retinas were free floated for 30 min in blocking solution: 10% normal goat serum (NGS), 2% Triton X-100 and 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) in PBS. Retinas were then incubated for 72 h at 4 °C in blocking solution (2% NGS, 2% Triton X-100, 0.5% DMSO) containing each of the following primary antibodies : SMI-32 (NF-H, 10 μ g/ml; Sternberger Monoclonals, Baltimore, MD, USA), GFP (4 μ g/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) or Brn3a (0.3 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA). Retinas were washed and incubated with secondary antibodies: anti-mouse Alexa Fluor 594 (2 μ g/ml; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), anti-rabbit FITC (1:1000; Sigma-Aldrich) or anti-goat Alexa Fluor 594 (2 μ g/ml; Molecular Probes). The retinas were washed and flat mounted on glass slides with the RGC layer side up for visualization using a fluorescent microscope (Zeiss AxioSkop 2 Plus; Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC, Canada).

Retinal cross-sections

Animals were perfused transcardially with 4% PFA and retinal cryosections (16 μ m) were prepared as previously described by us⁶⁷. Some cryosections were prepared from eyes labeled with the retrograde tracer FG (Fluorochrome, Englewood, CO, USA), which was applied to the superior colliculus 1 week before optic nerve axotomy as described by us⁶⁶. Each of the following primary antibodies were added to the retinal sections in blocking solution (3% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100) and incubated overnight at 4 °C: phospho-S6 (Ser 240/244, 1 : 200; Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), β III-tubulin (TUJ1, 1 : 400; Sigma-Aldrich), calbindin (1 : 200; Swant, Marly, Switzerland), REDD2 (5 μ g/ml; Biorbyt, San Francisco, CA, USA), REDD1 (1 μ g/ml; ProSci Inc., Poway, CA, USA) or Brn3a (1 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnologies). The secondary antibodies used were as follows: anti-rabbit Cy3 (1.5 μ g/ml; Sigma-Aldrich), anti-mouse FITC (1 : 1000; Sigma-Aldrich), anti-rabbit Alexa Fluor 594 (2 μ g/ml; Molecular Probes) or anti-goat Alexa Fluor 488 (2 μ g/ml; Molecular Probes). Fluorescent labeling was observed with a Zeiss AxioSkop 2 Plus (Carl Zeiss Canada).

Neuronal survival

Mice were killed by transcardial perfusion with 4% PFA, the retinas were removed and flat mounted with vitreal side up on a glass slide for examination of the GCL. YFP-labeled RGCs were counted within three square areas at distances of 0.25, 0.625 and 1 mm from the optic disc in each of the four retinal quadrants for a total of 12 retinal areas. RGC densities were confirmed using flat-mounted retinas labeled with Brn3a (Santa Cruz Biotechnologies) as

described.⁶⁸ Fluorescence was examined with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada), and pictures were captured with a CCD video camera (Retiga; Qimaging, Burnaby, BC, Canada) and analyzed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada).

Dendritic arbor and soma size analysis

Dendritic arbor reconstruction and measurements were performed blinded to manipulations. High-resolution images of YFP-labeled RGC dendritic arbors were acquired using a Leica SP1 confocal microscope (Leica Microsystems Inc., Concord, ON, Canada). Scans were taken at 0.48 to 0.65 μm intervals along the z axis (x and y=1024 \times 1024 pixels with 4 to 6 images averaged at each focal plane). Reconstruction of the entire RGC dendritic arbor was carried out using the computer-aided filament tracing function of the 3D image analysis software Imaris (Bitplane, South Windsor, CT, USA). The following parameters were measured and analyzed in this study: (i) *total dendritic length* : the sum of the lengths of all dendrites per neuron, (ii) *total dendritic field area*: the area within the contour of the arbor created by drawing a line connecting the outermost tips of the dendrites, (iii) *branch order*: the number of times a dendrite branches, starting with order 1, which corresponds to the primary branch emerging from the soma, (iv) *Scholl analysis*: the number of dendrites that cross concentric circles at increasing distances (10 μm interval) from the soma, and (v) *soma size*: the area within the contour drawn around the RGC soma to outline its shape.

Western blot analysis

Whole fresh retinas were rapidly dissected and homogenized with an electric pestle (Kontes, Vineland, NJ, USA) in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors). Protein homogenates were centrifuged at 10 000 r.p.m. for 50 min, and the supernatants were removed and resedimented to yield solubilized extracts. Retinal extracts were resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON, Canada). Blots were incubated overnight at 4 °C with each of the following primary antibodies against: REDD2 (0.5 µg/ml; Fitzgerald, Acton, MA, USA), REDD1 (4 µg/ml; Proteintech, Chicago, IL, USA) or β -actin (0.5 µg/ml; Sigma-Aldrich). Membranes were incubated in anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-linked secondary antibodies (0.5 µg/ml; Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). Blots were developed with a chemiluminescence reagent (ECL; Amersham Biosciences) and exposed to X-OMAT imaging film (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Densitometric analysis was performed using Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) on scanned autoradiographic films obtained from a series of three independent western blots each carried out using retinal samples from distinct experimental groups.

siRNA and rapamycin delivery

The siRNA molecules against REDD2 and siCtrls were designed and provided by Quark Pharmaceuticals Inc. (Research Division, Ness Ziona, Israel). siRNAs were stabilized by alternating 2'O-methylation⁶⁹ and were synthesized by BioSpring GmbH (Frankfurt, Germany). The following siRNA sequences for REDD2 were tested with similar results (sense strands): 5'-ACGTGAACTTGGAAATTGA-3', 5'-CCCAGAGAATTGCCCAAGA-3' and 5'-TTGGACAGACAGTTCTCCA-3'. siCtrls included a non-targeting siCtrl: 5'-ACTAAATTACGCGCGATGC-3' (sense strand), and a siCtrl-Cy3: 5'-GUGCCAACCUGAUGCAGCU-3' (sense strand). Each siRNA (7 µg/µl; total volume: 2 µl) was injected into the vitreous chamber of the left eye using a Hamilton syringe fitted with a 32-gauge glass microneedle. The sclera was exposed and the tip of the needle inserted into the superior ocular hemisphere at a 45° angle through the sclera and retina into the vitreous space using a posterior approach. This route of administration avoids injury to the iris or lens, which can promote RGC survival.^{70,71} After the injection, surgical glue (Indermill; Tyco Health Care, Mansfield, MA, USA) was immediately used to seal the site of injection. Rapamycin (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) diluted in 5% Tween-80 and 5% polyethylene glycol 400 was administered by intraperitoneal injection (6 mg/kg) at the time of axotomy, and 2 days later, for a total of two treatments. This regimen was selected based on the observation that a single dose of rapamycin (6 mg/kg) fully inhibits mTOR activity for 60 h *in vivo*.⁷²

Electrophysiology

Whole-cell recordings were performed on isolated flat-mounted retinas of Thy1-YFPH mice as previously described.⁷³ Briefly, animals were anesthetized using isoflurane and then killed by decapitation. The killing of the mice and dissections were performed in ambient light, after which retinas were kept in the dark. The eyes were dissected and the retinas were rapidly removed and placed in Ames' solution (Sigma-Aldrich). The vitreous was gently removed and the retinas treated with a collagenase/hyaluronidase mixture (240 and 1000 U/ml, respectively; Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) at room temperature for 5–10 min. Retinas were mounted with the vitreal side up and superfused with Ames' solution bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ at room temperature. YFP-positive RGCs were visualized with an epifluorescent microscope, captured with an infrared-sensitive CCD camera and displayed on a video monitor. The camera was mounted on an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope equipped with a $\times 40$ water-immersion objective. Whole-cell recordings were performed using a computer-controlled Multiclamp 700A amplifier and a Digidata 1322A digitizer (Axon Instruments, Downingtown, PA, USA). Patch pipettes (resistance 5–7 M Ω) were pulled from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.12 mm ID; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) on a Sutter P-97 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Intracellular solution contained : 140 mM K-gluconate, 5 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, Tris 2 mM ATP, Tris 0.4 mM GTP and Alexa Fluor 594 (15–30 μ M; Molecular Probes) (pH 7.2–7.3, 280–300 mOsmol/kg). During recordings, injection of step current from –250 to 350 pA was carried out to characterize the intrinsic properties of

RGCs. An argon laser (488 nm) was used in the line scan mode to provide a linear stimulus moving at the speed of $4\ \mu\text{s}$ per pixel. Data analyses were carried out offline using P-clamp 8 or 9 (Axon Instruments).

Statistical analyses

Data analysis and statistics were performed using the GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) by a one-way ANOVA, followed by the Bonferroni or Dunnett's multiple comparison *post hoc* tests, or by a Student's *t*-test as indicated in the legends.

REFERENCES

1. Luo L, O'Leary DDM. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Ann Rev Neurosci* 2005; **28** : 127–156.
2. Cheng P-l, Poo M-m. Early events in axon/dendrite polarization. *Ann Rev Neurosci* 2012; **35** : 181–201.
3. Wong RO, Ghosh A. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 2002; **3** : 803–812.
4. Lin Y-C, Koleske AJ. Mechanisms of synapse and dendrite maintenance and their disruption in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Ann Rev Neurosci* 2010; **33** : 349–378.
5. Liu M, Duggan J, Salt TE, Cordeiro MF. Dendritic changes in visual pathways in glaucoma and other neurodegenerative conditions. *Exp Eye Res* 2011; **92** : 244–250.
6. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-Kinase–Akt–mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 2005; **25** : 11300–11312.
7. Kumar V, Zhang M-X, Swank MW, Kunz J, Wu G-Y. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras–PI3K–Akt–mTOR and Ras–MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 2005; **25** : 11288–11299.
8. Gao X, Neufeld TP, Pan D. *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* 2000; **221** : 404–418.
9. Kwon C-H, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W *et al.* Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* 2006; **50** : 377–388.
10. Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 2010; **33** : 67–75.
11. Li N, Lee B, Liu R-J, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 2010; **329** : 959–964.
12. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E *et al.* Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 2004; **18** : 2893–2904.
13. Corradetti MN, Inoki K, Guan K-L. The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* 2005; **280** : 9769–9772.
14. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol* 2005; **25** : 5834–5845.

15. Imen JS, Billiet L, Cuaz-Pérolin C, Michaud N, Rouis M. The regulated in development and DNA damage response 2 (REDD2) gene mediates human monocyte cell death through a reduction in thioredoxin-1 expression. *Free Radic Biol Med* 2009; **46**: 1404–1410.
16. Cuaz-Pérolin C, Furman C, Larigauderie G, Legedz L, Lasselin C, Copin C *et al.* REDD2 gene is upregulated by modified LDL or hypoxia and mediates human macrophage cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 1830–1835.
17. Miyazaki M, Esser KA. REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch. *Am J Phys* 2009; **296**: C583–C592.
18. Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 2000; **28**: 41–51.
19. Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F *et al.* Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res* 2011; **92**: 377–387.
20. Sun W, Li N, He S. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 2002; **451**: 115–126.
21. Coombs J, van der List D, Wang GY, Chalupa LM. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience* 2006; **140**: 123–136.
22. Jefferies HBJ, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5[prime]TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 1997; **16**: 3693–3704.
23. Ikenoue T, Hong S, Inoki K. Monitoring mammalian target of rapamycin (mTOR) activity. *Methods Enzymol* 2009; **452**: 165–180.
24. Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR. Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 2003; **22**: 49–61.
25. Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR *et al.* Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 2003; **23**: 2284–2293.
26. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008; **22**: 239–251.
27. Reiling JH, Hafen E. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev* 2004; **18**: 2879–2892.
28. Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S *et al.* Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 2283–2293.

29. Del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Ji D, Manso AG, Osborne NN. RTP801 immunoreactivity in retinal ganglion cells and its down-regulation in cultured cells protect them from light and cobalt chloride. *Brain Res Bull* 2013; **98**: 132–144.
30. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992; **69**: 1227–1236.
31. Janssen KT, Mac Nair CE, Dietz JA, Schlamp CL, Nickells RW. Nuclear atrophy of retinal ganglion cells precedes the Bax-dependent stage of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; **54**: 1805–1815.
32. Kwon C-H, Zhu X, Zhang J, Baker SJ. mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 12923–12928.
33. Wong WT, Wong ROL. Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Curr Opin Neurobiol* 2000; **10**: 118–124.
34. Cline HT. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2001; **11**: 118–126.
35. Koleske AJ. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci* 2013; **14**: 536–550.
36. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 2012; **31**: 152–181.
37. Morgan JE, Datta AV, Erichse nJT, Albon J, Boulton ME. Retinal ganglion cell remodelling in experimental glaucoma. *Adv Exp Med Biol* 2006; **572**: 397–402.
38. Shou T, Liu J, Wang W, Zhou Y, Zhao K. Differential dendritic shrinkage of alpha and beta retinal ganglion cells in cats with chronic glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 3005–3010.
39. Weber AJ, Kaufman PL, Hubbard WC. Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 2304–2320.
40. Li Z-w, Liu S, Weinreb RN, Lindsey JD, Yu M, Liu L *et al*. Tracking dendritic shrinkage of retinal ganglion cells after acute elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**: 7205–7212.
41. Williams PA, Howell GR, Barbay JM, Braine CE, Sousa GL, John SWM *et al*. Retinal ganglion cell dendritic atrophy in DBA/2J glaucoma. *PLoS One* 2013; **8**: e72282.
42. Della Santina L, Inman DM, Lupien CB, Horner PJ, Wong ROL. Differential progression of structural and functional alterations in distinct retinal ganglion cell types in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2013; **33**: 17444–17457.
43. Feng L, Zhao Y, Yoshida M, Chen H, Yang JF, Kim TS *et al*. Sustained ocular hypertension induces dendritic degeneration of mouse retinal ganglion cells that depends on cell type and location. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; **54**: 1106–1117.

44. Pavlidis M, Stupp T, Naskar R, Cengiz C, Thanos S. Retinal ganglion cells resistant to advanced glaucoma: A Postmortem Study of Human Retinas with the Carbocyanine Dye DiI. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 5196–5205.
45. Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SWM. Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Ann Rev Neurosci* 2012; **35**: 153–179.
46. Kalesnykas G, Oglesby EN, Zack DJ, Cone FE, Steinhart MR, Tian J *et al*. Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; **53**: 3847–3857.
47. Leung CK-s, Weinreb RN, Li ZW, Liu S, Lindsey JD, Choi N *et al*. Long-term *in vivo* imaging and measurement of dendritic shrinkage of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**: 1539–1547.
48. Lin B, Wang SW, Masland RH. Retinal ganglion cell type, size, and spacing can be specified independent of homotypic dendritic contacts. *Neuron* 2004; **43**: 475–485.
49. Kim I-J, Zhang Y, Yamagata M, Meister M, Sanes JR. Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature* 2008; **452**: 478–482.
50. Weber AJ, Harman CD. BDNF preserves the dendritic morphology of α and β ganglion cells in the cat retina after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 2456–2463.
51. Ortells MC, Morancho B, Drews-Elger K, Viollet B, Laderoute KR, López-Rodríguez C *et al*. Transcriptional regulation of gene expression during osmotic stress responses by the mammalian target of rapamycin. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 4368–4384.
52. Ergorul C, Ray A, Huang W, Wang D, Ben Y, Cantuti-Castelvetri I *et al*. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and some HIF-1 target genes are elevated in experimental glaucoma. *J Mol Neurosci* 2010; **42**: 183–191.
53. Kanamori A, Catrinescu M-M, Kanamori N, Mears KA, Beaubien R, Levin LA. Superoxide is an associated signal for apoptosis in axonal injury. *Brain* 2010; **133**: 2612–2625.
54. Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B *et al*. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 2008; **322**: 963–966.
55. Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z. PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp Neurol* 2010; **223**: 45–50.
56. Morgan-Warren PJ, Berry M, Ahmed Z, Scott RAH, Logan A. Exploiting mTOR signaling: a novel translatable treatment strategy for traumatic optic neuropathy? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; **54**: 6903–6916.
57. Kurimoto T, Yin Y, Omura K, Gilbert H-y, Kim D, Cen L-P *et al*. Long-distance axon regeneration in the mature optic nerve: contributions of oncomodulin, cAMP, and pten gene deletion. *J Neurosci* 2010; **30**: 15654–15663.

58. Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D. Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation. *Neurobiol Dis.* 2012; **46**: 314–324.
59. Swiech L, Blazejczyk M, Urbanska M, Pietruszka P, Dortland BR, Malik AR *et al.* CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *J Neurosci* 2011; **31**: 4555–4568.
60. Malik AR, Urbanska M, Macias M, Skalecka A, Jaworski J. Beyond control of protein translation: What we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochim Biophys Acta* 2013; **1834**: 1434–1448.
61. Ward NJ, Ho KW, Lambert WS, Weitlauf C, Calkins DJ. Absence of transient receptor potential vanilloid-1 accelerates stress-induced axonopathy in the optic projection. *J Neurosci* 2014; **34**: 3161–3170.
62. Raab-Graham KF, Haddick PCG, Jan YN, Jan LY. Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites. *Science* 2006; **314**: 144–148.
63. Cudmore RH, Fronzaroli-Molinieres L, Giraud P, Debanne D. Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *J Neurosci* 2010; **30**: 12885–12895.
64. Metz AE, Spruston N, Martina M. Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 2007; **581**: 175–187.
65. Bateup Helen S, Johnson Caroline A, Denefrio Cassandra L, Saulnier Jessica L, Kornacker K, Sabatini Bernardo L. Excitatory/inhibitory synaptic imbalance leads to hippocampal hyperexcitability in mouse models of tuberous sclerosis. *Neuron* 2013; **78**: 510–522.
66. Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A. Inhibition of p75NTR in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 2009; **40**: 410–420.
67. Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald IK, Sapieha P, Bourgeois P *et al.* Excitotoxic death of retinal neurons *in vivo* occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci* 2009; **29**: 5536–5545.
68. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M *et al.* Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 3860–3868.
69. Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk GJ *et al.* Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 2705–2716.
70. Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 2000; **20**: 4615–4626.

71. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1632–1636.
72. Meikle L, Pollizzi K, Egnor A, Kramvis I, Lane H, Sahin M *et al.* Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function. *J Neurosci* 2008; **28**: 5422–5432.
73. Schmidt TM, Kofuji P. An isolated retinal preparation to *record* light response from genetically labeled retinal ganglion cells. *J Vis Exp* 2011; **47**: 2367.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. T. E. Kennedy, E. S. Ruthazer, and P. P. Roux for helpful advice and comments on the manuscript; and Drs. H. Kalinski, H. Ashush, and I. Mett (Quark Pharmaceuticals, Inc.) for siRNA design and *in vitro* activity testing. This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (A.D.P.), and the Réseau de Recherche en Santé de la Vision (A.D.P.). B.M. is the recipient of a fellowship from the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS) and the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC). P.M. is the recipient of a fellowship from the Réseau de recherche en santé buccodentaire et osseuse. A.D.P. is a Chercheur Boursier National FRQS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.M., P.M., A.K., R.A.M. and A.D.P. designed the experiments. E.F. designed and characterized the siRNAs used in this study. B.M., P.M., and J.A. performed the experiments. B.M., P.M., A.K. and A.D.P. analyzed data and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTEREST STATEMENT

B.M., P.M., J.A., R.A.M., A.K., and A.D.P. declare no conflict of interest. E.F. is Chief Scientific Officer at Quark Pharmaceuticals and owns company's stock options.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. RGC dendritic arbors retract soon after axonal injury and prior to cell death.

(a) Quantitative analysis of RGC densities showed no significant change in the number of YFP-positive RGCs at 3 days after axotomy, whereas substantial neuronal loss was observed at 5 days after lesion (axotomy 3 days: $n=7$; axotomy 5 days: $n=4$). (b) A similar pattern of RGC loss was observed using the RGC-specific marker Brn3a ($n=3$). The density of RGCs in intact, uninjured retinas is shown as reference ($n=11$). Data are expressed as mean \pm S.E.M. (ANOVA, $***P<0.001$, $n=3-11$ mice per group). (c-e) YFP-positive RGCs that colabeled with an antibody against NF-H and had clearly identifiable axons (arrow) were selected for dendritic arbor imaging and reconstruction. Scale bar: 25 μ m. (f and g) Three days after axotomy, RGCs had visibly smaller dendritic arbors than non-injured, intact neurons (axotomy: $n=21$ cells; intact: $n=17$ cells). Quantitative analysis of dendritic parameters revealed a significant reduction in total dendritic length (h), dendritic field area (i) and arbor complexity (j, Sholl analysis). Values are expressed as mean \pm S.E.M. (Student's t-test, $**P<0.005$, $*P<0.05$, cells were analyzed from 5 mice per group).

FIGURE 2. mTOR activity decreases in injured RGCs.

(a) Phospho-S6 labeling was detected in neurons of the INL and GCL. (b-i) Colabeling of phospho-S6 with TUJ1, an RGC-specific marker, revealed mTOR activity in RGC soma and dendrites (arrowhead, i). (j-l) Phospho-S6 labeling in the INL colocalized with the calcium-binding protein calbindin, a marker for horizontal cells. (m and n) Loss of phospho-S6 in RGCs was observed at 3 days after axotomy, before the onset of cell death, whereas phospho-S6 expression in horizontal cells

remained unchanged. (o–q) Phospho-S6 downregulation reflected loss of mTOR activity and not RGC death because these neurons were readily detected with TUJ1. (r) RGCs that expressed both phospho-S6 and TUJ1 with respect to all TUJ1-positive cells decreased after injury. (s) The number of horizontal cells expressing both phospho-S6 and calbindin did not change with axotomy. Values are expressed as mean±S.E.M. (Student's t-test, *P<0.05, n=3–4 mice per group). Scale bars: (a–l and o–q)=25µm and (m and n)=50µm. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer.

FIGURE 3. REDD2 is upregulated in injured RGCs. (a) Low levels of REDD2 were detected in the GCL of non-injured retinas. (b) In contrast, a marked increase in REDD2-positive labeling was observed at 3 days after axotomy. (c–e) Colabeling with REDD2 and Brn3a demonstrated that REDD2 upregulation in injured RGCs. (a and f–h) REDD2 protein expression in the OPL colocalized with calbindin-positive horizontal cell proximal dendrites. (i–l) The family member REDD1 was selectively expressed in the GCL, and colabeling with the RGC-specific marker Brn3a confirmed its expression by RGCs. (m–o) Western blot and densitometric analyses demonstrated that REDD2 was upregulated as early as 48 h after axonal damage, whereas REDD1 remained unchanged. The lower panel represents the same blot as in the upper panels but probed with an antibody that recognizes β-actin used to confirm equal protein loading. Axo 48 h, Axo 72 h: analysis performed at 48 or 72 h, respectively, after axotomy. Values are expressed as mean±S.E.M. (ANOVA, ***P<0.001, n=3–5 mice per group). Scale bars: (a and b)=50 µm and (c–h)=25 µm. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer.

FIGURE 4. REDD2 knockdown restores mTOR activity. (a–d) Intravitreal delivery of siCtl-Cy3 resulted in rapid and effective uptake by RGCs, visualized with the retrograde tracer FG. (e and f) Western blot and densitometric analyses showed that intravitreal delivery of siRNA against REDD2 (siREDD2) led to a reduction of retinal REDD2 protein, while siCtl had no effect (Student's t-test, *** $P < 0.01$, $n = 4-5$ mice per group). (e and g) siREDD2 did not decrease or increase the protein levels of REDD1, confirming the specificity of the siRNA. The lower panel represents the same blot as in the upper panels but probed with an antibody that recognizes β -actin used to confirm equal protein loading. (h–j) siRNA-mediated knockdown of REDD2 occurred in RGCs, visualized with Brn3a, but not in retinas treated with siCtl (k–m). (n and o) Axotomized retinas treated with siREDD2 had more phospho-S6-positive RGCs compared with siCtl-treated retinas. (p) Quantitative analysis demonstrated a 45% increase in the number of TUJ1-positive axotomized RGCs expressing phospho-S6 in the presence of siREDD2 compared with control retinas. The number of phospho-S6-positive horizontal cells did not change (q). Values are expressed as mean \pm S.E.M. (Student's t-test, * $P < 0.05$, $n = 4$ mice per group). Scale bars: (a–d) = 50 μ m; (h–o) = 25 μ m. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer.

FIGURE 5. REDD2-dependent increase in mTORC1 function rescues dendritic arbors. (a and b) siREDD2-treated RGCs ($n = 20$ cells) have elaborate arbors with longer dendrites than control neurons treated with siCtl ($n = 18$ cells). (c) Coadministration of siREDD2 with rapamycin (Rapa, $n = 19$ cells), an inhibitor of the mTORC1, blocked the effect of siREDD2 on

dendritic morphology (4–5 mice per group). (d and f) The total dendritic length and field area increased in siREDD2-treated retinas compared with controls treated with siCTL or a combination of siREDD2 and rapamycin. (e and g) Administration of siREDD2 (n=19 cells) or rapamycin alone (n=17 cells) did not elicit changes in dendritic length or field area of non-injured (intact) neurons (4–5 mice per group). (h) Analysis of the contribution of proximal dendrites (orders 1–3) and distal dendrites (orders 4–10) showed that injury-induced changes and the response to siREDD2 occurred primarily in distal dendrites. (i) Sholl analysis revealed an increase in arbor complexity in axotomized siREDD2-treated RGCs compared with cells exposed to siCtl or a combination of siREDD2 and rapamycin. All analyses were performed at 3 days after axotomy. Values are expressed as the mean±S.E.M. (ANOVA, **P<0.001). See Table 2 for all N values. Scale bars: (a–c) =50 μm, Axo, axotomy.

FIGURE 6. siREDD2-mediated mTOR activation restores RGC function. (a–c) Whole-cell recordings were obtained from ON-center YFP-positive RGCs visualized with epifluorescence and infrared differential interference contrast (DIC) optics to position the recording electrode. (b, d and e) The identity of each recorded cell was confirmed following injection of Alexa Fluor 594 through the recording pipette. Analysis of RGC intrinsic properties, including membrane resting potential (f) and resistance (g), did not reveal significant differences between intact and axotomized neurons with or without siREDD2 treatment. (h and i) Light stimulation demonstrated an increase in the frequency of action potentials elicited by axotomized RGCs (n=7 cells) compared with non-injured controls (n=7 cells). (j and k) siREDD2 treatment restored the light-induced firing frequency to levels similar to those

recorded from intact neurons (n=7 cells). (l) No change in the amplitude of action potentials was observed. Values are expressed as the mean±S.E.M. (ANOVA, ***P<0.001). Cells were recorded from 5 to 7 mice per group. Scale bars: (a–e)=20 μm.

FIGURE 7. mTOR activation extends neuronal survival. (a) No significant change in RGC soma size was found at 3 days after axotomy with or without siREDD2 (Axo alone: n=18 cells; Axo+siREDD2: n=20 cells; intact: n=17 cells; 3–5 mice per group). (b–e) Flat-mounted retinas from eyes treated with siREDD2 showed higher densities of Brn3a-labeled RGCs than those treated with siCtl. (f) Quantitative analysis demonstrated that siREDD2 promoted substantial RGC survival relative to siCtl-treated eyes at 5 and 7 days after axotomy. Values are expressed as RGC densities (RGCs/mm² ; mean±S.E.M., ANOVA, *p<0.05, n=3–5 mice per group). The density of RGCs in intact, uninjured retinas is shown as reference (100% survival). Scale bars: (b–e)=50 μm.

TABLE 1. Number of animals (N) used per experiment

Group	Treatment	N	Figure #
RGC survival analysis (YFP)	Intact	11	1a
	Axotomy (3 days)	7	1a
	Axotomy (5 days)	4	1a
RGC survival analysis (Brn3a)	Intact	11	1b
	Axotomy (3 days)	3	1b
	Axotomy (5 days)	3	1b
Immunohistochemistry (NF-H + YFP)	Intact	7	1c-e
Dendritic arbor analysis	Intact	5	1h-j
	Axotomy (3 days)	5	1h-j
Immunohistochemistry (Phospho-S6 + TUJ1)	Intact	4	2a-i, m, r
	Axotomy (3 days)	4	2a-i, n, o-r
Immunohistochemistry (Phospho-S6 + Calbindin)	Intact	3	2j-l, s
	Axotomy (3 days)	3	2j-l, s
Immunohistochemistry (REDD2, REDD1)	Intact	3	3a
	Axotomy (3 days)	3	3b-k
Western blot analysis (REDD2, REDD1)	Intact	5	3l-n
	Axotomy (2 days)	4	3l-n
	Axotomy (3 days)	4	3l-n
siRNA uptake (siCtl-Cy3 + Fluorogold)	Intact + siCtl-Cy3	4	4a-d
Western blot analysis (REDD2, REDD1)	Axotomy + siCtl	4	4e-g
	Axotomy + siREDD2	5	4e-g
Immunohistochemistry (Phospho-S6 + Brn3a)	Axotomy + siCtl	4	4k-n
	Axotomy + siREDD2	4	4h-j, o
Immunohistochemistry (Phospho-S6 + Calbindin)	Axotomy + siCtl	3	4q
	Axotomy + siREDD2	3	4q
Dendritic arbor analysis	Axotomy + siCtl	5	5a, d-i
	Axotomy + siREDD2	5	5b, d-i
	Axotomy + siREDD2 + Rapa	4	5c, d-i
	Intact + siREDD2	5	5d-i
	Intact + Rapamycin (Rapa)	5	5d-i
Electrophysiology	Intact	7	6a-h, k, l
	Axotomy	5	6f, g, i, k, l
	Axotomy + siREDD2	5	6f, g, j, k, l
	Axotomy + siCtl	20	N/A
RGC soma analysis	Intact	5	7a
	Axotomy + siCtl	5	7a
	Axotomy + siREDD2	5	7a
RGC survival analysis (Brn3a)	Axotomy (5 days) + siREDD2	4	7b, f
	Axotomy (5 days) + siCtl	3	7c, f
	Axotomy (7 days) + siREDD2	5	7d, f
	Axotomy (7 days) + siCtl	4	7e, f

TABLE 2. Dendritic parameters

Group	Treatment	Total dendritic length (μm) (mean \pm S.E.M.)	Dendritic field area ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$) (mean \pm S.E.M.)	Sholl analysis (area under curve) (mean \pm S.E.M.)	Number of animals (N)	Number of RGCs (n)
Intact	-	4391.7 \pm 118.0	149.7 \pm 10.5	3413.8 \pm 128.6	5	17
Intact	siREDD2	4348.4 \pm 275.1	170.5 \pm 17.5	3138.6 \pm 237.7	5	19
Intact	Rapamycin	4225.6 \pm 237.1	144.4 \pm 20.2	3057.1 \pm 241.8	5	17
Axotomy	-	3706.9 \pm 190.2	111.8.5 \pm 9.9	2682.0 \pm 128.6	5	21
Axotomy	siCtl	3613.6 \pm 225.8	108.6 \pm 13.8	2565.7 \pm 216.4	5	18
Axotomy	siREDD2	4597.5 \pm 229.2	163.5 \pm 9.7	3713.8 \pm 138.5	5	20
Axotomy	siREDD2 + Rapamycin	3523.0 \pm 185.0	110.8 \pm 10.9	2770.0 \pm 219.6	4	19

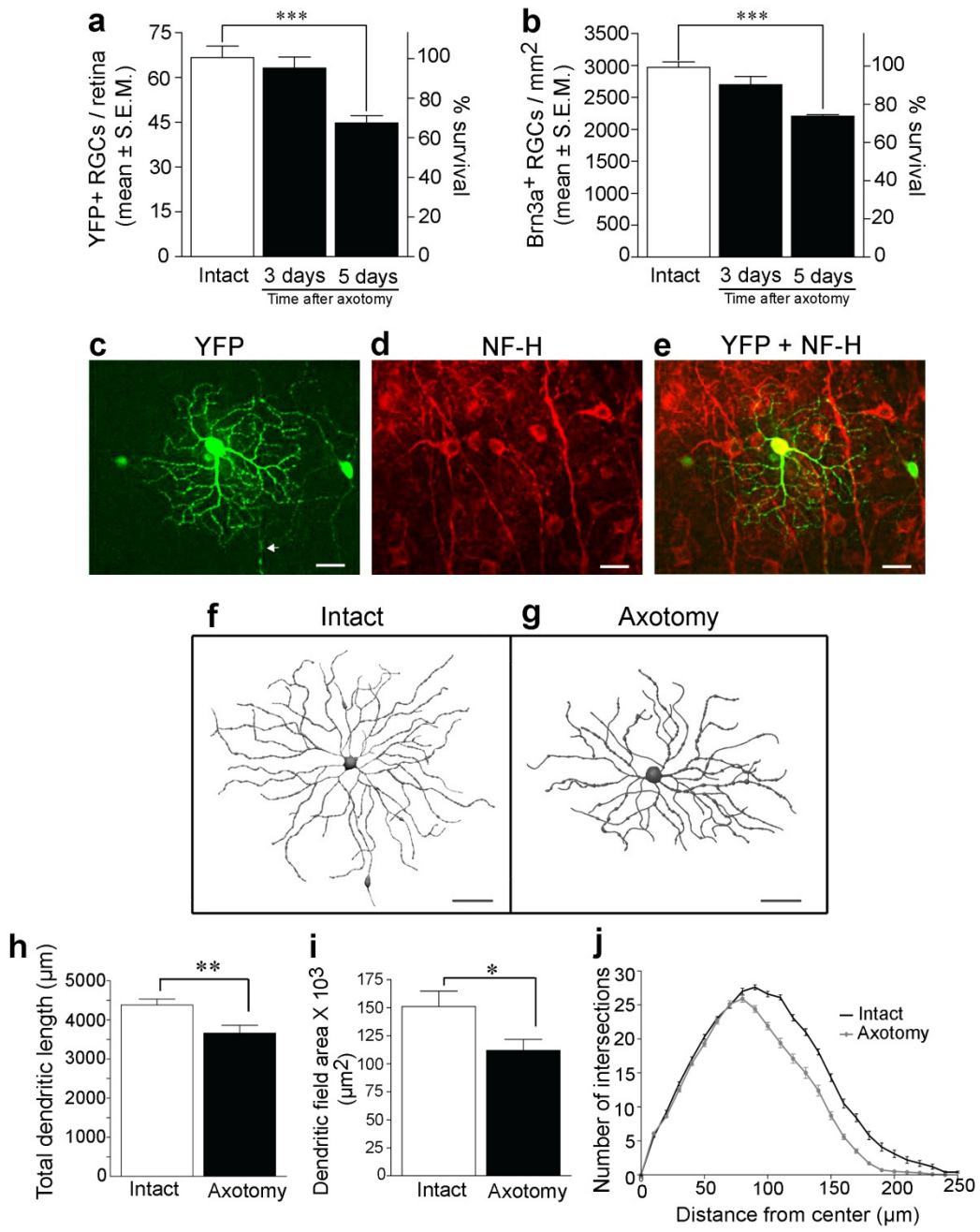


Figure 1- Morquette et al.

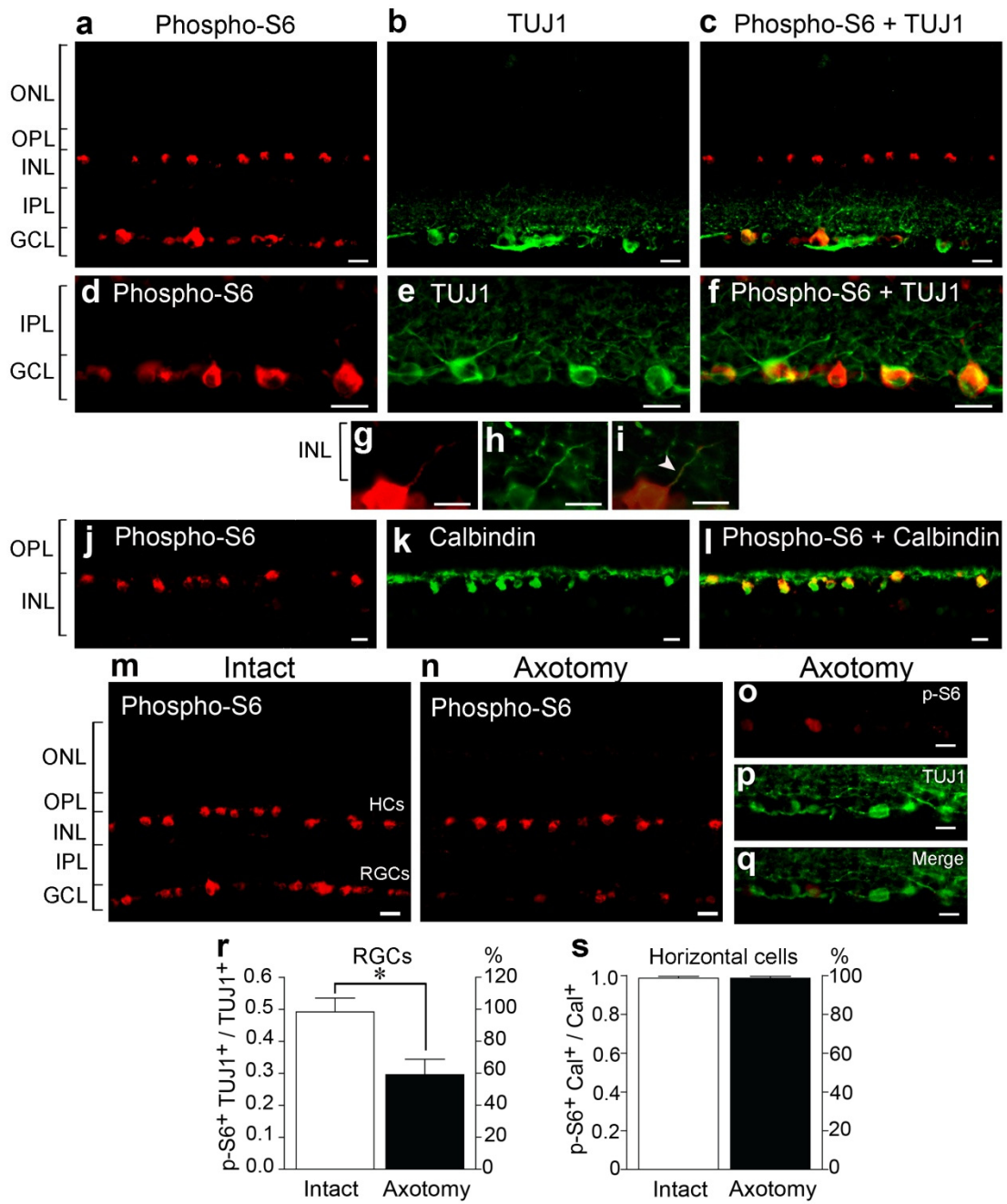


Figure 2 - Morquette et al.

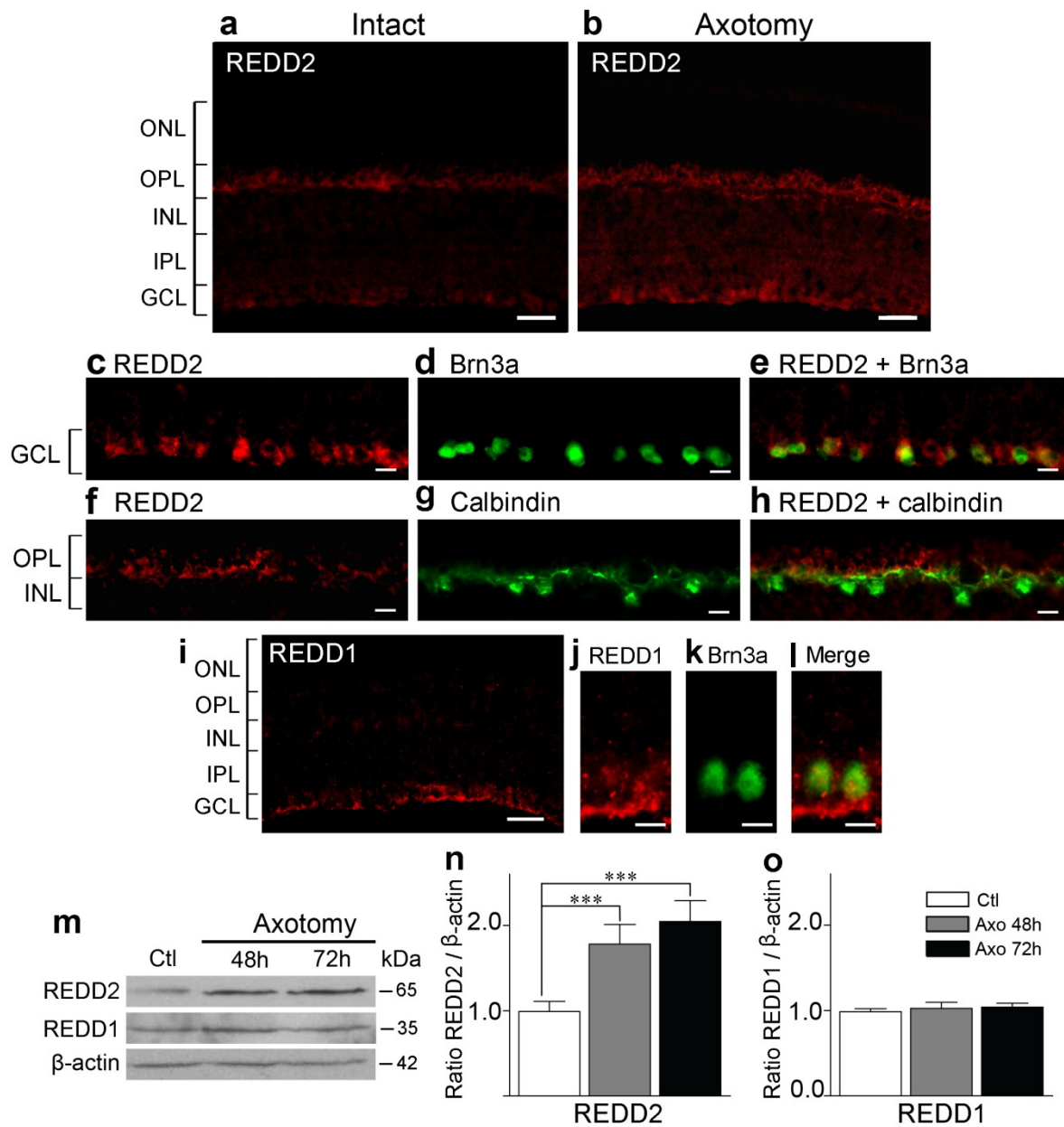


Figure 3 - Morquette et al.

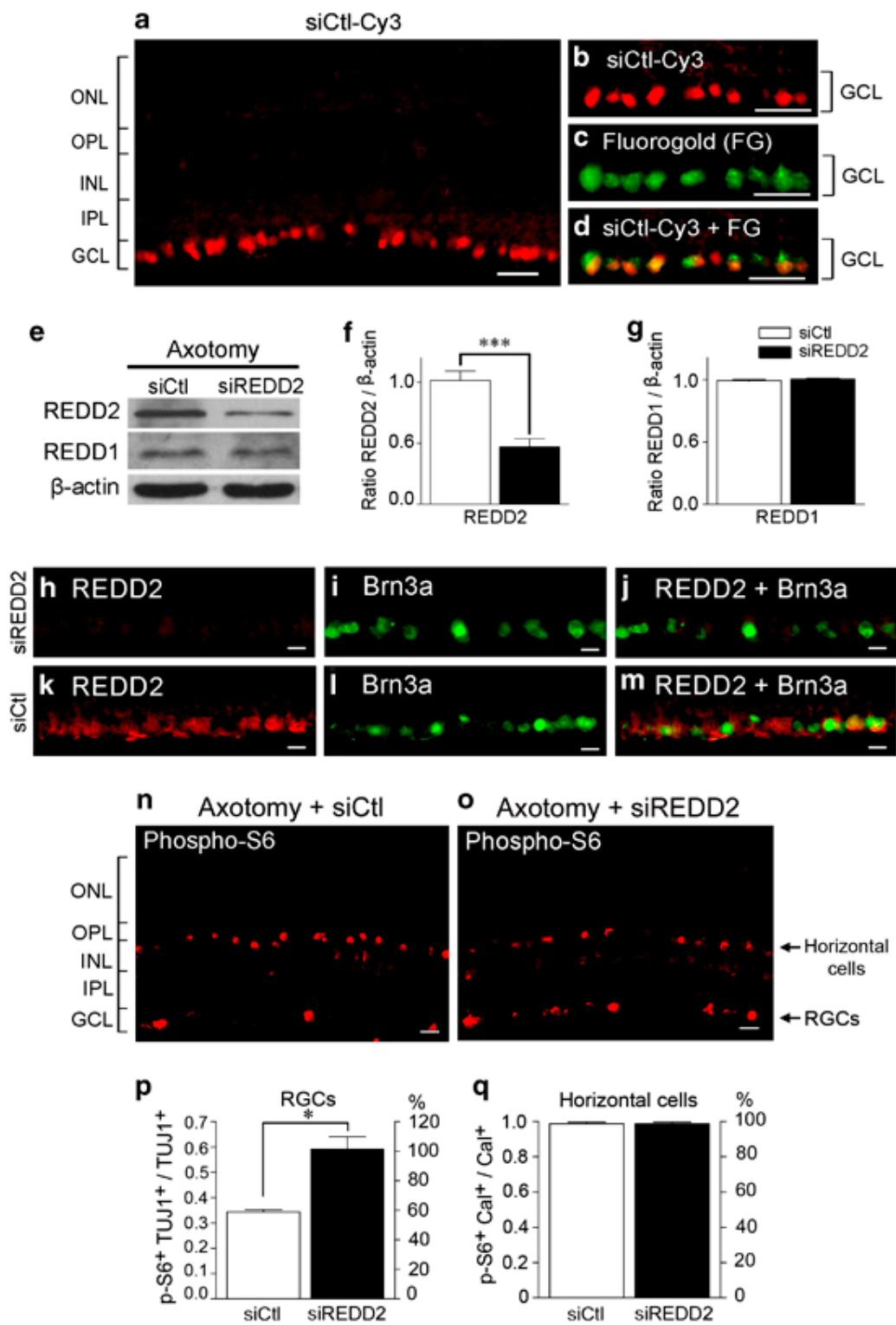


Figure 4 – Morquette et al.

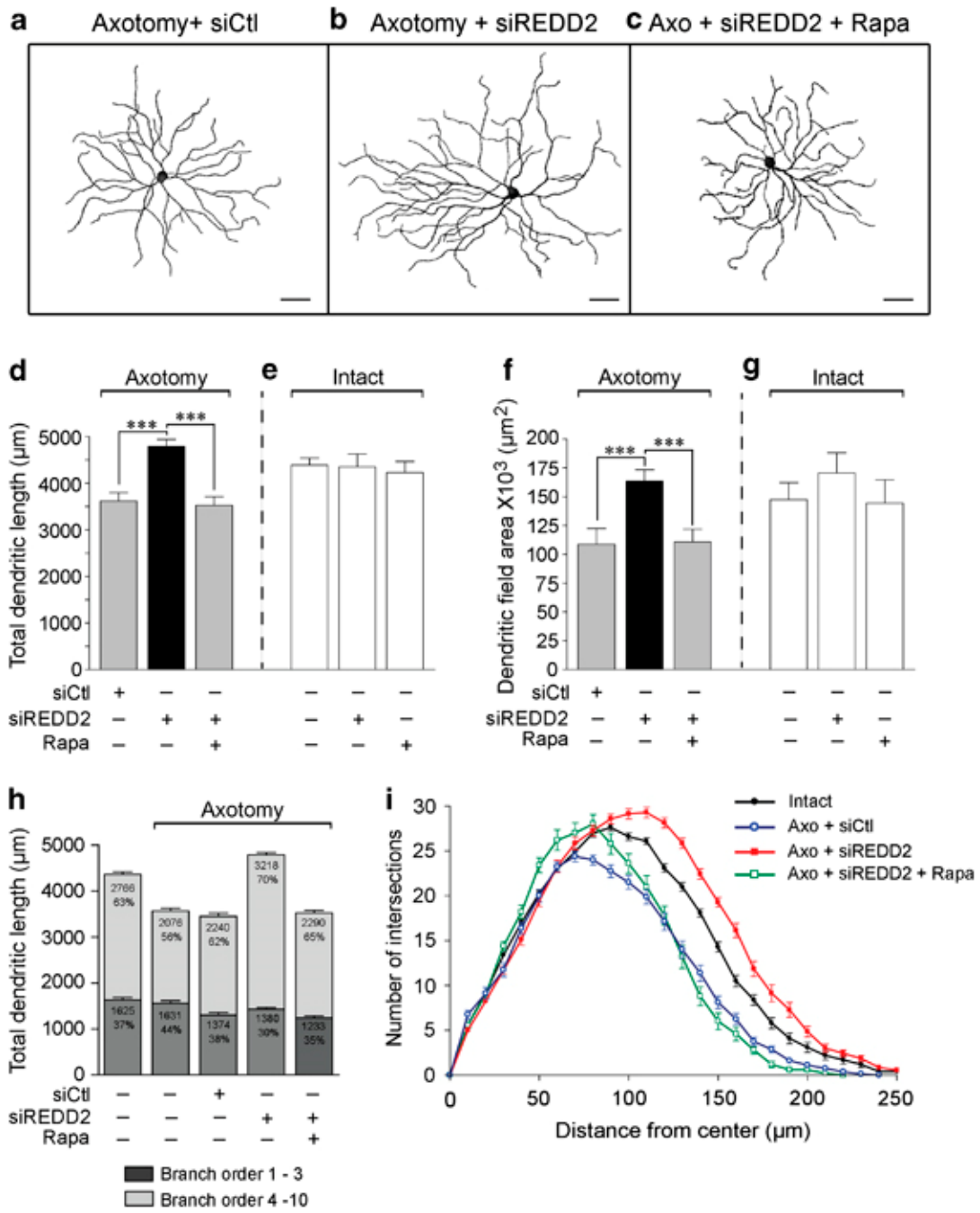


Figure 5 – Morquette et al.

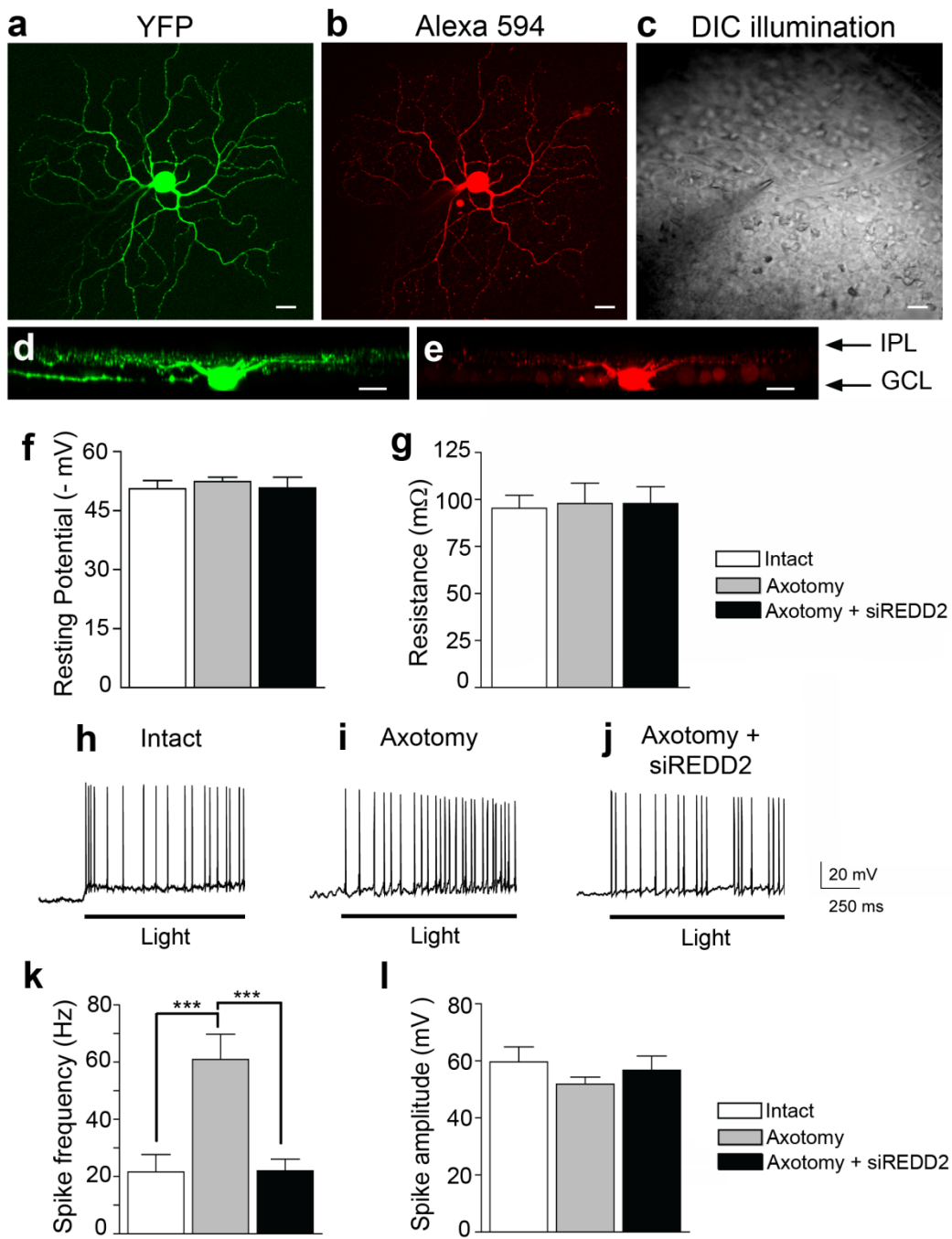


Figure 6 - Morquette et al.

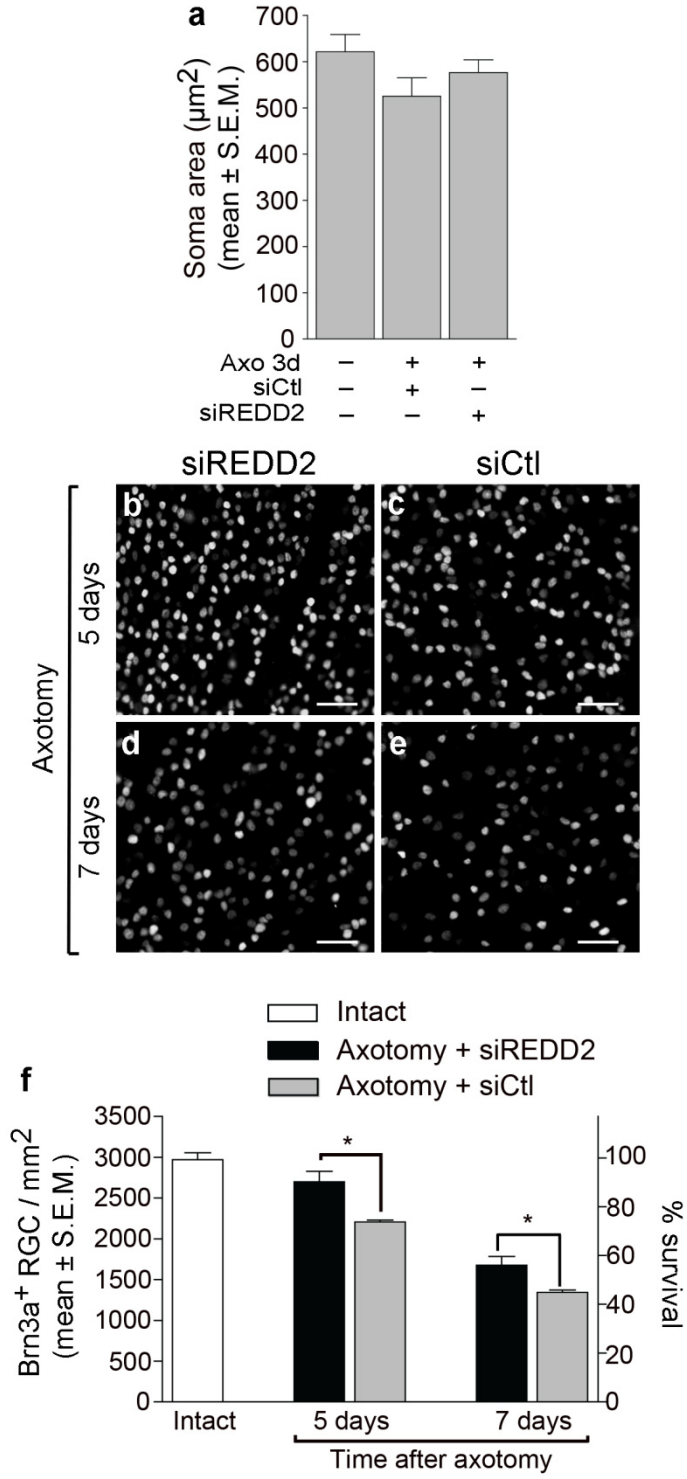


Figure 7 - Morquette et al.

ANNEXE B : FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

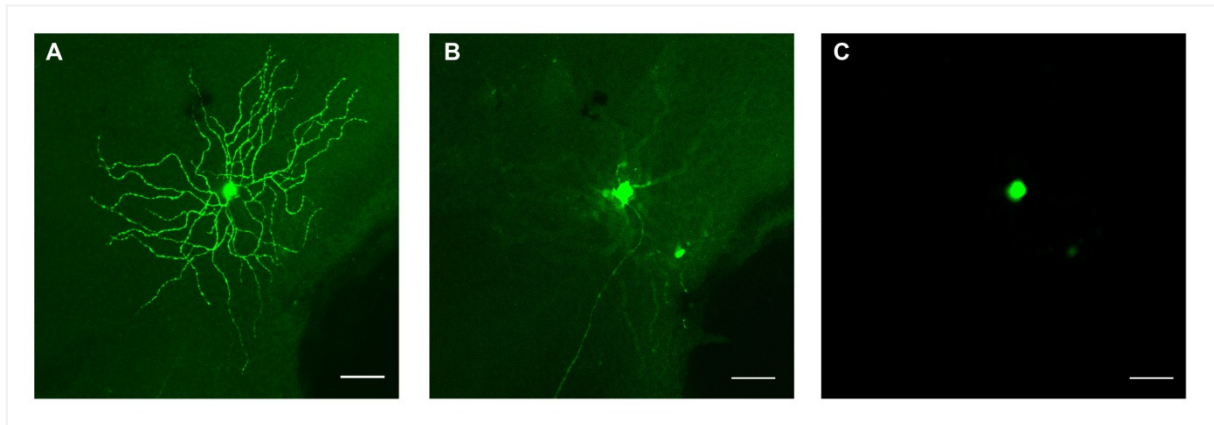


FIGURE 1. Une CGR YFPH exprimant la protéine fluorescente jaune (YFP) dans tous les compartiments cellulaires. Les images sont prises à d'un microscope confocale, dans différents plans dans l'axe des z afin de montrer l'arbre dendritique (A), l'axone (B) et le corps cellulaire (C) d'une CGR. Echelle : 50 μm (Morquette et al. 2008)

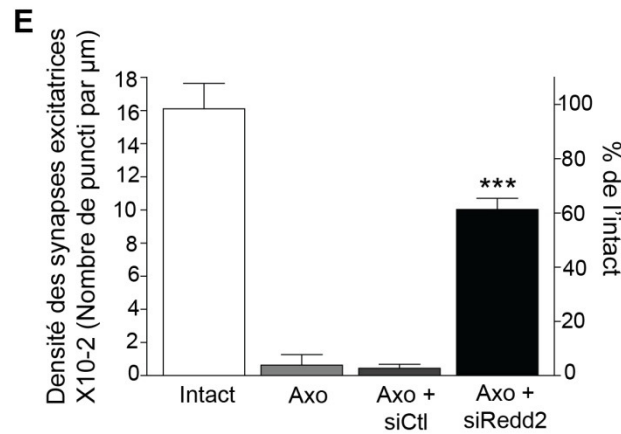
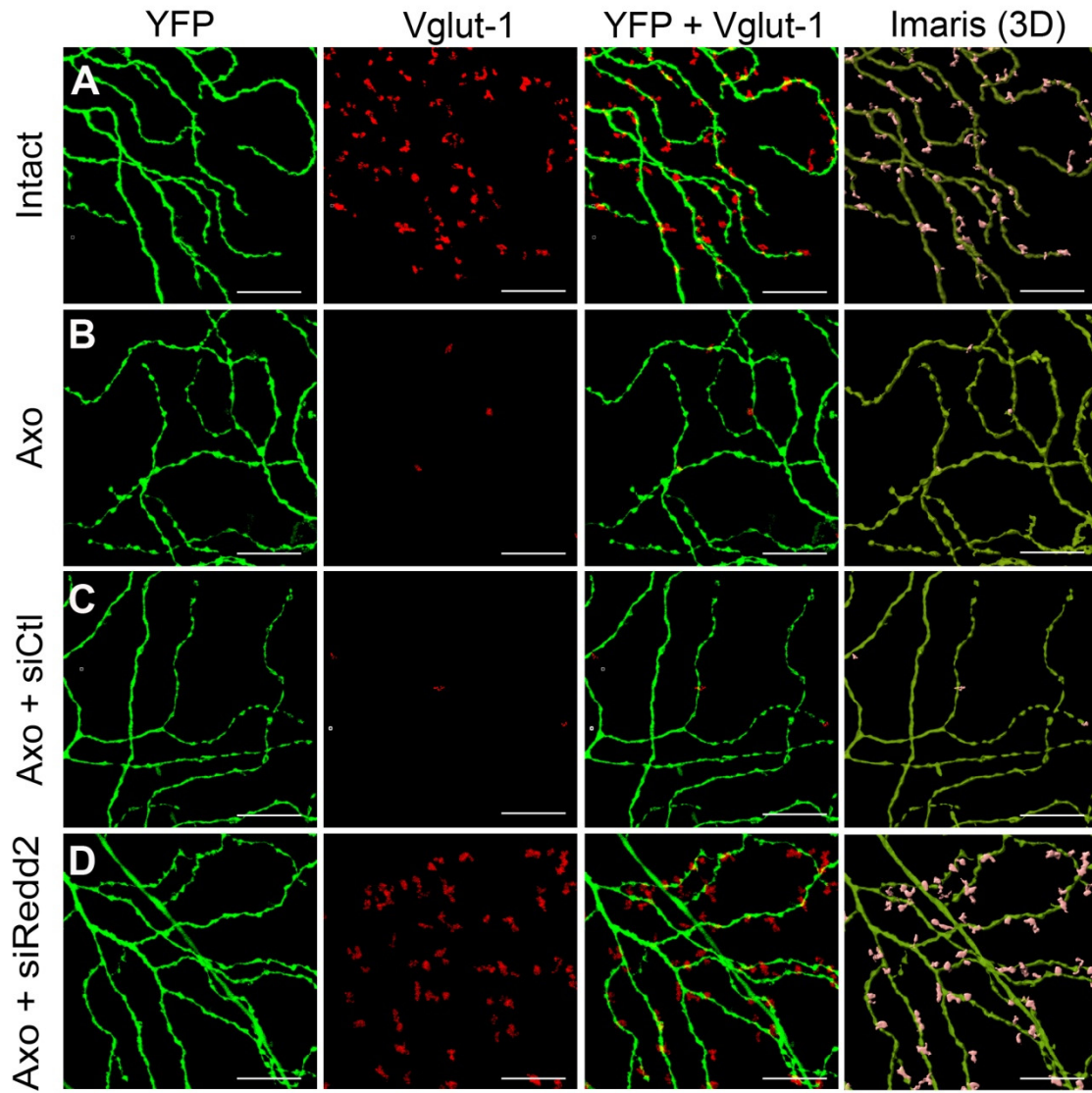


FIGURE 2: L'activité de la mTOR restaure la perte du VGLUT-1 *in vivo* après lésion axonale. Le *vesicular glutamate transporter 1* (VGLUT-1) est une protéine exprimée dans les synapses en ruban (ribbon synapses) se situant dans les terminaisons axonales des cellules bipolaires. Ce sont des synapses glutamatergiques excitatrices qui font contactes avec les CGRs et les cellules amacrines dans la couche nucléaire interne (CNI). Dans cette figure (A-D) nous présentons des images d'arbres dendritiques YFP partielles de CGRs qui sont juxtaposés avec le VGLUT-1 reconstitué à l'aide du logiciel Imaris Bitplane. Ici, seules les synapses qui colocalisent avec les dendrites sont représentées. E, L'analyse quantitative des puncti VGLUT-1 qui colocalisent avec les dendrites de CGR - YFP dans des rétines intactes et traitées. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. (ANOVA, Tukey's multiple comparison test; *** $p < 0.001$). Échelle, 25 μ m.

ANNEXE C: COLLABORATION

ASPP1/2 REGULATE P53-DEPENDENT DEATH OF RETINAL GANGLION CELLS THROUGH PUMA AND FAS/CD95 ACTIVATION *IN VIVO.*

Journal of Neuroscience (2013) 33(5):2205-16

(Deuxième auteur)

Section: Cellular & Molecular

ASPP1/2 regulate p53-dependent death of retinal ganglion cells through PUMA and Fas/CD95 activation *in vivo*.

Ariel M. Wilson¹, **Barbara Morquette**¹, Mohamed Abdouh², Nicolás Unsain³, Philip A. Barker³, Elena Feinstein⁴, Gilbert Bernier², and Adriana Di Polo^{1,2}

¹Department of Pathology and Cell Biology and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC), ²Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, University of Montreal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada, ³Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada, and ⁴Quark Pharmaceuticals, Research Division, Ness Ziona 70400, Israel

Abbreviated title: ASPP1/2 gene silencing protects injured RGCs.

***Correspondence to:** **Adriana Di Polo,**
Department of Pathology and Cell Biology,
University of Montréal,
2900, Edouard-Montpetit Boulevard,
Pavillon Roger Gaudry, Room N-535,
Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada.

ABSTRACT

The transcription factor p53 mediates neuronal death in a variety of stress-related and neurodegenerative conditions. The proapoptotic activity of p53 is tightly regulated by the apoptosis-stimulating proteins of p53 (ASPP) family members: ASPP1 and ASPP2. However, whether ASPP1/2 play a role in the regulation of p53-dependent neuronal death in the CNS is currently unknown. To address this, we asked whether ASPP1/2 contribute to the death of retinal ganglion cells (RGCs) using *in vivo* models of acute optic nerve damage in mice and rats. Here, we show that p53 is activated in RGCs soon after injury and that axotomy-induced RGC death is attenuated in p53 heterozygote and null mice. We demonstrate that ASPP1/2 proteins are abundantly expressed by injured RGCs, and that short interfering (si)RNA-based ASPP1 or ASPP2 knockdown promotes robust RGC survival. Comparative gene expression analysis revealed that siASPP-mediated downregulation of p53-upregulated-modulator-of-apoptosis (PUMA), Fas/CD95, and Noxa depends on p53 transcriptional activity. Furthermore, siRNA against PUMA or Fas/CD95 confers neuroprotection, demonstrating a functional role for these p53 targets in RGC death. Our study demonstrates a novel role for ASPP1 and ASPP2 in the death of RGCs and provides evidence that blockade of the ASPP–p53 pathway is beneficial for central neuron survival after axonal injury.

Keywords: Retinal Ganglion Cell, p53, Apoptosis, Ankyrin Repeat and Proline-Rich Domain Containing Proteins (ASPP)

INTRODUCTION

The nuclear transcription factor p53 mediates the apoptosis of postmitotic neurons exposed to a wide range of insults (Culmsee and Mattson, 2005). Neuronal death induced by p53 has been documented in a variety of neurodegenerative diseases, suggesting a key role for this transcription factor in the regulation of neuronal viability after injury (Chatoo et al., 2011; Chang et al., 2012). Given its critical role in the control of cell death, several mechanisms exist to ensure tight regulation of p53 activity. The level of p53 protein is kept low in most cell types, including neurons (Soussi, 2000), via rapid and continuous degradation following ubiquitination by Mdm2 and MdmX (Wade et al., 2010). Additional control of p53 function is exerted via posttranslational modifications such as phosphorylation, acetylation, and/or methylation, and by interactions with protein partners (Boehme and Blattner, 2009).

The identification of the apoptosis-stimulating proteins of p53 (ASPP), a family of ankyrin repeat and proline-rich domain-containing proteins, has revealed a new form of p53 regulation. The ASPP family is composed of three members: ASPP1, ASPP2 and iASPP. ASPP2 was identified as a p53-binding protein in a yeast two-hybrid screen (Iwabuchi et al., 1994), and ASPP1 was found in a homology search (Nagase et al., 1998). ASPP1 and ASPP2 enhance p53-dependent death of tumor cells by selectively increasing the ability of p53 to activate proapoptotic gene transcription (Lopez et al., 2000; Ao et al., 2001; Samuels-Lev et al., 2001; Bergamaschi et al., 2006), whereas iASPP inhibits p53-dependent cell death (Yang et al., 1999; Bergamaschi et al., 2003). ASPP1 and ASPP2 play a role in tumor suppression by increasing the ability of p53 to induce apoptosis, but not cell cycle arrest, in tumor-derived cell lines (Samuels-Lev et al., 2001; Slee et al., 2004). ASPP2-null mice die perinatally and although

ASPP2 heterozygous mice survive to adulthood, they display a much higher propensity for developing tumors compared with wild-type counterparts (Vives et al., 2006). This may have physiological relevance since ASPP1/2 protein levels are reduced in many forms of cancer, a deficit associated with poor patient prognosis (Lossos et al., 2002; Liu et al., 2004, 2005; Agirre et al., 2006).

ASPP1/2 function has been examined solely in relation to tumor biology, but the role of these proteins in neuronal apoptosis has not been established. To address this, we asked whether ASPP1 or ASPP2 regulate death of adult retinal ganglion cells (RGCs) after axonal injury. RGCs are CNS neurons that undergo a predictable onset and time course of apoptotic death following optic nerve axotomy. Here, we demonstrate that ASPP1 and ASPP2 proteins are abundantly expressed by intact and injured RGCs, and that depletion of ASPP1 and ASPP2 using short interfering (si)RNAs promotes RGC survival *in vivo*. Moreover, our data support a critical role for the p53-upregulated-modulator-of-apoptosis (PUMA) and Fas/CD95 in siASPP2-mediated survival of injured RGCs. This study identifies a novel role for ASPP1 and ASPP2 as important regulators of neuronal death in the injured CNS.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals.

Animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals (www.ccac.ca). All surgeries were performed in adult, female Sprague Dawley rats (180–200 g) or in p53 knock-out mice under general anesthesia (2% Isoflurane, 0.8 L/min). p53 heterozygote mice (B6; 129S2-*Trp53*^{tm1Tyj}/J; Jackson Laboratory) were maintained in our animal facility and bred to produce p53-null and wild-type littermate control mice.

Axotomy-induced RGC death assay.

Selective RGC death was induced by complete transection (axotomy) of the optic nerve leading to rapid onset and predictable apoptotic loss of these neurons (Berkelaar et al., 1994; Cheng et al., 2002). Before axotomy, RGCs were backlabeled by application of Fluorogold (2%; Fluorochrome) to the superior colliculus, the primary target of these neurons in the rodent brain. To ensure that all RGCs were fully labeled before axonal injury, axotomy was performed 7 d after Fluorogold application. The left optic nerve was transected at 0.5–1 mm from the optic nerve head avoiding damage to the ophthalmic artery. Fundus examination was performed to check the integrity of the retinal circulation after surgery. The right eye was never operated on and served as intact control. At 1 or 2 weeks postlesion, rats were killed by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde (PFA), and the retinas were removed and flat-mounted vitreal side up on a glass slide for examination of the ganglion cell layer. Fluorogold-labeled neurons were counted within three square areas at distances of 1, 2, and 3 mm from the

rat optic disc in each of the four retinal quadrants for a total of 12 retinal areas. In mice retinas, quantification was performed as in rats but sampled areas were localized at 0.25, 0.625, and 1 mm from the optic disc, for a total of 12 retinal areas. Microglia and macrophages, which may have incorporated Fluorogold after phagocytosis of dying RGCs, were excluded from our analysis of neuronal survival based on their morphology. Fluorescent staining was examined with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss) and pictures were captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging) and analyzed with Northern Eclipse software (Empix Imaging).

Reverse transcription and quantitative real-time PCR.

Total RNA was isolated from individual retinas using the RNEasy Mini kit (Qiagen) or TRIzol reagent (Invitrogen). cDNAs were generated from 0.5–3 µg of total RNA using the Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen). PCR for p53 was performed using the following primers: p53 forward: 5'-GATGGTGACGGCCTGGCTCCT-3', p53 reverse: 5'-CTCGAAGCGCTCACGCCAC-3', β-actin forward: 5'-CACCCTTTCTACAATGAGC-3', β-actin reverse: 5'-CGGTCAGGATCTTCATGAGG-3', and the following cycle conditions: 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, 72°C for 1 min. Reaction products were separated on agarose gels, visualized under UV light and digitalized using Gel Doc EZ System (Biorad). Densitometric analysis was performed with ImageJ software (NIH). For p53 target genes, quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using the Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) and a real-time PCR apparatus (BioRad). Rat primer sets were as follows: PUMA forward: 5'-CGGAGACAAGAAGAGCAACA-3', PUMA reverse: 5'-

TAGTTGGGCTCCATTTCTGG-3', Fas/CD95 forward: 5'-CCGACAACAAGCTGCTCAGAA-3', Fas/CD95 reverse: 5'-GGTGCAGTTCGTTTCCACTT-3', Bax forward: 5'-TGCAGAGGATGATTGCTGAC-3', Bax reverse: 5'-GATCAGCTCGGGCACTTTAG-3', Noxa forward: 5'-GGAGTGCACCGGACATAACT-3', Noxa reverse: 5'-CTCCAATTCTCCGGAGTTGA-3', GAPDH forward: 5'-ATGGGAAGCTGGTCATCAAC-3', GAPDH reverse: 5'-GTGGTTCACACCCATCACAA-3'. The ASPP2 primers (QT01599402) were purchased from Qiagen. Mouse primer sets were as follows: PUMA forward: 5'-CAAGAAGAGCAGCATCGACA-3, PUMA reverse: 5'-TAGTTGGGCTCCATTTCTGG-3', Fas/CD95 forward: 5'-AAACAAGCTGCACCC TGACC-3', Fas/CD95 reverse: 5'-CAACCATAGGCGATTTCTGG-3', Bax forward: 5'-CACGTGACCGTGGTGCGCCG-3': Bax reverse: 5'-CCGCTCCCAAGCTGCTCCCCG-3', Noxa forward: 5'-CACCGGACATAACTGTGGTT-3', Noxa reverse: 5'-TTGAGCA CACTCGTCCTTCA-3', HRPT forward: 5'-ACTGTAATGATCAGTCAA CGGG-3', and HRPT reverse: 5'-GGCCTGTATCCAACACTTCG-3'. β -actin, HRPT and GAPDH were used as internal standards for data calibration, and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula was used for the calculation of differential gene expression, as described previously (Chatoo et al., 2009).

siRNA.

The siRNA molecules against ASPP1, ASPP2, and Cy3-labeled siRNA were designed at Quark Pharmaceuticals. The control siRNA against GFP has been described previously (Hamar et al., 2004). All these siRNAs were stabilized by alternating 2'O-methylation (Czuderna et al., 2003) and were synthesized by BioSpring. The following siRNA sequences (sense strands) for ASPP1 and ASPP2 were tested with similar results, ASPP1: 5'-GGAGAGAAGCACACTGAAA-3', 5'-CAGCGTTTACATTTCTAA-3', and 5'-CCGTGTTCTTGAGCAACAA-3'; ASPP2: 5'-AGGGAGTGTTTGAATAAGC-3' and 5'-CACCCAGAGAACATTTATT-3'. The siRNA sequences (sense strands) against PUMA: 5'-GAGCGGCGGAGACAAGAAGA GUU-3'; Fas/CD95: 5'-GUGCAAGUGCAAACCAGACUU-3'; and Noxa: 5'-CAAGGAAAGCUGACGGAGA-3', 5'-GAACAGAAGUGGCUACGAA-3', 5'-CCAUGGAUUUCCUCGGCAA-3', and 5'-AAGCAAUGGUCGUCGAGCA-3' were purchased from Thermo Fisher Scientific. The fluorescent siRNA used for the visualization of intraocular distribution, sequence 5'-GUGCCAACCUGAUGCAGCU-3' (sense strand), contained a Cy3 fluorophore at the 3' end of the antisense strand.

Intravitreal injections.

siRNA against ASPP1, ASPP2, PUMA, Fas/CD95, Noxa, siCy3, or contrôle siGFP (2 µg/µl, total volume: 5 µl) were injected into the vitreous chamber of the left eye using a Hamilton syringe fitted with a 32-gauge glass microneedle. PBS was used as vehicle control. The sclera was exposed and the tip of the needle was inserted at a 45° angle through the sclera and retina into the vitreous space using a posterior approach. This route of administration

avoided injury to the iris or lens, which can promote RGC survival (Mansour-Robaey et al., 1994; Leon et al., 2000).

Retinal immunohistochemistry.

Animals were perfused transcardially with 4% PFA and retinal cryosections (16 μm) were prepared as previously described (Pernet et al., 2005; Lebrun-Julien et al., 2009). Primary antibodies were added to the retinal sections in blocking solution and incubated overnight at 4°C: phospho-p53 (Ser15; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Abcam), ASPP1 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Bethyl Laboratories), ASPP2 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Bethyl Laboratories), or iASPP (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Bethyl Laboratories). For phospho-p53 (Ser15), retinas were subjected to heat-mediated antigen retrieval by incubating sections in 0.01 M sodium citrate in 0.5% Tween 20 (pH 6) at 85–90°C for 30 min. Blocking peptides (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Bethyl Laboratories) were incubated overnight with ASPP1 or ASPP2 primary antibodies (5:1 ratio) before application onto retinal sections. Sections were washed and incubated with secondary antibodies: anti-rabbit IgG (1–8 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Cy3, Alexa 594, or Alexa 488; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Fluorescent labeling was observed with a microscope Zeiss AxioSkop 2 Plus (Carl Zeiss).

Western blot analysis.

Whole fresh retinas were rapidly dissected and homogenized with an electric pestle (Kontes) in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors). Protein homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and the supernatants were removed and resedimented to

yield solubilized extracts. Retinal extracts were resolved on SDS polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science). Blots were incubated overnight at 4°C with each of the following primary antibodies: phospho-p53 (Ser15; 2 µg/ml; Abcam), ASPP1 (1 µg/ml; Bethyl Laboratories), ASPP2 (0.5 µg/ml; Bethyl Laboratories), iASPP (0.5 µg/ml; Bethyl Laboratories), Bax (1.5 µg/ml; N20; Santa Cruz Biotechnology), PUMA (1 µg/ml; Abcam), Noxa (0.5 µg/ml; Sigma-Aldrich), Fas/CD95 (1 µg/ml; BD Transduction Laboratories), or β-actin (0.5 µg/ml; Sigma-Aldrich). Membranes were incubated in anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-linked secondary antibodies (0.5 µg/ml; GE Healthcare). Blots were developed with a chemiluminescence reagent (ECL; GE Healthcare) and exposed to X-OMAT imaging film (Eastman Kodak). Densitometric analysis was performed using Scion Image software on scanned autoradiographic films obtained from a series of three independent Western blots, each performed using retinal samples from distinct experimental groups.

Statistical analyses.

Data analysis and statistics were performed using the GraphPad InStat software by a one-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test, or by a Student's *t* test.

RESULTS

Axotomized RGCs die in a p53-dependent manner

p53 protein is abundantly expressed in the developing retina, but it is substantially downregulated during maturation (O'Connor et al., 2008). To establish whether p53 gene expression or activity increase following optic nerve injury, we performed biochemical and immunohistochemical analysis of retinal samples after axotomy. While p53 mRNA levels did not change at 1 (data not shown) or 3 d (Fig. 1A) after injury, a significant increase in injury-induced phosphorylation of p53 at serine 15 (S15), a key phosphorylation target during p53 activation (Dumaz and Meek, 1999; Unger et al., 1999), was readily detected at 1 d postlesion (Fig. 1B). Immunostaining of Fluorogold-labeled retinas demonstrated selective phospho-p53 upregulation in RGCs at 1 d after axotomy (Fig. 1C), a time point that precedes the onset of RGC death in this model (Villegas-Pérez et al., 1993; Berkelaar et al., 1994). Phosphorylation of p53 at S15 has been shown to be sufficient to induce apoptosis of human glioma cells and leads to selective increase of the proapoptotic p53 targets Fas/CD95 and PUMA (Amano et al., 2009). Consistent with axotomy-induced phosphorylation of retinal p53 at S15, we observed increased protein expression of PUMA and Fas/CD95 at 1 d after axotomy, whereas levels of Bax and Noxa did not change (Fig. 1D). Of interest, phospho-p53 (S15), PUMA, and Fas/CD95 proteins dropped to basal levels at 7 d postinjury (Fig. 1B,D), indicating that axotomy leads to early and transient activation of this pathway.

To address the functional role of increased p53 activity in axotomy-induced RGC death, we analyzed the density of RGCs in p53 heterozygote ($p53^{+/-}$) and null ($p53^{-/-}$) mice subjected to optic nerve injury. RGCs were first labeled by application of the retrograde tracer Fluorogold

to the superior colliculus, followed by axotomy and quantification of neuronal survival. Figure 1E shows that 73% of RGCs survived in $p53^{-/-}$ retinas and 65% in $p53^{+/-}$ retinas, while only 50% remained in wild-type retinas at 1 week postlesion. The total density of RGCs in noninjured (intact) $p53^{+/+}$, $p53^{+/-}$, and $p53^{-/-}$ adult retinas was similar, indicating that p53 is not required for developmental programmed RGC death, consistent with previous findings (Li et al., 2002). These data demonstrate that optic nerve axotomy leads to activation of p53 in RGCs and that p53 plays a role in axotomy-induced RGC death in a dose-dependent manner.

ASPP1 and ASPP2 are expressed by adult RGCs

To characterize the role of ASPP1 and ASPP2 in RGC death, we first determined which retinal cells express them. Retinal immunohistochemistry showed abundant expression of endogenous ASPP1 and ASPP2 in the ganglion cell layer (GCL) (Fig. 2A,K) while other retinal layers were virtually devoid of ASPP1/2. Since displaced amacrine cells account for ~40% of the total number of neurons in the GCL (Perry, 1981), we performed colocalization studies where RGCs were retrogradely labeled with Fluorogold (Fig. 2B,L). All Fluorogold-labeled neurons displayed robust ASPP1 and ASPP2 immunoreactivity (Fig. 2C-F,M-P), indicating that adult RGCs are endowed with high levels of ASPP1/2 proteins. Colabeling with the nuclear marker DAPI demonstrated that ASPP1 had a nuclear and cytoplasmic (perinuclear) localization within RGCs (Fig. 2H-J), while ASPP2 was primarily found in RGC nuclei (Fig. 2R-T). ASPP1 and ASPP2 blocking peptides resulted in absence of staining (Fig. 2G,Q), confirming the specificity of the ASPP1 and ASPP2 antibodies.

Following axotomy, there were no detectable changes in the levels or subcellular localization of ASPP1, ASPP2, or the anti-apoptotic member iASPP visualized by retinal immunohistochemistry (Fig. 3A). Analysis of protein homogenates at 24 or 48 h (Figs. 3, 4) after axotomy confirmed that ASPP1, ASPP2, and iASPP levels were similar to those in intact, noninjured retinas (Fig. 3B,C). A time course analysis of ASPP proteins up to 5 d postaxotomy revealed no change in their levels with respect to control retinas (data not shown). Collectively, these data indicate that ASPP1 and ASPP2 are abundantly expressed by intact and axotomized RGCs.

Selective knockdown of retinal ASPP1 or ASPP2 by intravitreal siRNA delivery

To investigate the role of ASPP1/2 proteins in retinal neuron death, we synthesized siRNA sequences against ASPP1 or ASPP2. We first examined whether intraocular siRNA delivery led to effective uptake by adult RGCs using a Cy3-tagged control siRNA. Figure 4 shows that a single intravitreal injection of Cy3-siRNA resulted in robust Cy3 labeling in RGCs as early as 5 h after administration (Fig. 4A–F). The colocalization of Cy3 and Fluorogold confirmed that siRNA was rapidly taken up by RGCs after intravitreal delivery (Fig. 4G–I).

To assess the ability of siRNAs to knockdown retinal ASPP1 or ASPP2 protein expression *in vivo*, we performed Western blot analysis of retinal homogenates from eyes that received a single injection of each siRNA at the time of axotomy. Administration of siRNA against ASPP1 (siASPP1) led to a significant reduction of retinal ASPP1 protein at 24 h after delivery, while a control siRNA against GFP (siGFP) had no effect (Fig. 4J,K). Importantly,

siASPP1 did not reduce the protein levels of the other family members, ASPP2 or iASPP, confirming the specificity of the siRNA. Similarly, siRNA against ASPP2 (siASPP2) selectively depleted retinal ASPP2 protein levels without reducing ASPP1 or iASPP levels (Fig. 4L,M). Quantification of ASPP1 or ASPP2 protein levels at 24 h after treatment with siASPP2 or siASPP1, respectively, did not show a compensatory increase in these proteins (Fig. 4K,M, hatched bars). Endogenous levels of ASPP1 and ASPP2 proteins returned to basal at 48 h after siRNA delivery (Fig. 4J–M, black bars). Immunohistochemistry of axotomized retinas treated with siASPP1 or siASPP2 confirmed that siRNA-mediated knockdown of ASPP1/2 occurred in RGCs, visualized with Fluorogold (Fig. 4N,O). These data demonstrate that intravitreal delivery of siRNA results in rapid and effective uptake by RGCs, and that siRNAs against ASPP1 and ASPP2 promote transient depletion of ASPP proteins in these neurons.

ASPP1 and ASPP2 knockdown protects RGCs from axotomy-induced death

To determine whether ASPP1 and ASPP2 were required for axotomy-induced RGC death, we asked whether targeted siRNA-mediated knockdown promoted RGC survival. For this purpose, RGCs were retrogradely labeled before optic nerve transection and intravitreal injections of siRNA against ASPP1 or ASPP2 were performed concomitant with axotomy. Flat-mounted retinas from eyes treated with siASPP1 or siASPP2 consistently displayed higher densities of Fluorogold-labeled RGCs than those treated with control siGFP (Fig. 5A–D). Quantitative analysis demonstrated that ASPP1 or ASPP2 knockdown resulted in substantial RGC survival relative to vehicle-treated (PBS) or control siGFP-treated eyes (Fig. 5E), with siASPP2 promoting slightly more neuroprotection (79%; 1636 ± 62 RGCs/mm²) than siASPP1

(69%; 1430 ± 34 RGCs/mm²) at 1 week postinjury. All the siRNA sequences against ASPP1 or ASPP2 yielded similar results.

We also examined the effect of siASPP1 and siASPP2 on RGC survival at 2 weeks after axotomy, a time-point when few RGCs remain alive in the absence of treatment (Lebrun-Julien et al., 2009). Figure 5E shows that only 6% of RGCs survived in animals treated with vehicle or control siGFP (130 ± 7 RGCs/mm²), whereas 26% RGC survival was observed in animals that received siASPP1 or siASPP2 (542 ± 30 RGCs/mm² or 509 ± 24 RGCs/mm², respectively). The combination of siASPP1 and siASPP2 did not increase RGC survival further (Fig. 5E, black bars), suggesting that ASPP1 and ASPP2 activate redundant pathways to promote RGC death. We conclude that ASPP1 and ASPP2 are required for p53-dependent axotomy-induced death of RGCs in the adult retina.

siASPP2 protects axotomized RGCs through downregulation of the p53 proapoptotic targets PUMA and Fas/CD95

To investigate the mechanisms by which ASPP protein knockdown might lead to RGC neuroprotection after optic nerve injury, we examined changes in p53 proapoptotic targets at the mRNA and protein levels (Figs. 6, 7). We focused on siASPP2 because it confers enhanced neuroprotection over siASPP1. Real-time qPCR analysis of rat retinal samples at 6 h after axotomy and siASPP2 administration, a time-point when siRNA is already present in RGCs (Fig. 4A–I), revealed downregulation of ASPP2 and the p53 apoptotic targets PUMA, Fas/CD95, and Noxa compared with uninjured or control siRNA-treated retinas (Fig. 6A). There was no change in Bax expression levels. To further substantiate our findings, we

performed qPCR in retinal samples from p53-null mice and wild-type littermate controls collected at 6 h after axotomy with or without siASPP2 treatment. Overall, the transcript levels of PUMA, Fas/CD95, and Noxa were significantly reduced in noninjured or axotomized p53-null mice with respect to wild-type littermates, suggesting that these genes are transcriptionally regulated by p53 (Fig. 6B,C,E). More importantly, ASPP2 knockdown effectively reduced PUMA, Fas/CD95, and Noxa gene expression in axotomized retinas from p53 wild-type mice but not from p53 knock-out mice (Fig. 6B,C,E), while Bax remained unchanged (Fig. 6D). siASPP2 did not reduce PUMA and CD95 expression further relative to the already reduced levels found in p53-null mice. Collectively, these data demonstrate that siASPP2-mediated knockdown of PUMA, Fas/CD95, and Noxa depends on p53 transcriptional activity.

Western blot analysis of axotomized retinal samples at 24 h after siRNA administration showed that siASPP2 reduced PUMA and Fas/CD95 protein levels relative to control siGFP (Fig. 7A,B), while Bax and Noxa levels did not change with any of the treatments (Fig. 7C,D). These findings, supported by our observation that PUMA and Fas/CD95 are upregulated following axotomy (Fig. 1D), raised the possibility that they might play a role in the p53-dependent death of axotomized RGCs. To test this, we administered siRNAs against PUMA or Fas/CD95 at the time of axotomy and quantified retrogradely labeled RGCs at 1 week postinjury. siPUMA or siFas/CD95 effectively downregulated endogenous retinal PUMA or Fas/CD95, respectively (Fig. 7E,F). Importantly, a substantial increase in RGC survival was observed in retinas exposed to siPUMA (77%; 1597 ± 38 RGCs/mm², $n = 4$) or siFas/CD95 (69%; 1432 ± 71 RGCs/mm², $n = 4$) relative to siGFP-treated controls (Fig. 7H). Unlike PUMA or Fas/CD95, siASPP2-mediated decrease in Noxa transcript levels at 6 h after axotomy (Fig.

6) did not correlate with Noxa protein reduction at 24 h postinjury (Fig. 7D). Since this discrepancy might simply reflect a difference in the kinetics of Noxa mRNA and protein synthesis (Aikawa et al., 2010; Armstrong et al., 2010), we also used a siRNA against Noxa to assess its role on RGC survival at 1 week after axotomy. siNoxa effectively reduced endogenous Noxa protein levels (Fig. 7G), but did not result in significant RGC protection (Fig. 7H), suggesting that although Noxa is transcriptionally regulated by p53, it does not play a prominent role in RGC death. We conclude that ASPP2 knockdown protects RGCs via downregulation of the p53 targets PUMA and Fas/CD95, and that these molecules mediate axotomy-induced RGC apoptosis.

DISCUSSION

The present study explored the functional role of the p53 coactivators ASPP1 and ASPP2 in the regulation of injury-induced death of adult retinal neurons *in vivo*. Our data support four major conclusions. First, axotomy-induced RGC death is mediated *inter alia* through p53 activation in a gene dose-dependent manner. Second, ASPP1 and ASPP2 proteins are abundantly expressed by intact and injured RGCs. Third, selective siRNA-mediated knockdown of ASPP1 or ASPP2 leads to substantial RGC survival after axonal injury. Fourth, the neuroprotective effect of siASPP2 involves downregulation of the p53 apoptotic targets PUMA and Fas/CD95, and siRNAs against PUMA or Fas/CD95 effectively promote RGC survival. Our data support a novel, key role of proapoptotic ASPP family members in the regulation of retinal neuron death.

Axonal injury is a major cause of neuronal loss in the CNS of adult mammals and it is the primary damaging event in most optic neuropathies, including glaucoma. Using an axotomy model, we found that p53 phosphorylation and upregulation of the p53 proapoptotic targets PUMA and Fas/CD95 are markedly increased at 1 d after injury, a time that precedes the onset of RGC death. In adult rodents, RGCs survive for 5 d after axotomy and then die abruptly (Villegas-Pérez et al., 1993; Berkelaar et al., 1994); therefore, this finding suggests that early p53 activation plays a causal role in injury-induced RGC loss. In support of this, our data further demonstrate that p53 deficiency promotes RGC survival after axotomy in a gene dose-dependent manner. This is consistent with studies showing that inactivation of the p53 gene attenuates RGC death following ischemia, excitotoxicity, or optic nerve crush (Rosenbaum et al., 1998; Li et al., 2002; Park et al., 2008).

ASPP1 and ASPP2 are cofactors that enhance the proapoptotic function of p53, but not its ability to regulate cell cycle arrest (Samuels-Lev et al., 2001). ASPP proteins are known to interact directly with the p53 DNA-binding domain through their ankyrin and SH3 domains, readily increasing its transcriptional activity at proapoptotic gene promoters (Gorina and Pavletich, 1996; Patel et al., 2008). We demonstrate that RGCs express high endogenous levels of ASPP1 and ASPP2 that do not change after axotomy, supporting the hypothesis that these neurons become vulnerable to injury-induced activation of p53. It is unlikely that the function of ASPP1 and ASPP2 changes after injury, but rather that they are poised to act as cofactors to facilitate rapid p53-mediated transcriptional activation of PUMA and Fas/CD95 following axotomy. This is consistent with previous studies showing that other p53 cofactors, such as Brn-3b and SP1, can effectively modulate p53 activity without undergoing stress-induced changes in function or expression levels (Budhram-Mahadeo et al., 2006; Dhar et al., 2006; Chatoo et al., 2011).

To address the functional role of ASPP1/2, we used a siRNA-based approach to knockdown ASPP1/2 gene expression *in vivo*. siRNA has been successfully delivered to RGCs via injection into the optic nerve or the superior colliculus (Lingor et al., 2005; Koeberle et al., 2010), but the invasive nature of these approaches greatly limits their application. We chose to deliver siRNA molecules by intravitreal injections, which led to effective siRNA uptake by RGCs, as previously demonstrated by us (Ahmed et al., 2011). We cannot rule out that other retinal cells also incorporated siRNA injected into the vitreous chamber; however, we show that this strategy is suitable for silencing genes that are highly enriched in RGCs. Our results show that targeted siRNA successfully downregulated retinal ASPP1 and ASPP2 by ~85–90%

at 24 h after intravitreal delivery, but this effect was transient since protein levels were restored by 48 h. Despite this short-lived effect, our data demonstrate a strong neuroprotective effect of siASPP1/2, suggesting that there is a window of opportunity soon after axotomy in which ASPP1/2 knockdown counters the proapoptotic effect of p53. This is supported by our observation that the levels of phospho-p53, PUMA, and Fas/CD95, which are upregulated at 24 h after axotomy, drop to basal levels at 7 d postinjury. Therefore, siASPP1/2 treatment to knockdown proapoptotic p53 targets during this critical period effectively attenuates RGC loss.

To identify the mechanism by which ASPP1/2 silencing delayed RGC death, we examined mRNA and protein levels of p53 proapoptotic targets. Comparative gene expression analysis revealed a substantial downregulation of PUMA, Fas/CD95, and Noxa in axotomized rat retinas derived from eyes treated with siASPP2 but not with control siRNA. Importantly, ASPP2 knockdown effectively reduced PUMA, Fas/CD95, and Noxa expression in axotomized retinas from p53 wild-type but not from p53-null mice, demonstrating that downregulation of these apoptotic genes depends on p53 transcriptional activity. At the protein level, siASPP2 substantially reduced retinal PUMA and Fas/CD95 proteins, while Noxa remained unchanged. Consistent with this, our data show that while targeted siRNA against Noxa failed to promote significant neuroprotection, siRNAs against PUMA or Fas/CD95 knockdown led to robust RGC survival, indicating that these molecules play a functional role in axotomy-induced RGC death. PUMA is a BH3-only protein and a potent inducer of cell death, but so far there have been no reports of its role on RGC death. The proapoptotic activity of PUMA requires its interaction with anti-apoptotic Bcl-2 family members, localization to the mitochondria, and induction of cytochrome *c* release leading to caspase activation and cell death (Nakano and

Vousden, 2001). Biochemical studies suggest that PUMA regulates mitochondrial outer membrane permeabilization by binding to anti-apoptotic Bcl-2 proteins, which results in de-repression and activation of Bax or Bak (Chipuk and Green, 2009). Although we did not detect changes in Bax mRNA or protein levels in the presence of siASPP2, we cannot entirely rule out a decrease in Bax activity following PUMA downregulation. PUMA can release cytosolic p53 from its inactive complex with Bcl-XL to form a PUMA-Bcl-XL complex, allowing p53 to activate Bax (Chipuk et al., 2005). Therefore, a decrease in PUMA levels could potentially reduce Bax activity by reducing its release from Bcl-XL.

Our data also demonstrate that ASPP2 knockdown leads to downregulation of Fas/CD95 and that siRNA-mediated Fas/CD95 silencing was neuroprotective. Fas/CD95 is a death receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily of single-pass transmembrane proteins (Ashkenazi, 2002; Peter et al., 2007). Fas/CD95 is activated by Fas ligand (FasL) leading to the recruitment of the adaptor protein FADD (Fas-associated death domain) and activation of caspase 8 (Haase et al., 2008). Analysis of p53 responsive elements in the CD95 gene revealed a role for p53 in Fas/CD95 transcription (Schilling et al., 2009). Furthermore, nuclear ASPP1 can activate p53-induced Fas/CD95 expression (Aylon et al., 2010). FasL has been shown to increase in retinal microglia in a rat model of ocular hypertension (Ju et al., 2006) and FasL-positive autoreactive T cells have been implicated in the loss of RGCs following heat shock protein immunization (Wax et al., 2008). More recently, the membrane-bound form of FasL was implicated in glaucomatous RGC degeneration (Gregory et al., 2011). Collectively, these studies support a role for Fas/CD95 in RGC death. Our data, specifically,

demonstrate that Fas/CD95 contributes to ASPP1/2-p53 proapoptotic signaling and that Fas/CD95 downregulation promotes marked RGC protection after axonal injury.

Recent studies have unveiled a novel and unexpected role for p53 in the promotion of neurite outgrowth and axonal regeneration that is independent of its proapoptotic function (Di Giovanni and Rathore, 2012). Indeed, p53 gene silencing or dominant-negative forms of p53 have been shown to inhibit neurotrophin-dependent outgrowth *in vitro* and axonal regeneration *in vivo* (Di Giovanni et al., 2006; Zhang et al., 2006; Tedeschi et al., 2009b). Of interest, p53 acetylation at specific lysine residues is thought to be required for the p53 growth-promoting effects (Tedeschi et al., 2009a; Gaub et al., 2010). More recently, viral-mediated overexpression of the histone acetyltransferase p300 in RGCs increased axonal regeneration within the injured optic nerve (Gaub et al., 2011). We have previously demonstrated that signaling pathways that lead to RGC survival may differ from those that promote RGC axon regeneration (Pernet and Di Polo, 2006). Therefore, although our current data demonstrate a proapoptotic role of p53, we cannot rule out the possibility that p53 might enhance RGC axon growth through activation of different signaling pathways. In this context, it should be of interest to assess the role of ASPP1/2 on axonal regeneration following optic nerve injury.

In conclusion, we used a loss-of-function approach to identify the role of the p53 activators ASPP1 and ASPP2 in retinal neuron death following optic nerve axotomy. Our data demonstrate a novel and prominent role of the proapoptotic ASPP1/2 proteins in the death of RGCs that involves the p53 targets PUMA and Fas/CD95. These findings expand our understanding of the molecular basis of RGC neurodegeneration and might have implications for the design of strategies for neuroprotection in the injured CNS.

REFERENCES

- Agirre X, Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Garate L, Montiel-Duarte C, Navarro G, Vazquez I, Zalacain M, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Minna JD, Prosper F (ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 25:1862-1870.2005).
- Ahmed Z, Kalinski H, Berry M, Almasieh M, Ashush H, Slager N, Brafman A, Spivak I, Neeha Prasad N, Mett I, Shalom E, Alpert E, Di Polo A, Feinstein E, Logan A (Ocular Neuroprotection by siRNA Targeting Caspase-2. *Cell Death Dis* In press.2011).
- Aikawa T, Shinzawa K, Tanaka N, Tsujimoto Y (Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death. *FEBS Letts* 584:681-688.2010).
- Amano T, Nakamizo A, Mishra S, Gumin J, Shinojima N, Sawaya R, Lang F (Simultaneous phosphorylation of p53 at serine 15 and 20 induces apoptosis in human glioma cells by increasing expression of pro-apoptotic genes. *J Neurooncol* 92:357-371.2009).
- Ao Y, Rohde LH, Naumovski L (p53-interacting protein 53BP2 inhibits clonogenic survival and sensitizes cells to doxorubicin but not paclitaxel-induced apoptosis. *Oncogene* 20:2720-2725.2001).
- Armstrong JL, Flockhart R, Veal GJ, Lovat PE, Redfern CPF (Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumour cells. *J Biol Chem* 285:6091-6100.2010).
- Ashkenazi A (Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2:420-430.2002).
- Aylon Y, Ofir-Rosenfeld Y, Yabuta N, Lapi E, Nojima H, Lu X, Oren M (The Lats2 tumour suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1. *Gene Dev* 24:2420-2429.2010).
- Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK, O'Connor DJ, Zhong S, Campargue I, Tomlinson ML, Kuwabara PE, Lu X (iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 33:162-167.2003).
- Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X (iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet*

- 38:1133-1141.2006).
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ (Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14:4368-4374.1994).
- Boehme KA, Blattner C (Regulation of p53 - insights into a complex process. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44:367-392.2009).
- Budhram-Mahadeo VS, Bowen S, Lee S, Perez-Sanchez C, Ensor E, Morris PJ, Latchman DS (Brn-3b enhances the pro-apoptotic effects of p53 but not its induction of cell cycle arrest by cooperating in trans-activation of bax expression. *Nucl Acids Res* 34:6640-6652.2006).
- Chang J, Ghafouri M, Mukerjee R, Bagashev A, Chabrashvili T, Sawaya B (Role of p53 in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis* 9:68-80.2012).
- Chatoo W, Abdouh M, Bernier G (p53 pro-oxidant activity in the central nervous system: implication in aging and neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal* 15:1729-1737.2011).
- Chatoo W, Abdouh M, David J, Champagne M-P, Ferreira J, Rodier F, Bernier G (The Polycomb Group Gene Bmi1 Regulates Antioxidant Defenses in Neurons by Repressing p53 Pro-Oxidant Activity. *J Neurosci* 29:529-542.2009).
- Cheng L, Sapielha P, Kittlerová P, Hauswirth WW, Di Polo A (TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci* 22:3977-3986.2002).
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR (PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of p53. *Science* 309:1732-1735.2005).
- Chipuk JE, Green DR (PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle* 8:2692-2696.2009).
- Culmsee C, Mattson MP (p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 331:761-777.2005).
- Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J (Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31:2705-2716.2003).

- Dhar SK, Xu Y, Chen Y, Clair DKS (Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression. *J Biol Chem* 281:21698-21709.2006).
- Di Giovanni S, Knights CD, Rao M, Yakovlev A, Beers J, Catania J, Avantiaggiati ML, Faden AI (The tumour suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration. *EMBO J* 25:4084-4096.2006).
- Di Giovanni S, Rathore K (p53-dependent pathways in neurite outgrowth and axonal regeneration. *Cell Tissue Res* 349:87-95.2012).
- Dumaz N, Meek DW (Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* 18:7002-7010.1999).
- Gaub P, Joshi Y, Wuttke A, Naumann U, Schnichels S, Heiduschka P, Di Giovanni S (The histone acetyltransferase p300 promotes intrinsic axonal regeneration. *Brain* 134:2134-2148.2011).
- Gaub P, Tedeschi A, Puttagunta R, Nguyen T, Schmandke A, Di Giovanni S (HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell Death Differ* 17:1392-1408.2010).
- Gorina S, Pavletich N (Structure of the p53 tumour suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. . *Science* 274:1001–1005.1996).
- Gregory MS, Hackett CG, Abernathy EF, Lee KS, Saff RR, Hohlbaum AM, Moody K-sL, Hobson MW, Jones A, Kolovou P, Karray S, Giani A, John SWM, Chen DF, Marshak-Rothstein A, Ksander BR (Opposing Roles for Membrane Bound and Soluble Fas Ligand in Glaucoma-Associated Retinal Ganglion Cell Death. *PLoS ONE* 6:e17659.2011).
- Haase G, Pettmann B, Raoul C, Henderson CE (Signaling by death receptors in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 18:284-291.2008).
- Hamar P, Song E, Kokeny G, Chen A, Ouyang N, Lieberman J (Small interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14883-14888.2004).
- Iwabuchi K, Bartel P, Li B, Marraccino R, Fields S (Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6098–6102.1994)
- Ju KR, Kim HS, Kim JH, Lee NY, Park CK (Retinal glial cell responses and Fas/FasL

- activation in rats with chronic ocular hypertension. *Brain Res* 1122:209-221.2006).
- Koeberle PD, Wang Y, Schlichter LC (Kv1.1 and Kv1.3 channels contribute to the degeneration of retinal ganglion cells after optic nerve transection *in vivo*. *Cell Death Differ* 17:134-144.2009).
- Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A (Inhibition of p75NTR in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 40:410-420.2009).
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.2000).
- Li Y, Schlamp C, Poulsen G, Jackson M, Griep A, Nickells R (p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate. *Mol Vis* 8:341-350.2002).
- Lingor P, Koeberle P, Kugler S, Bahr M (Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death *in vivo*. *Brain* 128:550-558.2005).
- Liu ZJ, Lu X, Zhang Y, Zhong S, Gu SZ, Zhang XB, Yang X, Xin HM (Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53. *FEBS Lett* 579:1587-1590.2005).
- Liu ZJ, Zhang Y, Zhang XB, Yang X (Abnormal mRNA expression of ASPP members in leukemia cell lines. *Leukemia* 18:880-880.2004).
- Lopez CD, Ao Y, Rohde LH, Perez TD, O'Connor DJ, Lu X, Ford JM, Naumovski L (Proapoptotic p53-Interacting Protein 53BP2 Is Induced by UV Irradiation but Suppressed by p53. *Mol Cell Biol* 20:8018-8025.2000).
- Lossos IS, Natkunam Y, Levy R, Lopez CD (Apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP2) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 43:2309-2317.2002).
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ (Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1632-1636.1994).
- Nagase T, Ishikawa K-i, Suyama M, Kikuno R, Hirosawa M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O (Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XII. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins *in vitro*. *DNA Res* 5:355-364.1998).

- Nakano K, Vousden KH (PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694.2001).
- O'Connor JWD, O'Brien CJ, Cotter TG (A novel antioxidant function for the tumour-suppressor gene p53 in the retinal ganglion cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4237-4244.2008).
- Park K, Liu K, Hu Y, Smith P, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z (Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322:963-966.2008).
- Patel S, George R, Autore F, Fraternali F, Ladbury JE, Nikolova PV (Molecular interactions of ASPP1 and ASPP2 with the p53 protein family and the apoptotic promoters PUMA and Bax. *Nucleic Acids Res* 36:5139-5151.2008).
- Pernet V, Di Polo A (Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo. *Brain* 129:1014-1026.2006).
- Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A (Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J Neurochem* 93:72-83.2005).
- Perry VH (Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neurosci* 6:931-944.1981).
- Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber A-O, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrot RH, Zörnig M, Lynch DH (The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. *Cell* 129:447-450.2007).
- Rosenbaum D, Rosenbaum P, Gupta H, Singh M, Aggarwal A, Hall D, Roth S, Kessler J (The role of the p53 protein in the selective vulnerability of the inner retina to transient ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2132-2139.1998).
- Samuels-Lev YOCD, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X. (ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8:781-794.2001).
- Samuels Lev Y, O'Connor D, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh J, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X (ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8:781-794.2001).
- Schilling T, Schleithoff ES, Kairat A, Melino G, Stremmel W, Oren M, Krammer PH, Müller

- M (Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. *Biochem Biophys Res Commun* 387:399-404.2009).
- Slee EA, O'Connor DJ, Lu X (To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23:2809-2818.2004).
- Soussi T (The p53 tumour suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann Ny Acad Sci* 910:121-137.2000).
- Tedeschi A, Nguyen T, Puttagunta R, Gaub P, Di Giovanni S (A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration. *Cell Death Differ* 16:543-554.2008).
- Tedeschi A, Nguyen T, Steele SU, Feil S, Naumann U, Feil R, Di Giovanni S (The tumour suppressor p53 transcriptionally regulates cGKI expression during neuronal maturation and is required for cGMP-dependent growth cone collapse. *J Neurosci* 29:15155-15160.2009).
- Unger T, Sionov RV, Moallem E, Yee CL, Howley PM, Oren M, Haupt Y (Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. *Oncogene* 18:3205-3212.1999).
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ (Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24:23-36.1993).
- Vives V, Su J, Zhong S, Ratnayaka I, Slee E, Goldin R, Lu X (ASPP2 is a haploinsufficient tumour suppressor that cooperates with p53 to suppress tumour growth. *Genes & Dev* 20:1262-1267.2006).
- Wade M, Wang Y, Wahl G (The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol* 20:299-309.2010).
- Wax MB, Tezel G, Yang J, Peng G, Patil RV, Agarwal N, Sappington RM, Calkins DJ (Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived Fas-ligand. *J Neurosci* 28:12085-12096.2008).
- Yang J-P, Hori, M., Sanda, T. & Okamoto, T. (Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kappaB, RelA-associated inhibitor. *J Biol Chem* 274:15662–15670.1999).
- Zhang J, Yan W, Chen X (p53 is required for nerve growth factor-mediated differentiation of PC12 cells via regulation of TrkA levels. *Cell Death Differ* 13:2118-2128.2006).

Figure 1. Axotomized RGCs die in a p53-dependent manner.

(A) RT-PCR analysis revealed that p53 mRNA levels do not change at 1 day or 3 days shown here) after axotomy with respect to non-injured retinas (Student's t test, $p > 0.05$). (B) In contrast, a significant increase in axotomy-induced phosphorylation of p53 at serine 15 (S15) was readily detected at 1 day after axotomy, but returned to basal levels at 7 days post-lesion (ANOVA, $*=p < 0.05$). (C) Retinal immunostaining of Fluorogold-labeled RGCs confirmed that p53 phosphorylation (activation) was detected in these neurons at 1 day after axotomy. Scale: 10 μm . (D) Protein levels of the p53 apoptotic targets PUMA and Fas/CD95 increased at 1 day after axotomy, but returned to normal levels at 7 days post-injury. Bax and Noxa remained unchanged. (E) Analysis of RGC loss quantified at 1 week after axotomy in p53 null, heterozygote and wild-type retinas demonstrated an allelic dose dependency on p53 (ANOVA, $***=p < 0.001$). Data are expressed as RGC densities (RGCs/mm²; mean \pm S.D.).

Figure 2. ASPP1 and ASPP2 are expressed by adult RGCs.

Retinal immunofluorescence demonstrated abundant expression of endogenous ASPP1 (A-G) and ASPP2 (K-Q) in RGCs visualized with the retrograde tracer Fluorogold. DAPI staining showed that ASPP1 is present in RGC nuclei and cytoplasm (perinuclear) (H-J), while ASPP2 is primarily in the nuclei (R-T). ASPP1 and ASPP2 blocking peptides resulted in absence of staining (G, Q) confirming the specificity of the ASPP1 and ASPP2 antibodies. Scale bars: (A-C) and (K-M) = 70 μm ; (D-G) and (N-Q) = 50 μm ; (H-J) and (R-T) = 10 μm . RPE: Retinal Pigment Epithelium; PS: Photoreceptor Segments; ONL: Outer Nuclear Layer; OPL: Outer Plexiform Layer; INL: Inner Nuclear Layer; IPL: Inner Plexiform Layer; GCL: Ganglion Cell Layer.

Figure 3. Expression of ASPP family members after optic nerve axotomy.

(A) The levels or sub-cellular localization of ASPP1, ASPP2 or the anti-apoptotic member iASPP, visualized by retinal immunohistochemistry and Fluorogold (FG) staining, did not change at 48 hrs after optic nerve injury. Scale bar: 10 μ m. (B) Analysis of protein homogenates confirmed that ASPP1, ASPP2 and iASPP levels in axotomized retinas collected at 48 hrs were similar to those in intact, non-injured retinas. The lower panel represents the same blot as in the upper panel but probed with an antibody that recognizes β -actin used to confirm equal protein loading. (C) Densitometric analysis of western blots, showing the ratio of ASPP proteins relative to β -actin, confirmed that there is no significant change in protein expression after injury (Student's t test, $p > 0.05$).

Figure 4. Selective knockdown of retinal ASPP1 or ASPP2 by intravitreal siRNA Delivery.

Intravitreal delivery of Cy3-tagged siRNA resulted in rapid and effective uptake by RGCs. Lack of Cy3 fluorescence in non-injected control retinas (A-C) contrasted with robust Cy3 labeling in RGCs, visualized with Fluorogold (FG) (D-I), as early as 5 hrs after siRNA administration. (J-M) Intravitreal delivery of siRNA against ASPP1 (siASPP1) led to a significant reduction of retinal ASPP1 protein at 24 hrs after delivery while control siRNA against GFP (siGFP) had no effect (ANOVA, $*=p<0.05$). siASPP1 did not decrease or increase the protein levels of the other family members, ASPP2 or iASPP, confirming the specificity of the siRNA. Similarly, siRNA against ASPP2 (siASPP2) selectively depleted retinal ASPP2 protein levels (ANOVA, $*=p<0.05$) without altering ASPP1 or iASPP levels. Endogenous levels of both ASPP1 and ASPP2 proteins returned to basal at 48 hrs after siRNA delivery. Immunohistochemistry of axotomized retinas at 24 hrs after siASPP1 or siASPP2 administration confirmed that siRNA-mediated knockdown of ASPP1/2 occurred in RGCs, visualized with Fluorogold (N, O). Scale bars: (A-F) = 50 μm ; (G-I) = 10 μm ; (N-O) = 12 μm . PS: Photoreceptor Segments; ONL: Outer Nuclear Layer; OPL: Outer Plexiform Layer; INL: Inner Nuclear Layer; IPL: Inner Plexiform Layer; GCL: Ganglion Cell Layer.

Figure 5

ASPP1 and ASPP2 knockdown protects RGCs from axotomy-induced death.

Fluorogold-labeled RGCs in flat-mounted retinas from a representative noninjured eye (A) or axotomized eyes treated with siASPP1 (B), siASPP2 (C), or control siGFP (D) at 1 week postinjury. Scale bars, 100 μ m. E, Quantitative analysis of RGC survival following intraocular injection of siASPP1 (hatched), siASPP2 (dark gray), combined siASPP1 and siASPP2 (black), control siGFP (light gray) or PBS (white) (ANOVA, *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$). The density of RGCs in intact, uninjured Sprague Dawley rat retinas is shown as reference (open bar). Data are expressed as the mean \pm SEM.

Figure 6

siASPP2-mediated knockdown of PUMA, Fas, and Noxa depends on p53 transcriptional activity. A, Real-time qPCR analysis of rat retinal samples at 6 h after axotomy and siASPP2 administration revealed that ASPP2 knockdown leads to down- B–E, qPCR of retinal samples from p53-null mice and wild-type littermate controls collected at 6 h after axotomy and siASPP2 injection. Transcript levels of PUMA, Fas/CD95, and Noxa were significantly reduced in noninjured or axotomized p53-null mice with respect to wild-type littermates. Moreover, ASPP2 knockdown effectively reduced PUMA, Fas/CD95, and Noxa gene expression in axotomized retinas from p53 wild-type mice, but not from p53 knock-out mice (B,C,E) (ANOVA, *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$). Bax gene expression remained unchanged (D).

Figure 7

siASPP2 protects RGCs through downregulation of the p53 proapoptotic targets PUMA and Fas/CD95. Western blot analysis of axotomized and injected retinal samples at 24 h after siRNA administration shows that PUMA and Fas/CD95 protein levels are downregulated compared with control siGFP (A,B; Student's t test, $*p < 0.05$), whereas Bax and Noxa remained unchanged (C,D; Student's t test, $p > 0.05$). Western blot analysis of axotomized and injected retinal samples at 24 h shows that siFas/CD95, siPUMA, and siNoxa downregulated endogenous retinal Fas/CD95 (E), PUMA (F), and Noxa (G) protein levels, respectively, compared with control siGFP (Student's t test, $*p < 0.05$). H, A significant increase in RGC survival was observed in retinas exposed to siPUMA (black) or siFas/CD95 (dark gray) with respect to siGFP-treated (light gray) or PBS-treated (white) controls (ANOVA, $**p < 0.01$; $*p < 0.05$). Administration of siNoxa (horizontal lines) did not result in significant RGC survival (ANOVA, $p > 0.05$). The density of RGCs in intact, uninjured Sprague Dawley rat retinas is shown as reference (open bar). Data are expressed as the mean SEM.

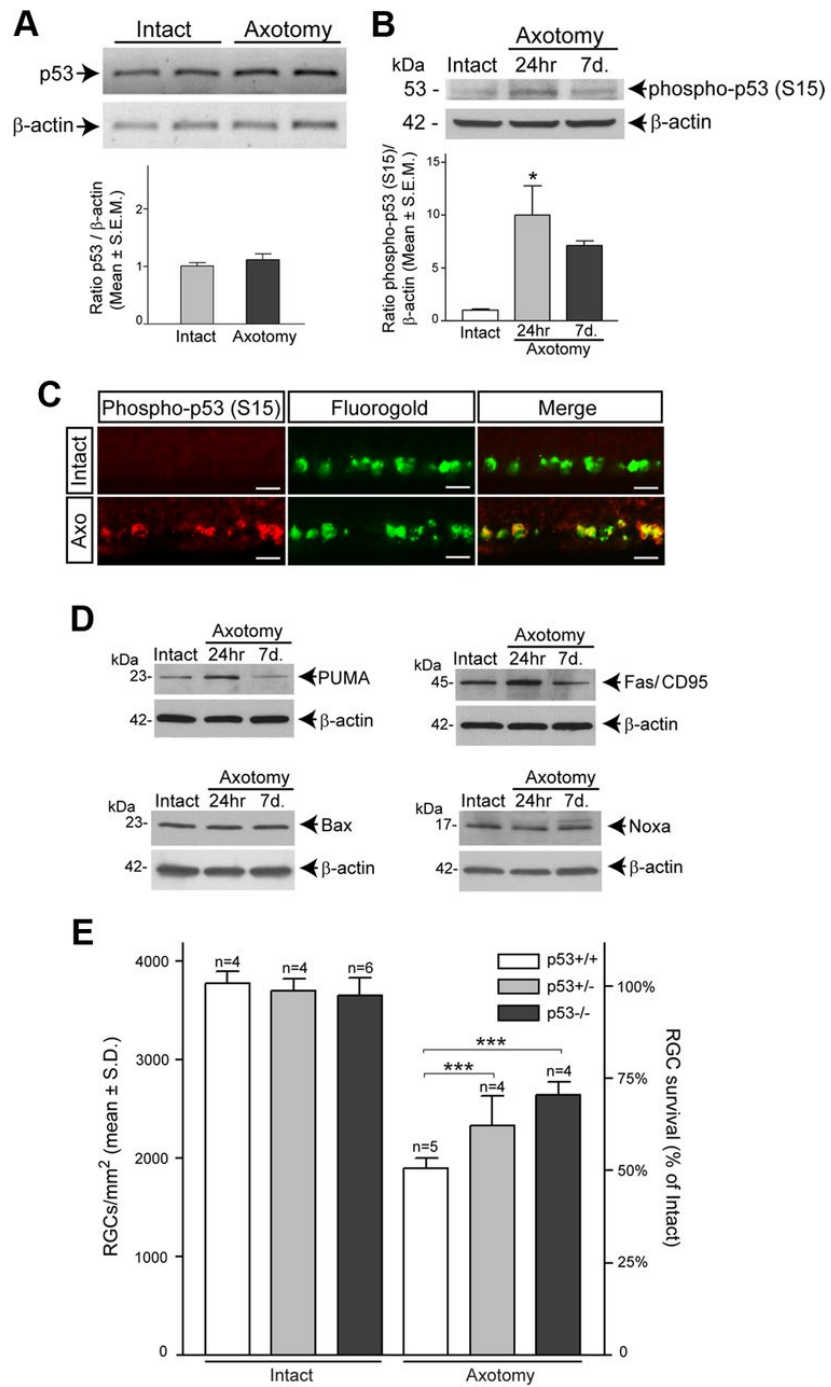


FIGURE 1

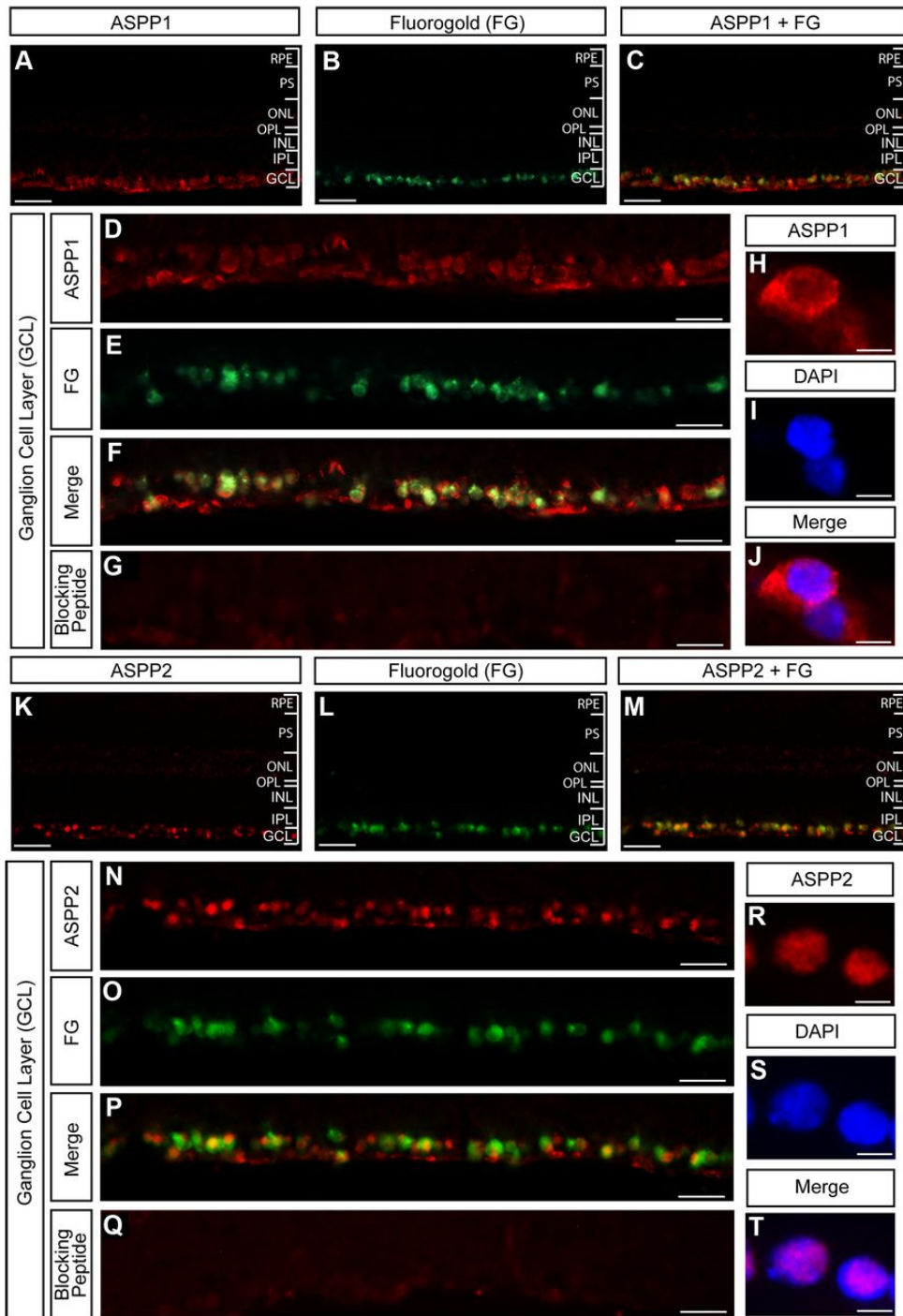


FIGURE 2

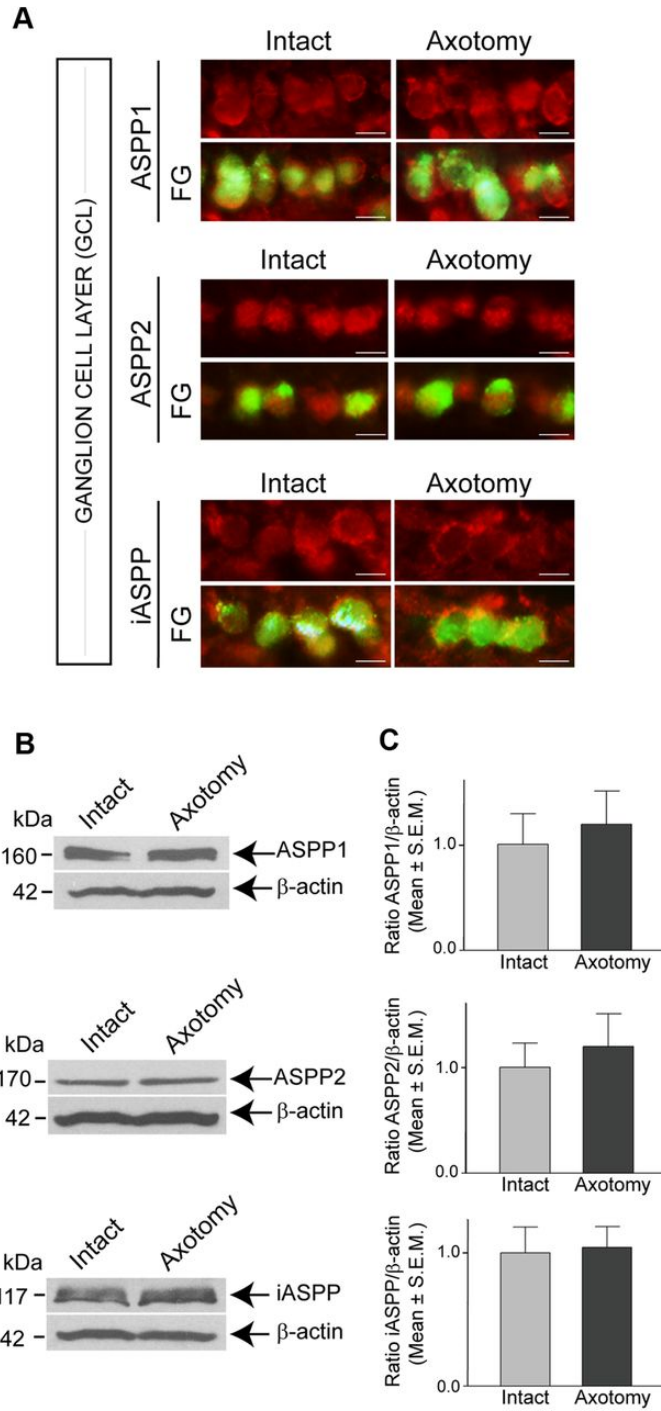


FIGURE 3

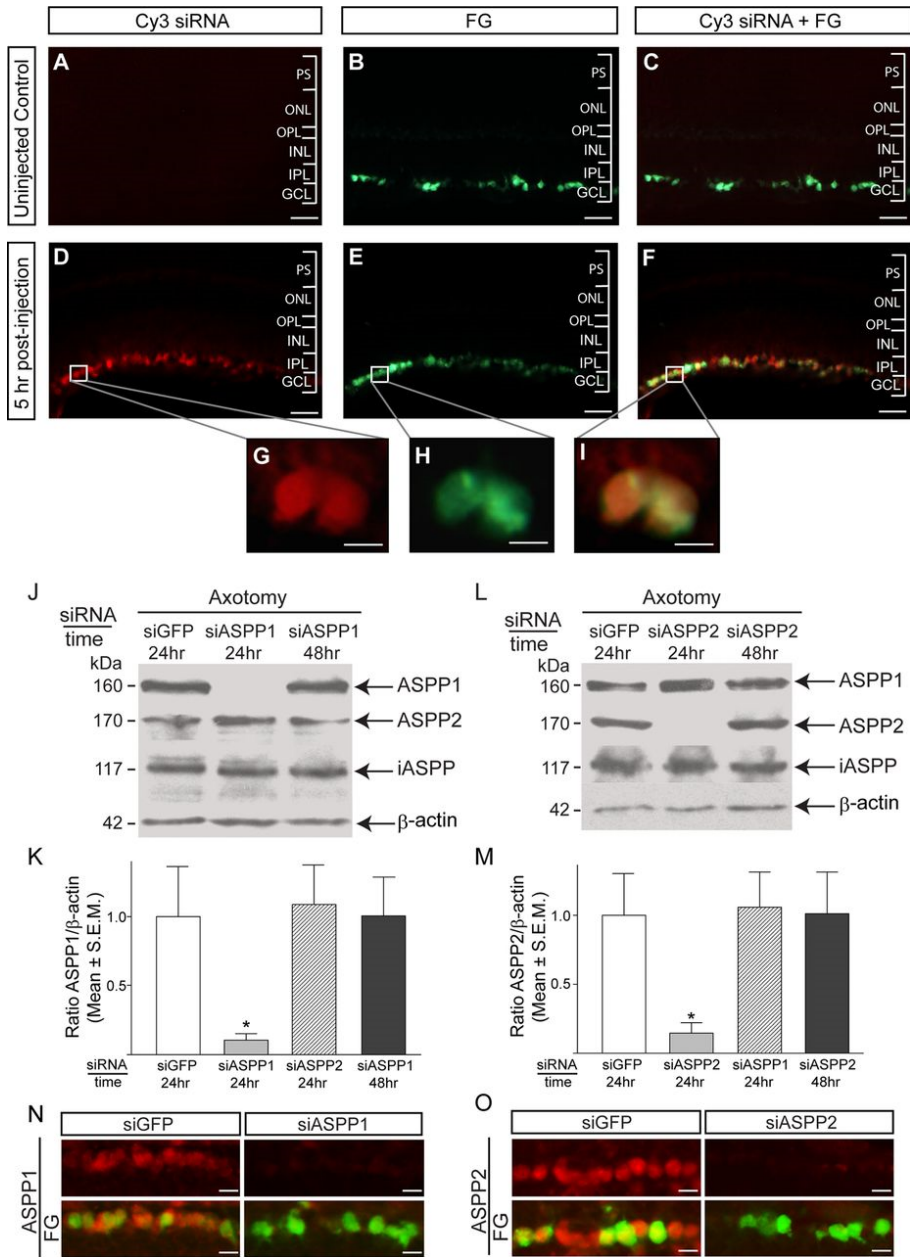


FIGURE 4

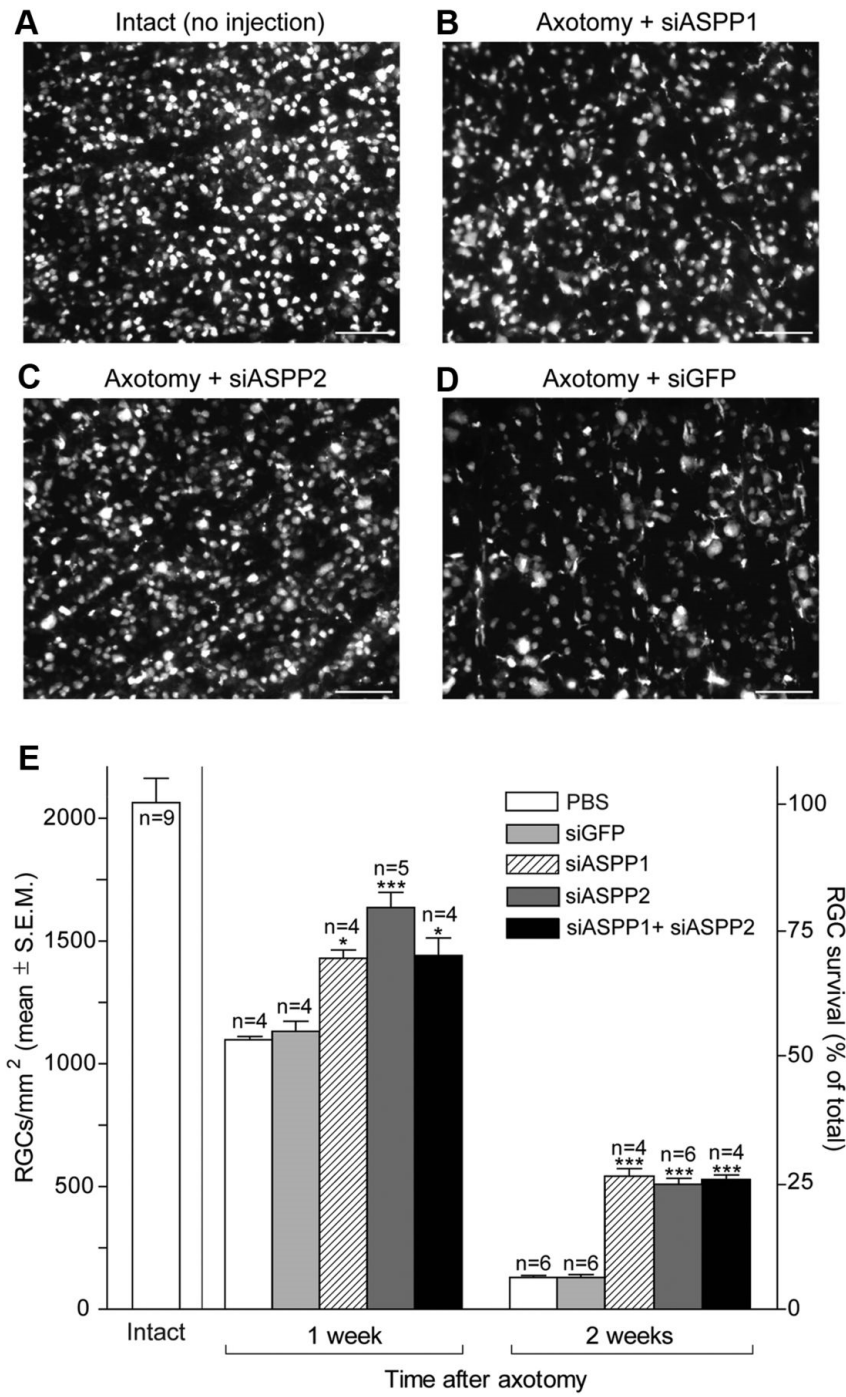


FIGURE 5

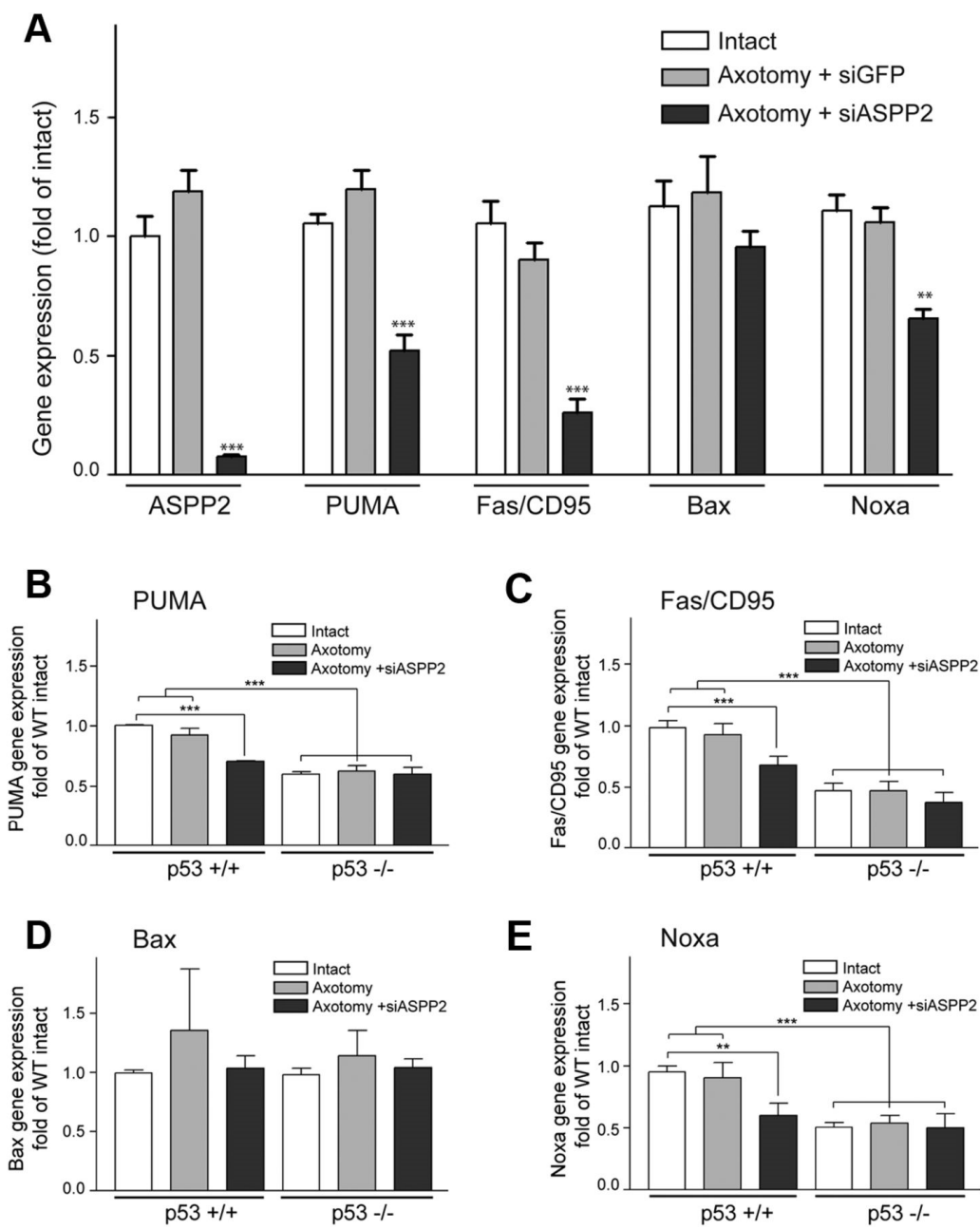


FIGURE 6

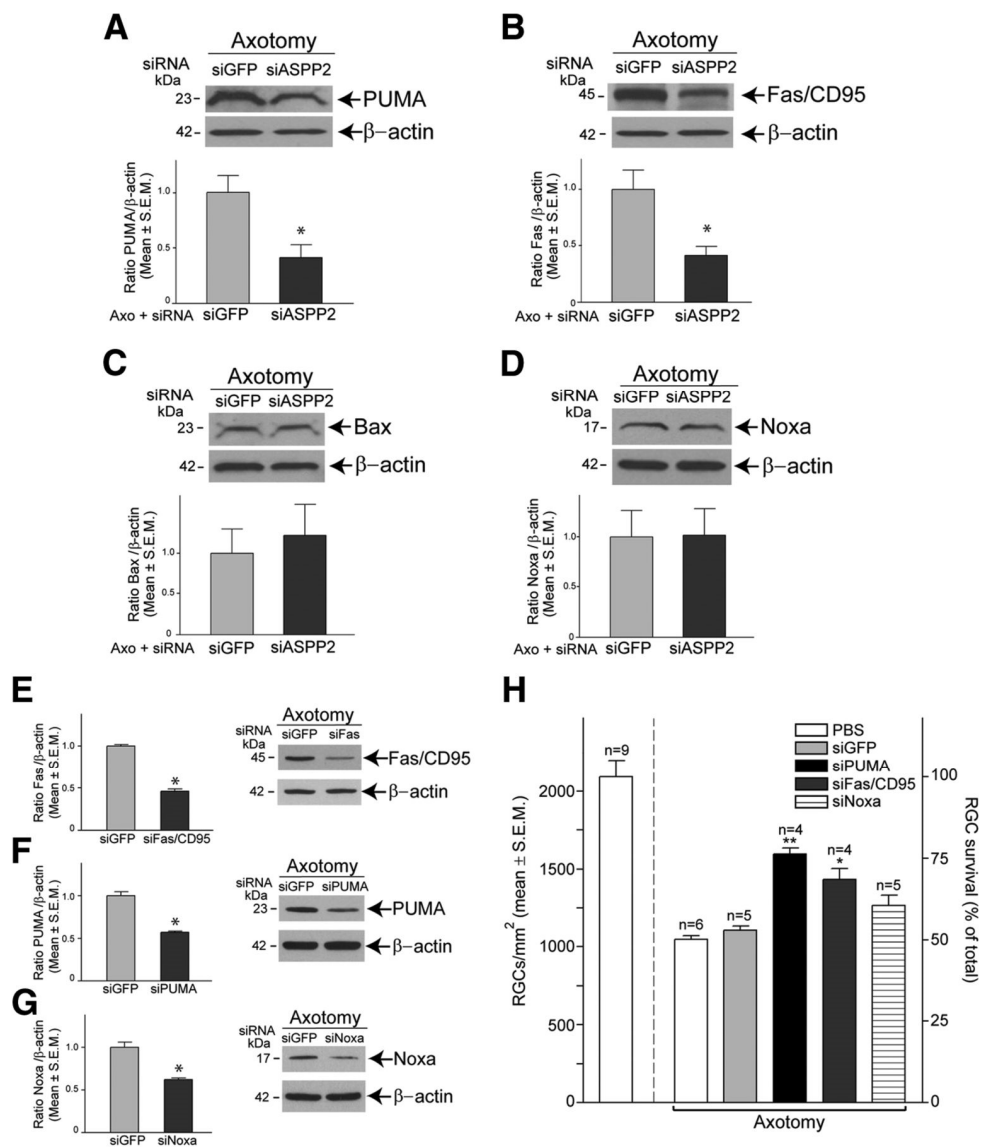


FIGURE 7

ANNEXE D : COLLABORATION

INHIBITION OF P75 IN GLIA POTENTIATES TRKA-MEDIATED SURVIVAL OF INJURED RETINAL GANGLION CELLS

Molecular and Cellular Neuroscience (2009) 40(4):410-20

(Deuxième auteur)

**INHIBITION OF P75NTR IN GLIA POTENTIATES TRKA-MEDIATED SURVIVAL
OF INJURED RETINAL GANGLION CELLS**

**Frédéric Lebrun-Julien¹, Barbara Morquette¹, Annie Douillette¹, H. Uri Saragovi²,
Adriana Di Polo¹**

¹Department of Pathology and Cell Biology and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC), Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4; and ²Lady Davis Institute-Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, H3T 1E2.

Corresponding Author: Adriana Di Polo, Ph. D.
Department of Pathology and Cell Biology
Université de Montréal
2900, Boulevard Edouard-Montpetit
Pavillon Roger-Gaudry, Room S-520
Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada
Phone: (514) 343-6109
Fax: (514) 343-5755

ABSTRACT

Little is known about the molecular mechanisms that limit the ability of retinal neurons to respond to neurotrophic factor stimulation following axonal injury. In the adult retina, nerve growth factor (NGF) binds to TrkA (expressed by neurons) and p75NTR (expressed by Müller glia), but fails to promote the survival of axotomized retinal ganglion cells (RGCs). We addressed the functional role of TrkA and p75NTR in this lack of survival by using peptidomimetic agonistic or antagonistic ligands specific for each receptor. While administration of exogenous NGF failed to rescue axotomized RGCs, administration of selective TrkA agonists led to robust neuroprotection. Surprisingly, we found a remarkable survival of axotomized RGCs following pharmacological inhibition of p75NTR or in p75NTR knockout mice. Combination of NGF or TrkA agonists with p75NTR antagonists further potentiated RGC neuroprotection in vivo, an effect that was greater than each treatment alone. NGF can therefore be neuroprotective when acting on neuronal TrkA receptors but engagement of p75NTR on glial cells antagonizes this effect. Our data reveal a novel mechanism by which p75NTR expressed on retinal glia can profoundly influence neuronal survival.

Keywords: Retinal ganglion cells; Nerve growth factor; TrkA; p75NTR; Peptidomimetic ligands; Neuronal survival; Knockout.

INTRODUCTION

The neurotrophins exert a potent survival effect on adult central neurons undergoing degeneration induced by a broad variety of insults. The neurotrophin family consists of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) and neurotrophin 4/5 (NT-4/5). Their biological effects are mediated by two classes of cell surface receptors: i) the tropomyosin related kinase (Trk) family of receptor tyrosine kinases comprising TrkA, the receptor for NGF; TrkB, the receptor for BDNF and NT-4/5; and TrkC, the receptor for NT-3; and ii) the p75 receptor (p75NTR) which binds all neurotrophins with similar affinity (Huang and Reichardt, 2003; Teng and Hempstead, 2004).

It is now well established that upon binding to Trk receptors, mature neurotrophins stimulate multiple signaling pathways including the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2) and the phosphatidylinositol 3/Akt kinase pathways, which promote neuronal survival (Cui, 2006; Reichardt, 2006). In contrast, the role of p75NTR has been considerably more enigmatic partly because p75NTR lacks kinase activity, hence does not signal via conventional pathways, and can interact with several co-receptors (Barker, 2004; Roux and Barker, 2002). While p75NTR can enhance binding of Trk receptors to their preferred ligands, it can also mediate neuronal apoptosis in response to neurotrophins and proneurotrophins (Frade et al., 1996; Hempstead, 2006; Nykjaer et al., 2004).

The mammalian retinocollicular system is an excellent model to characterize the biological activity of neurotrophins *in vivo*. Among neurotrophins, BDNF is the best characterized and the most potent survival factor for injured retinal ganglion cells (RGCs) (Chen and Weber, 2001; Di Polo et al., 1998; Klöcker et al., 2000; Mansour-Robaey et al.,

1994; Mey and Thanos, 1993; Peinado-Ramon et al., 1996). In contrast, NGF has received less attention because several studies showed that this neurotrophin fails to promote RGC survival both in vitro and in vivo (Bosco and Linden, 1999; Cohen et al., 1994; Cui and Harvey, 1995; Johnson et al., 1986; Shi, 2007). This is surprising as RGCs have been shown to express TrkA (Cui et al., 2002; Rickman and Brecha, 1995), thus the mechanisms underlying lack of NGF-mediated RGC trophic support are poorly understood. Possible explanations include that: i) axotomy and/or exposure to NGF lead to downregulation of TrkA receptors by RGCs, and ii) NGF or pro-NGF acting on p75NTR may activate proapoptotic pathways that limit neuronal survival.

To test these hypotheses, we asked the following three questions. First, are there axotomy-induced or NGF-induced changes in TrkA levels in adult RGCs? Because TrkA would mediate the survival response of RGCs to NGF, we examined if axotomy or exposure to NGF lead to detectable changes in TrkA protein levels. Second, given that NGF-mediated activation of p75NTR can induce neuronal apoptosis; do adult RGCs express p75NTR protein in vivo? Third, what is the functional consequence of p75NTR and/or TrkA activation on the survival of adult RGCs undergoing degeneration? To address this question, we used small molecule peptidomimetic ligands (agonists or antagonists), specific for TrkA or p75NTR, to establish the role of each receptor. The peptidomimetic ligands used here have been well characterized both in vitro and in vivo (Bruno et al., 2004; Debeir et al., 1999a; LeSauter et al., 1995; Li et al., 2005; Maliartchouk et al., 2000; Saragovi and Zaccaro, 2002; Shi et al., 2007; Zaccaro et al., 2005) and have several advantages including their ability to selectively agonize or antagonize

neurotrophin receptors, lack of immunogenicity, capacity to diffuse in the target tissue, water solubility and excellent stability *in vivo*.

In this study, we demonstrate that RGCs upregulate TrkA soon after axotomy and that TrkA levels remain high in the presence of exogenous NGF. p75NTR protein is expressed by Müller glial cells, but not RGCs, demonstrating a distinctive topological and cellular separation of these receptors in the adult rat and mouse retinas. Our functional data indicate that while NGF by itself does not promote RGC survival, selective activation of TrkA receptors using peptidomimetic agonistic ligands is markedly neuroprotective. Surprisingly, selective blockers of p75NTR or absence of p75NTR protect RGCs from axotomy-induced death. Moreover, combination of NGF or TrkA agonists with p75NTR antagonists functions synergistically to enhance RGC survival. Collectively, these results indicate that NGF can be neuroprotective when acting only on TrkA receptors but not on p75NTR, and reveal that p75NTR activation in Müller glia may antagonize neuronal survival.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Peptidomimetic Ligands

The peptidomimetic compounds used in this study were synthesized and validated for their binding specificity to neurotrophin receptors as previously described (LeSauter et al., 1995; Pattarawarapan et al., 2002; Zaccaro et al., 2005). The following seven, small peptides were used (Table 1): i) D3, a selective agonist of TrkA that does not bind to p75NTR (Maliartchouk et al., 2000; Bruno et al., 2004), ii) 3Ac, an agonist of both TrkA and

TrkC (Zaccaro et al., 2005), iii) 3Aa, a selective agonist of TrkC only (Zaccaro et al., 2005), iv) C92–96, an antagonist of TrkA that selectively inhibits NGF binding to TrkA (LeSauter et al., 1995; Debeir et al., 1999a), v) C30-35, an antagonistic ligand of p75NTR that selectively inhibits NGF binding to p75NTR (LeSauter et al., 1995; Longo et al., 1997; Saragovi and Zaccaro, 2002; Botchkarev et al., 2003), vi) C28-35, an antagonist that inhibits NGF binding to both TrkA and p75NTR (LeSauter et al., 1995; Xie and Longo, 2000; Saragovi and Zaccaro, 2002), and vii) 3Bj, a peptide of similar structure and physicochemical properties but with no activity (Zaccaro et al., 2005). Previous in vitro and in vivo studies using these peptidomimetic compounds showed lack of toxic effects (Debeir et al., 1999a; Bruno et al., 2004; Li et al., 2005; Shi et al., 2007a).

Experimental Animals and Surgical Procedures

Animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals (www.ccac.ca). All surgeries were carried out in adult, female Sprague-Dawley rats (180-200 g) or in p75NTR knockout mice and wild-type littermate controls (kind gift of P. A. Barker, Montreal Neurological Institute, McGill University, QC) under general anesthesia (2% Isoflurane, 0.8 litre/min).

i) Retrograde Labeling and Optic Nerve Axotomy: RGCs were selectively labeled by application of the retrograde tracer FluoroGold (2%, Fluorochrome, Englewood, CO) to the superior colliculus as described by us (Cheng et al., 2002b; Sapielha et al., 2003b; Pernet et al., 2005b; Pernet and Di Polo, 2006b). Briefly, the superior colliculi on both brain hemispheres were exposed and a small piece of gelfoam (Pharmacia and Upjohn, Inc, Mississauga, ON)

soaked in FluoroGold was applied to their surface. Seven days is the earliest time for detection of a maximum number of RGCs after application of FluoroGold to the rat superior colliculus (Berkelaar et al., 1994b; Mansour-Robaey et al., 1994b; Peinado-Ramon et al., 1996b; Cheng et al., 2002b). Thus, to ensure that all RGCs were fully labeled prior to axonal injury, axotomy was performed at 7 days after FluoroGold application. The left optic nerve was exposed and carefully transected at 0.5-1 mm from the optic nerve head, avoiding injury to the ophthalmic artery. Fundus examination was routinely performed immediately after axotomy and 3-5 days later to check the integrity of the retinal circulation after surgery. Animals showing signs of compromised blood supply were excluded from the study.

ii) Intravitreal Injections: NGF (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, human recombinant NGF, PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ), peptidomimetic ligands (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) or the polyclonal anti-p75NTR antibody REX (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, gift of P. A. Barker) were injected into the vitreous chamber of the left eye using a Hamilton syringe fitted with a 32-gauge glass microneedle (total volume: 5 μl). Phosphate buffer saline (PBS) was used as vehicle control. The sclera was exposed and the tip of the needle was inserted at a 45° angle through the sclera and retina into the vitreous space using a posterior approach. This route of administration avoided injury to the iris or lens, which can promote RGC survival (Mansour-Robaey et al., 1994b; Leon et al., 2000b). The injection was performed within ~30 sec, after which the needle was gently removed. For combined treatments, animals received two consecutive injections of each compound with a delay of 20 min between each other. Surgical glue (Indermill, Tyco Health Care, Mansfield, MA) was used to seal the injection site. Intraocular injections were performed immediately after optic nerve axotomy. The right eye was never operated on and served as internal contralateral control for each animal.

Quantification of Neuronal Survival and Statistical Analysis

Rats were euthanized at 1 or 2 weeks post-axotomy by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde and both the left (optic nerve lesion) and right (intact control) retinas were dissected and fixed for an additional 30 min. Retinas were then flat-mounted vitreal side up on a glass slide for examination of the ganglion cell layer. FluoroGold-labeled neurons were counted within 3 square areas at distances of 1, 2 and 3 mm from the rat optic disc in each of the 4 retinal quadrants for a total of 12 retinal areas as described by us and others (Villegas-Perez et al., 1993; Mansour-Robaey et al., 1994b; Cheng et al., 2002b; Sapieha et al., 2003b; Pernet and Di Polo, 2006b). In mice retinas, quantification was performed as in rats but the counted areas were at 0.25 mm, 0.625 mm and 1 mm from the optic disc for a total of 12 retinal areas as described (Sapieha et al., 2005a; Murphy et al., 2007). Macrophages and microglia that may have incorporated FluoroGold after phagocytosis of dying RGCs were distinguished by their morphology and excluded from our quantitative analyses (Thanos, 1991a; Thanos, 1991b). Fluorescent staining was examined with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC), and pictures were captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging, Burnaby, BC) and analyzed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON). Data analysis and statistics were performed using the GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison post-test or by a Student's t-test.

Retinal Immunohistochemistry

Rats (N = 4) or p75NTR knockout mice (N = 4) were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. Retina radial cryosections (16 μ m) were prepared as previously described by us (Sapieha et al., 2003b). The following primary antibodies were added to the retinal sections in blocking solution and incubated overnight at 4°C: polyclonal anti-TrkA (1 μ g/ml; gift of Dr. L. F. Reichardt, University of California, San Francisco, CA), monoclonal anti-cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP, 1:1,000, gift from J. C. Saari, University of Washington, Seattle, WA), or polyclonal anti-p75NTR (REX, 2 ng/ μ l, gift of P.A. Barker, McGill University, QC). Sections were then incubated with the following secondary antibodies: sheep anti-mouse IgG (1 μ g/ml, FITC conjugate, Sigma, Oakville, ON) or anti-rabbit IgG (1 μ g/ml, Cy3, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Sections were washed and mounted in anti-fade reagent (SlowFade, Molecular Probes, Eugene, OR). Fluorescent labeling was observed using a microscope Zeiss AxioSkop 2 Plus (Carl ZeissCanada, Kirkland, QC) or confocal microscope Leica TCS-SP1 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Western Blot Analysis

Whole fresh retinas (N = 3 per condition) were rapidly dissected and homogenized with an electric pestle (Kontes, Vineland, NJ) in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors). Retinal lysates were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min; the supernatants containing solubilised proteins were collected. Protein concentrations were determined with a detergent-compatible protein assay (Bio-Rad Life Science, Mississauga, Ontario, Canada). Retinal extracts (75–100 µg) were resolved on SDS gel or Precast SDS polyacrylamide 4-20% gels (Bio-Rad Life Science) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science). Blots were incubated in 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20 (TBST) and 5% dry non-fat milk for 1 hr at room temperature to block non-specific signals. Blots were then incubated overnight at 4°C with anti-TrkA (1 µg/ml), polyclonal phospho-Erk1/2 that specifically recognizes Erk1/2 phosphorylated on Thr202/185 and Tyr204/187 residues (0.2 µg/ml, BioSource, International, Camarillo, CA), polyclonal pan Erk1/2 (2.3 µg/ml, BioSource International), or monoclonal β-actin (0.5 µg/ml, Sigma) antibodies. Membranes were washed in TBST and incubated in peroxidase-linked secondary antibodies (0.5 µg/ml, GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC) for 1 hr at room temperature. Blots were developed using chemiluminescence reagents (ECL or Plus-ECL, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Woodbridge, ON) and exposed to autoradiographic film (X-OMAT; Eastman Kodak, Rochester, NY). Densitometric analysis was performed using Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD) on scanned autoradiographic films obtained from a series of 3 independent western blots each carried out using retinal samples from distinct

experimental groups. The densitometric values obtained for TrkA were normalized with respect to their β -actin loading controls in the same blot to obtain the final ratios. The densitometric values obtained for phosphorylated (active) Erk1/2 were normalized with respect to their loading controls (non-phosphorylated Erk1/2) in the same blot to obtain the final phosphorylated/total protein ratios.

RESULTS

Optic nerve axotomy increases TrkA protein levels in RGCs

The reported failure of NGF to protect RGCs is intriguing because these neurons have been shown to express TrkA receptors in developing and adult RGCs (Rickman and Brecha, 1995; Cui et al., 2002b). To address the possibility that lack of TrkA in adult RGCs may limit their ability to respond to this neurotrophin, we examined the pattern of TrkA protein expression in mature retinas, both intact and axotomized. Retinal immunohistochemistry demonstrated low levels of TrkA in the ganglion cell layer in the intact retina (Fig. 1A). Following axotomy, there was robust upregulation of TrkA immunostaining in the ganglion cell layer (Fig. 1B), with most RGCs expressing high levels of this receptor (Fig. 1C-E). Confocal microscopy analysis confirmed that all TrkA-positive cells were RGCs, visualized with the retrograde tracer FluoroGold (Fig. 1F-H).

Ligand-induced downregulation of neurotrophin receptors has been reported both in vitro and in vivo (Knusel et al., 1994; Knusel et al., 1997). Western blot analysis was carried out to test whether intravitreal injection of NGF altered TrkA protein expression by RGCs and

to validate our immunocytochemical findings. Analysis of retinal homogenate samples from intact eyes injected with NGF or PBS (control) showed low levels of TrkA, similar to intact non-injected retinas. Axotomy alone substantially increased retinal TrkA protein expression, and this level remained high whether or not NGF was administered at the time of axotomy (Fig. 1I). Densitometric analysis confirmed that optic nerve transection resulted in a ~3.3-fold increase of TrkA with respect to control retinas (ANOVA, $P < 0.001$), while injection of NGF at the time of axotomy did not change significantly the levels of TrkA with respect to axotomy alone (ANOVA, $P > 0.05$) (Fig. 1J).

To test whether TrkA expressed by RGCs was activated *in vivo*, we examined the levels of phosphorylated (active) retinal Erk1/2 following intraocular injection of NGF or D3, a selective TrkA agonist. The Erk1/2 pathway is a canonical signaling pathway downstream of Trk receptors and has been previously used as a reliable readout of retinal Trk activity *in vivo* (Cheng et al., 2002b). Eyes treated with NGF or D3 showed a marked increase in phospho-Erk1/2 compared to control PBS-treated or intact retinas (Figs. 1K, L) (ANOVA, $P < 0.001$). Collectively, these results are in agreement with previous studies showing that retinal Trk proteins increase following optic nerve injury and ocular hypertension (Cui et al., 2002b; Rudzinski et al., 2004), and extend these observations to show that injection of NGF at the time of axotomy does not alter TrkA protein expression by RGCs but leads, as D3, to receptor activation. These data indicate that TrkA is present in injured RGCs and that signaling by this receptor may contribute to neuronal survival after optic nerve injury.

Selective TrkA peptidomimetic agonists promote survival of axotomized

RGCs To test whether TrkA activation can promote RGC neuroprotection, we analyzed the ability of RGCs to survive in the presence of exogenous NGF or the TrkA agonist D3. In control uninjured retinas, the mean density of FluoroGold-labeled RGCs was $2,347 \pm 54$ cells/mm² (mean \pm S.E.M., n=5) (Fig. 2A, Fig. 3). These values did not change during survival times of up to 5 weeks following tracer application. The densities of RGCs at 2, 3, 4 and 5 weeks after retrograde labeling were: $2,217 \pm 97$ cells/mm² (n=5), $2,398 \pm 42$ cells/mm² (n=5), $2,292 \pm 33$ cells/mm² (n=5), and $2,327 \pm 51$ (n=5), respectively, and were not statistically different from each other (ANOVA, $P > 0.05$). These data indicate that FluoroGold by itself does not induce cell death and does not leak from rat RGCs in vivo for at least 5 weeks after retrograde application. Based on this, treated retinas were examined at 1 and 2 weeks following axonal injury to determine the density of surviving RGCs, visualized with FluoroGold (Figs. 2 and 3, Table 1).

Eyes that received a single intraocular injection of D3 showed robust RGC neuroprotection (Fig. 2B) compared to control eyes injected with the inactive peptide 3Bj (Fig. 2C) or non-injected eyes (Fig. 2D), while intraocular injection of NGF (5 μ g) did not promote RGC survival (Fig. 2E). This effect was consistent with a previous study showing D3-induced RGC neuroprotection in an ocular hypertension model (Shi et al., 2007a). Combined treatment with D3 (TrkA agonist) and C92-96 (selective TrkA antagonist) blocked D3-induced RGC survival (Figs. 2F, 3). We have previously demonstrated that C92-96 is an antagonist of NGF (LeSauter et al., 1995; Debeir et al., 1999b; Maliartchouk et al., 2000) and that D3 acts synergistically with NGF in vivo (Maliartchouk et al., 2000; Bruno et al., 2004). It is therefore

likely that C92-96 antagonizes the effect of D3 on TrkA activation by antagonizing its cooperation with NGF, which is expressed endogenously in the adult retina.

We then quantified RGC densities on retinal flat mounts to confirm our histological observations (Fig. 3). Previous studies, including ours, have demonstrated that virtually all RGCs survive for 5 days after axotomy and then die abruptly: the population of RGCs is reduced to approximately 50% by day 7 and to ~10% on day 14 post-lesion (Berkelaar et al., 1994b; Mansour-Robaey et al., 1994b; Peinado-Ramon et al., 1996b; Clarke et al., 1998; Klöcker et al., 1998; Bien et al., 1999; Cheng et al., 2002b; Pernet and Di Polo, 2006b). In D3-treated eyes, 80% of RGCs survived at 1 week after axotomy, a number significantly greater than that produced by NGF (65% survival) or the inactive peptide 3Bj (58% survival) at 1 week post-lesion (ANOVA, $P < 0.001$). The effect of D3 was still marked at 2 weeks after axotomy, with 22% of all RGCs remaining alive compared to only 11% or 9% survival afforded by NGF or the inactive peptide 3Bj, respectively (ANOVA, $P < 0.01$). Interestingly, a peptidomimetic agonist for both TrkA and TrkC (3Ac, Fig. 3) also promoted robust RGC neuroprotection at 1 and 2 weeks after axotomy, and was not significantly different to that produced by D3 (ANOVA, $P > 0.05$). Intraocular injection of a selective TrkC peptidomimetic agonist (3Aa), however, failed to promote RGC neuroprotection, leading us to conclude that the survival effect promoted by 3Ac was primarily due to TrkA activation. These data indicate that selective peptidomimetic agonists of TrkA, but not NGF or TrkC agonists, promote RGC neuroprotection following optic nerve injury.

To determine how endogenous neurotrophins, particularly NGF and pro-NGF, could modulate receptor activity and the effect of peptidomimetic ligands, we examined their levels

in intact versus axotomized retinas. The level of endogenous NGF was low and did not change between intact and injured retinas (Fig. 4A), while pro-NGF was markedly upregulated after injury (Fig. 4B). Based on previous observations that p75NTR can mediate neuronal apoptosis in response to neurotrophins and pro-neurotrophins (Hempstead, 2006b), we then examined the expression and role of p75NTR in adult RGC survival.

p75NTR is expressed by Müller cells in the adult rodent retina

p75NTR mediates neuronal apoptosis in the early phases of retinal development (Frade et al., 1996a; Harada et al., 2006), thus we asked whether this receptor might play a role in the survival of adult retinal neurons. First, we examined the cellular distribution of p75NTR in the mature retina. p75NTR immunostaining was detected in radial processes that spanned the entire retina, typical of Müller glia (Fig. 5A), and was particularly strong in putative Müller cell end-feet in the ganglion cell layer (GCL). To confirm that Müller cells express p75NTR, we carried out co-localization studies using an antibody against cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP), a Müller cell-specific marker (Fig 5B). The superimposition of 86 p75NTR and CRALBP immunoreactivity revealed that Müller cell bodies and processes contain p75NTR (Fig. 5C). p75NTR staining in the outer plexiform and outer nuclear layers was consistently associated with Müller cell processes in all retinas examined (Fig. 5D-F). In contrast, FluoroGold-positive cells in the ganglion cell layer completely lacked p75NTR immunoreactivity as revealed by epifluorescent (Fig. 5G-I) and confocal (Fig. 5J-L) microscopy. These data indicate that p75NTR is either not expressed by RGCs or is below the levels detected by immunohistochemistry.

To confirm and extend these observations, we examined p75NTR protein expression in wild-type and p75NTR knockout mice (Fig. 5M, N). Similar to rat retinas, p75NTR immunoreactivity was detected in Müller cells of wild-type mouse retinas, but this staining was completely absent in p75NTR null retinas validating the specificity of the REX antibody. To examine whether p75NTR protein levels changed after axotomy, we performed western blot analysis of retinal homogenates with REX (Fig. 5O). Our results showed no detectable changes in the total levels of p75NTR protein between intact and axotomized retinas (48 hrs or 1 week). This finding is consistent with a previous electron microscopy study showing that p75NTR protein levels or distribution did not change after axotomy (Hu et al., 1999).

Inhibition of p75NTR signaling enhances RGC survival following optic nerve injury

To establish the role of p75NTR receptor signaling on RGC survival, we used the peptidomimetic compound C30-35, an antagonistic ligand of p75NTR that selectively inhibits NGF binding to p75NTR (LeSauter et al., 1995; Longo et al., 1997; Saragovi and Zaccaro, 2002; Botchkarev et al., 2003). Intravitreal injection of C30-35 promoted significant RGC protection from axotomy-induced death (Fig. 6A, Fig. 7, Table 1) compared to control retinas injected with an inactive peptide (Fig. 6B). Indeed, quantitative analysis of RGC densities demonstrated that a single injection of C30-35 promoted the survival of 75% of RGCs at 1 week post-axotomy, and 23% RGC survival at 2 weeks after lesion (ANOVA, $P < 0.001$). To confirm these findings, we used an alternative method to inhibit p75NTR activity by injecting the selective p75NTR function blocking antibody REX. Similar to our findings with C30-35, the p75NTR antibody promoted the survival of 81% and 18% of RGCs at 1 and 2 weeks after

axotomy, respectively, validating the specificity of C30-35 *in vivo* (Fig. 7). Another peptidomimetic ligand (C28-35) that inhibits NGF binding to both TrkA and p75NTR (LeSauter et al., 1995; Xie and Longo, 2000; Saragovi and Zaccaro, 2002) promoted RGC survival at 1 week after axotomy (~80%); but this effect was much reduced at 2 weeks post-injury (9%) and was not significantly different from retinas exposed to the inactive control peptide (9%) or axotomy alone (11%) (ANOVA, $P > 0.05$) (Fig. 7).

To establish whether p75NTR blockade would enhance neuroprotection by TrkA agonists, we tested the combinatorial effect of C30-35 with NGF or D3 on RGC survival. This combination afforded a substantial potentiation of RGC neuroprotection after axotomy (Figs. 6C, D). Administration of both NGF and C30-35 promoted striking survival of RGCs: 100% of all neurons were alive at 1 week after axotomy, an effect that was still robust at 2 weeks post-injury (34% survival). Overall, the neuroprotective effect of combined C30-35 and NGF or D3 was significantly higher than each treatment alone (Fig. 7, ANOVA, *** = $P < 0.001$, * = $P < 0.05$). Collectively, these data demonstrate that blockade of NGF binding to p75NTR leads to RGC neuroprotection, and that simultaneous blockade of p75NTR and activation of TrkA markedly potentiates neuronal survival.

To unambiguously demonstrate that activation of p75NTR in glia may be detrimental for neuronal survival, we took a genetic (non-pharmacological) approach by examining the densities of axotomized RGCs in p75NTR knockout mice. Similar to our studies in rat retina, mouse RGCs were first labeled by application of FluoroGold to the superior colliculus, then axotomized (7 days after retrograde labeling), and quantified at 1 week after injury. We, and others, have previously demonstrated that RGC densities are higher in the intact mouse (~

3,500-4,000 RGCs/mm²) than in intact rat (~2,300 RGCs/mm²) retinas (Sapieha et al., 2005a; Murphy et al., 2007). Figure 8 shows that lack of p75NTR leads to remarkable neuroprotection of adult RGCs following axotomy: 83% survived in p75NTR (-/-) retinas at 1 week post-axotomy compared to 51% that survived in p75NTR (+/+) controls (ANOVA, $P < 0.001$) (Fig. 8). Of interest, the total density of RGCs in non-injured (intact) p75NTR (-/-) was not significantly different from that found in wild-type littermate controls (ANOVA, $P > 0.05$). This observation is in agreement with a recent study showing that while p75NTR is involved in the regulation of mouse RGC number in the early phases of retinal development, the number of post-natal RGCs is the same in p75NTR (-/-) and p75NTR (+/+) retinas (Harada et al., 2006). These results further support our conclusion that inhibition of p75NTR in glia potentiates RGC survival after axonal injury.

DISCUSSION

The present study explored the functional roles of the neurotrophin receptors TrkA and p75NTR in the regulation of adult RGC survival in vivo. Our data support four main conclusions. First, TrkA protein expression is substantially increased in adult RGCs following optic nerve axotomy, and these neurons continue to express high levels of TrkA in the presence of exogenous NGF. Second, selective activation of TrkA receptors using small, peptidomimetic agonistic ligands markedly enhances RGC survival. In contrast, NGF, the natural ligand of TrkA, or TrkC ligands, do not promote RGC protection. The failure of TrkC agonists to protect RGCs may be partly because most of the TrkC expressed in the adult retina is the truncated isoform TrkC(T1) (Rudzinski et al., 2004). Third, selective blockade of p75NTR or absence of

p75NTR, which is expressed by Müller glia, enhances the survival of RGCs. Finally, combined activation of TrkA with inhibition of p75NTR enhances neuroprotection beyond that obtained by activation of TrkA alone.

Neurotrophins have been extensively investigated for their ability to promote the survival of retinal neurons after injury. However, the molecular mechanisms that limit or impair the neuronal response to neurotrophins *in vivo* are poorly understood. Although axotomized RGCs express high levels of TrkA and can respond to NGF, neither endogenous NGF produced in the retina (Amendola et al., 2003; Rudzinski et al., 2004) nor exogenous NGF administered intraocularly promoted neuronal survival. In contrast, selective TrkA agonists were neuroprotective demonstrating that TrkA signaling plays a key role in the survival of adult RGCs following optic nerve injury. Then, why might exogenous NGF fail to promote RGC survival? Our data indicate that exogenous NGF can be neuroprotective when acting on TrkA receptors on neurons but not when it binds to p75NTR on glia, suggesting that NGF may bind to glial p75NTR and trigger signaling pathways that are detrimental for neuronal survival. Interestingly, our data also show that the level of endogenous NGF protein was low and did not increase in axotomized retinas with respect to non-injured retinas, while endogenous pro-NGF was markedly upregulated. This finding suggests that endogenous pro-NGF may play a role in the modulation of RGC death via p75NTR. Indeed, inhibition of p75NTR unmasked a potent neuroprotective effect of

Furthermore, the sole blockade of p75NTR in the absence of NGF promoted RGC survival and a large number of axotomized RGCs survived in p75NTR null retinas. This suggests that there may be sufficient endogenous neurotrophic factors in the retina to promote

RGC survival when p75NTR is blocked. The peptidomimetic compound C28-35, which inhibits NGF binding to both TrkA and p75NTR (Xie and Longo, 2000; Saragovi and Zaccaro, 2002), conferred only marginal RGC survival, detectable at 1 week but not at 2 weeks post-injury. These results suggest that blockade of p75NTR initially promotes survival but that TrkA activation is ultimately required for prolonged neuroprotection. This finding may also explain why C28-35 failed to rescue RGCs in a chronic glaucoma model where the analysis of neuronal survival was performed at ≥ 21 days after administration of this compound (Shi et al., 2007a).

The functional interaction between TrkA and p75NTR is best understood in cells that co-express both of these receptors (Clary and Reichardt, 1994a; Bibel et al., 1999; Dechant and Barde, 2002; Huang and Reichardt, 2003a; Teng and Hempstead, 2004; Barker, 2007). When TrkA/p75NTR ratios are low or when the neurotrophin levels are limited, p75NTR activation can lead to neuronal death. This occurs in the developing chick and mouse retina, where migratory RGCs are eliminated by p75NTR-mediated apoptosis via an autocrine effect of NGF (Frade et al., 1996a; Frade et al., 1999; Gonzalez-Hoyuela et al., 2001; Harada et al., 2006). However, this model does not apply to the effects described here in the adult retina where the receptors are segregated topographically and are expressed in different cell populations: RGCs express TrkA and Müller glia express p75NTR. Our finding is in agreement with previous electron microscopy studies in mature retina showing that p75NTR is present in Müller cell end-feet, but not in the RGCs themselves (Hu et al., 1998; Hu et al., 1999). A recent study detected very low levels of p75NTR by RT-PCR (40 amplification cycles) in acutely purified, mouse RGCs in vitro (Butowt and von Bartheld, 2005), but there are no reports that unequivocally demonstrate the expression of p75NTR in adult RGCs in vivo. The absence or very limited

expression of p75NTR in mature RGCs is in line with the general observation that neuronal-specific p75NTR plays a prominent role during developmental cell death, but it is markedly downregulated in many neuronal types once they have reached their final targets (Yan and Johnson, 1988). Notably, p75NTR is also expressed by other non-neuronal cell populations in the CNS including oligodendrocytes, olfactory ensheathing cells and Schwann cells, but its role in glia remains poorly defined (Cragolini and Friedman, 2007). In the adult retina, our results indicate that pharmacological blockade of p75NTR or genetic deletion of p75NTR in Müller glia enhances RGC survival after axotomy. Furthermore, selective inhibition of p75NTR is required for optimal TrkA-mediated RGC neuroprotection. Collectively, these findings provide evidence for a novel mechanism by which glial cells profoundly influence neuronal survival.

Müller cells are specialized radial glia with processes that closely wrap around neuronal cell bodies and dendrites. They provide metabolic support and regulate the microenvironment (Bringmann et al., 2006b), hence are ideally suited to control neuronal viability. Of interest, Müller cells become reactive after axotomy but they do not die (Scherer and Schnitzer, 1991; Huxlin et al., 1995) making it unlikely that p75NTR expression by Müller glia promotes cell-autonomous death. Although p75NTR protein does not increase in Müller cells following optic nerve axotomy (Hu et al., 1999), it is possible that p75NTR signaling in reactive Müller cells leads to the production of neurotoxic molecules that limit the ability of RGCs to survive after axonal injury. For example, we have shown that endogenous polyamines, produced by Müller glia, enhance NMDA-mediated RGC death (Pernet et al., 2007a). Moreover, blockade of p75NTR on Müller cells prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration by increasing synthesis of the photoreceptor survival factor FGF-2 (Harada et al.,

2000a). Therefore, Müller cells may regulate neuronal death directly by releasing neurotoxins or indirectly by reducing their supportive functions.

Understanding the requirements of adult RGCs to survive after axonal injury is paramount for the development of neuroprotective strategies applicable to most optic neuropathies. Here we show that selective TrkA agonists and NGF, a neurotrophic factor previously thought to be inadequate to promote RGC survival, are in fact potent neuroprotective agents when acting only on neuronal TrkA receptors but not glial p75NTR. Moreover, our data reveal that combined TrkA activation and glial p75NTR blockade potentiate neuronal survival and provide proof-of-principle for the efficacy of this strategy for retina and optic nerve repair.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Drs. Timothy E. Kennedy and Phil A. Barker for helpful comments on the manuscript. This work was supported by independent grants from the Canadian Institutes of Health Research to A.D.P. and H.U.S.; and a Chercheur-Boursier (Senior) scholarship (A.D.P.), a doctoral studentship (F.L.J.) and an infrastructure grant from the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

- Amendola, T., Fiore, M., Aloe, L., 2003. Postnatal changes in nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor levels in the retina, visual cortex, and geniculate nucleus in rats with retinitis pigmentosa. *Neurosci. Lett.* 345, 37-40.
- Barker, P.A., 2004. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42, 529-533.

- Barker, P.A., 2007. High Affinity Not in the Vicinity? *Neuron* 53, 1-4. Berkelaar, M., Clarke, D.B., Wang, Y.-C., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1994. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 14, 4368-4374.
- Bibel, M., Hoppe, E., Barde, Y.A., 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *Embo J* 18, 616-622.
- Bien, A., Seidenbecher, C.I., Bockers, T.M., Sabel, B.A., Kreutz, M.R., 1999. Apoptotic necrotic characteristics of retinal ganglion cell death after partial optic nerve injury. *J. Neurotrauma* 16, 153-163.
- Bosco, A., Linden, R., 1999. BDNF and NT-4 differentially modulate neurite outgrowth in developing retinal ganglion cells. *J. Neurosci. Res.* 57, 759-769.
- Botchkarev, V.A., Yaar, M., Gilchrest, B.A., Paus, R., 2003. p75 Neurotrophin Receptor Antagonist Retards Apoptosis-driven Hair Follicle Involution (Catagen). 120, 168-169
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A., 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 397-424.
- Bruno, M.A., Clarke, P.B.S., Seltzer, A., Quirion, R., Burgess, K., Cuello, A.C., Saragovi, H.U., 2004. Long-Lasting Rescue of Age-Associated Deficits in Cognition and the CNS Cholinergic Phenotype by a Partial Agonist Peptidomimetic Ligand of TrkA. *J. Neurosci.* 24, 8009-8018.
- Butowt, R., von Bartheld, C.S., 2005. Anterograde axonal transport of BDNF and NT-3 by retinal ganglion cells: Roles of neurotrophin receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29, 11-25.
- Chen, H., Weber, A.J., 2001. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 966-974.
- Cheng, L., Sapienza, P., Kittlerová, P., Hauswirth, W.W., Di Polo, A., 2002. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J. Neurosci.* 22, 3977-3986.
- Clarke, D.B., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1998. Prolonged administration of NT-4/5 fails to rescue most axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Vision Res* 38, 1517-1524.
- Clary, D.O., Reichardt, L.F., 1994. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11133-11137.
- Cohen, A., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1994. Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *J. Neurobiol.* 25, 953-959
- Cragolini, A.B., Friedman, W.J., 2007. The function of p75NTR in glia. *Trends Neurosci.* 31, 99-104.
- Cui, Q., 2006. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Mol. Neurobiol.* 33, 155-179.

- Cui, Q., Harvey, A.R., 1995. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *J. Neurosci.* 15, 8143-8155.
- Cui, Q., Tang, L.S., Hu, B., So, K.F., Yip, H.K., 2002. Expression of *trkA*, *trkB*, and *trkC* in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1954-1964.
- Debeir, T., Saragovi, H.U., Cuello, A.C., 1999a. A nerve growth factor mimetic *TrkA* antagonist causes withdrawal of cortical cholinergic boutons in the adult rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4067-4072.
- Debeir, T., Saragovi, H.U., Cuello, A.C., 1999b. A nerve growth factor mimetic *TrkA* antagonist causes withdrawal of cortical cholinergic boutons in the adult rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4067-4072.
- Dechant, G., Barde, Y.A., 2002. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.* 11, 1131-1136.
- Di Polo, A., Aigner, L.J., Dunn, R.J., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1998. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3978-3983.
- Frade, J.M., Bovolenta, P., Rodriguez-Tebar, A., 1999. Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc. Res. Tech.* 45, 243-251.
- Frade, J.M., Rodriguez-Tebar, A., Barde, Y.-A., 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383, 166-168.
- Gonzalez-Hoyuela, M., Barbas, J.A., Rodriguez-Tebar, A., 2001. The autoregulation of retinal ganglion cell number. *Development.* 128, 117-124.
- Harada, C., Harada, T., Nakamura, K., Sakai, Y., Tanaka, K., Parada, L.F., 2006. Effect of p75NTR on the regulation of naturally occurring cell death and retinal ganglion cell number in the mouse eye. *Dev. Biol.* 290, 57-65.
- Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H., Wada, K., 2000. Modification of Glial-Neuronal Cell Interactions Prevents Photoreceptor Apoptosis during Light-Induced Retinal Degeneration. *Neuron* 26, 533-541.
- Hempstead, B.L., 2006. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr. Alzheimer Res.* 3, 19-24.
- Hu, B., Yip, H.K., So, K.-F., 1998. Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: an immunocytochemical study at the light and electronmicroscopic levels. *Glia* 24, 187-197.
- Hu, B., Yip, H.K., So, K.F., 1999. Expression of p75 neurotrophin receptor in the injured and regenerating retina. *Neuroreport* 10, 1293-1297.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2003. *Trk* receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609-642. .

- Huxlin, K.R., Dreher, Z., Schulz, M., Dreher, B., 1995. Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia* 15, 105-118.
- Johnson, J.E., Barde, Y.-A., Schwab, M., Thoenen, H., 1986. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 6, 3031-3038.
- Klöcker, N., Cellerino, A., Bähr, M., 1998. Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effect of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo. *J. Neurosci.* 18, 1038-1046.
- Klöcker, N., Kermer, P., Weishaupt, J.H., Labes, M., Ankerhold, R., Bähr, M., 2000. Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. *J. Neurosci.* 20, 6962-6967.
- Knusel, B., Gao, H., Okazaki, T., Yoshida, T., Mori, N., Hefti, F., Kaplan, D.R., 1997. Ligand-induced down-regulation of trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons. *Neurosci.* 78, 851-862.
- Knusel, B., Rabin, S.J., Hefti, F., Kaplan, D.R., 1994. Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J. Neurosci.* 14, 1542-1554.
- Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N., Benowitz, L.I., 2000. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J. Neurosci.* 20, 4615-4626.
- LeSauter, L., Wei, L., Gibbs, B.F., Saragovi, H.U., 1995. Small Peptide Mimics of Nerve Growth Factor Bind TrkA Receptors and Affect Biological Responses. *J. Biol. Chem.* 270, 6564-6569.
- Li, S., Saragovi, H.U., Nedev, H., Zhao, C., Racine, R.J., Fahnestock, M., 2005. Differential actions of nerve growth factor receptors TrkA and p75NTR in a rat model of epileptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 162-172.
- Longo, F.M., Manthorpe, M., Xie, Y.M., Varon, S., 1997. Synthetic NGF peptide derivatives prevent neuronal death via a p75 receptor-dependent mechanism. *J. Neurosci. Res.* 48, 1-17.
- Maliartchouk, S., Feng, Y., Ivanisevic, L., Debeir, T., Cuello, A.C., Burgess, K., Saragovi, H.U., 2000. A designed peptidomimetic agonistic ligand of TrkA nerve growth factor receptors. *Mol. Pharmacol.* 57, 385-391.
- Mansour-Robaey, S., Clarke, D.B., Wang, Y.-C., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1994. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1632-1636.
- Mey, J., Thanos, S., 1993. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.* 602, 304-317.

- Murphy, J.A., Franklin, T.B., Rafuse, V.F., Clarke, D.B., 2007. The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 280-292.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L., Petersen, C.M., 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843-848.
- Pattarawarapan, M., Zaccaro, M.C., Saragovi, U.H., Burgess, K., 2002. New templates for syntheses of ring-fused, C(10) beta-turn peptidomimetics leading to the first reported small-molecule mimic of neurotrophin-3. *J. Med. Chem.* 45, 4387-4390.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 489-500.
- Pernet, V., Bourgeois, P., Di Polo, A., 2007. A role for polyamines in retinal ganglion cell excitotoxic death. *J. Neurochem.* 103, 1481-1490.
- Pernet, V., Di Polo, A., 2006. Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promote retinal ganglion cell survival, but lead to optic nerve dystrophy in vivo. *Brain* 129, 1014-1026.
- Pernet, V., Hauswirth, W.W., Di Polo, A., 2005. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J. Neurochem.* 93, 72-83.
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 361, 1545-1564.
- Rickman, D.W., Brecha, N.C., 1995. Expression of the proto-oncogene, *trk*, receptors in the developing rat retina. *Vis. Neurosci.* 12, 215-222.
- Roux, P.P., Barker, P.A., 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203-233.
- Rudzinski, M., Wong, T.P., Saragovi, H.U., 2004. Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J. Neurobiol.* 58, 341-354.
- Sapieha, P.S., Duplan, L., Uetani, N., Joly, S., Tremblay, M.L., Kennedy, T.E., Di Polo, A., 2005. Receptor protein tyrosine phosphatase sigma inhibits axon regrowth in the adult injured CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 28, 625-635.
- Sapieha, P.S., Peltier, M., Rendahl, K.G., Manning, W.C., Di Polo, A., 2003. Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 656-672.
- Saragovi, H., Zaccaro, M., 2002. Small Molecule Peptidomimetic Ligands of Neurotrophin Receptors, Identifying Binding Sites, Activation Sites and Regulatory Sites. *Curr. Pharm. Design* 8, 2201-2216.

- Scherer, J., Schnitzer, J., 1991. Intraorbital transection of the rabbit optic nerve: consequences for ganglion cells and neuroglia in the retina. *J Comp Neurol.* 312, 175-192.
- Shi, Z., Birman, E., Saragovi, H.U., 2007. Neurotrophic rationale in glaucoma: A TrkA agonist, but not NGF or a p75 antagonist, protects retinal ganglion cells in vivo. *Dev. Neurobiol.* 67, 884-894.
- Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2004. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 35-48.
- Thanos, S., 1991a. The Relationship of Microglial Cells to Dying Neurons During Natural Neuronal Cell Death and Axotomy-induced Degeneration of the Rat Retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 1189-1207.
- Thanos, S., 1991b. Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci. Lett.* 127, 108-112.
- Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1993. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 24, 23-36.
- Xie, Y., Longo, F.M., 2000. Neurotrophin small-molecule mimetics. *Prog. Brain Res.* 128, 333-347.
- Yan, Q., Johnson, E.M., Jr., 1988. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J. Neurosci.* 8, 3481-3498.
- Zaccaro, M.C., Lee, H.B., Pattarawarapan, M., Xia, Z., Caron, A., L'Heureux, P.J., Bengio, Y., Burgess, K., Saragovi, H.U., 2005. Selective small molecule peptidomimetic ligands of TrkC and TrkA receptors afford discrete or complete neurotrophic activities. *Chem. Biol.* 12, 1015-1028.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Axonal injury increases TrkA levels in RGCs.

Fluorescent microscopy images show low expression of TrkA in intact RGCs (A), while there is marked upregulation of this receptor at 48 hrs after optic nerve transection (B). High magnification of the TrkA staining in RGCs, visualized with FluoroGold (FG) (C-E). Confocal microscopy images show that TrkA-positive cells are FluoroGold-positive RGCs (F-H). Western blots of retinal extracts confirm that TrkA levels in the intact retina are low, either in the presence or absence of NGF, and that optic nerve transection leads to TrkA upregulation, an effect that remains unchanged with NGF (n=3 rats/group). The lower panel represents the same blot as in the upper panel but probed with an antibody that recognizes β -actin used to confirm equal protein loading (I). Densitometric analysis (n = 3/group) shows that axotomy leads to TrkA upregulation with respect to control retinas (ANOVA, * = P < 0.001), and that NGF treatment did not alter TrkA expression with respect to axotomy alone (ANOVA, P > 0.05) (J). In vivo activation of Erk1/2 kinases was detected in retinal homogenates after injection of D3 or NGF compared to control eyes. Blots were probed with an antibody that selectively recognizes Erk1/2 phosphorylated on Thr202/Tyr204 residues. Lower panel shows the same blot probed with an antibody to visualize total Erk1/2 protein (K). Densitometric analysis (n = 3/group) confirmed that a single injection of both D3 and NGF led to a 2-fold increase in phospho-Erk1 (ANOVA, * = P < 0.05, ** = P < 0.01) and a

2.1-fold increase in phospho-Erk2 (ANOVA, * = P < 0.05) with respect to contrôle retinas (L). ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer,

IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer. Scale bars: 50 μm (A, B), 12.5 μm (C-E), 8 μm (F-H).

FIGURE 2. TrkA peptidomimetic agonists promote RGC survival.

Fluorescent photomicrographs of flat-mounted retinas showing FluoroGold-labeled RGCs in intact retina (A), or in axotomized retinas that received: D3, a peptidomimetic agonist of TrkA (B), 3Bj, an inactive peptidomimetic ligand (C), no treatment (axotomy alone) (D), nerve growth factor (NGF) (E), or a combination of D3 and C92-96, an antagonist of TrkA (F). Scale bar: 100 μm .

FIGURE 3. Quantification of RGC survival using TrkA agonists and antagonists.

Quantitative analysis of RGC survival at 1 and 2 weeks after axotomy in eyes treated with: axotomy alone (light gray bars), inactive peptide (3Bj, dotted bars), nerve growth factor (NGF, dark gray bars), a TrkA agonist (D3, black bars), a combination of D3 and a specific TrkA antagonist (C92-96) (horizontal lines bar), a TrkA and TrkC agonist (3Ac) (vertical lines bars), and a selective TrkC agonist (3Aa) (hatched bars) (n = 4-6 rats per group, see Table 1). The density of RGCs in intact retinas, without treatment or surgery, is shown as reference (open bar). Data are expressed as the mean RGCs \pm S.E.M. (ANOVA ** = P < 0.001, * = P < 0.01).

FIGURE 4. Levels of endogenous NGF and pro-NGF in intact and injured retinas.

(A) Western blot analysis show that endogenous NGF level is low in retinal extracts, but does not change after optic nerve transection. Densitometric analysis (n = 3/group) shows no difference in NGF levels in non-injured versus axotomized retinas (Student's t-test, $P > 0.05$).

(B) In contrast, endogenous retinal pro-NGF is upregulated at 48 hrs after axotomy. Densitometric analysis (n = 3/group) confirmed that axotomy led to a 3-fold increase in pro-NGF levels with respect to intact retinas (Student's t-test, $P < 0.001$). Each lower panel represents the same blot as in the upper panel but probed with an antibody that recognizes β -actin used to confirm equal protein loading.

FIGURE 5. p75NTR is expressed by Müller cells in the adult rodent retina.

Double immunolabeling with antibodies against p75NTR (REX) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP), a Müller cell-specific marker, shows strong expression of p75NTR in Müller cell bodies and processes (A-C). p75NTR staining in the OPL and ONL co-localized with CRALBP (D-F). Absence of co-localization of p75NTR staining with FluoroGold demonstrates that adult RGCs are devoid of p75NTR (G-I, white arrowheads). Confocal microscopy images show that p75NTR staining is in Müller cell processes surrounding RGCs, but not in the neurons themselves (J-L). p75NTR immunoreactivity is also detected in Müller cells of wild-type mouse retinas, and this staining is completely absent in p75NTR null retinas validating the specificity of our antibody (M, N). Western blot analysis of retinal extracts show that the level of p75NTR protein does not change at 48 hrs or 1 week after axotomy. The lower panel represents the same blot as in the upper panel but probed with an antibody that recognizes

β -actin used to confirm equal protein loading (O). ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer. Scale bars: 50 μ m (A-C), 25 μ m (D-I), 100 μ m (M, N).

FIGURE 6. Blockade of p75NTR enhances RGC survival following optic nerve injury.

Fluorescent photomicrographs of flat-mounted retinas showing FluoroGold-labeled RGCs in retinas treated with C30-35, a p75NTR antagonist (A), 3Bj, an inactive peptidomimetic ligand (B), a combination of nerve growth factor (NGF) and C30-35 (C), or a combination of D3 (TrkA agonist) and C30-35 (D). Scale bar: 100 μ m.

FIGURE 7. Quantification of RGC survival using p75NTR antagonists alone or in combination with TrkA agonists.

Quantitative analysis of RGC survival at 1 and 2 weeks after axotomy in eyes treated with: axotomy alone (light gray bars), inactive peptide (3Bj, dotted bars), the p75NTR antagonist C30-35 (dark gray bars), a p75NTR function-blocking antibody (REX, dark gray bars), the p75NTR/TrkA antagonist C28-35 (hatched bars), a combination of nerve growth factor (NGF) and C30-35 (horizontal lines bars), or a combination of the TrkA agonist D3 and C30-35 (vertical lines bars) (n = 3-6 rats per group, see Table 1). The density of RGCs in intact retinas, without treatment or surgery, is shown as reference (open bar). Data are expressed as the mean RGCs \pm S.E.M. (ANOVA * = P < 0.05, ** = P < 0.01, *** = P < 0.001).

FIGURE 8. Increased survival of axotomized RGCs in p75NTR null retinas.

Quantitative analysis of RGC survival at 1 week after axotomy in eyes of p75NTR knock-out mice (black bars) and p75NTR (+/+) wild-type littermate controls (open bars). There is marked survival of axotomized RGCs in p75NTR null retinas compared to wild-type littermate controls. The density of RGCs in intact mouse retinas is shown as reference. Data are expressed as the mean RGCs \pm S.E.M. (ANOVA * = $P < 0.001$).

TABLE 1 : Survival of axotomized RGCs after injection of peptidomimetic ligands *in vivo*

Agent ^a	Target	RGCs/mm ² ± S.E.M. (% of intact contralateral retinas); <i>n</i> time after axotomy	
		1 week	2 weeks
NGF	TrkA natural ligand	1525 ± 32 (65%), <i>n</i> = 4	259 ± 21 (11%), <i>n</i> = 4
D3	TrkA agonist	1874 ± 73 (80%), <i>n</i> = 5	523 ± 39 (22%), <i>n</i> = 5
3Ac	TrkA and TrkC agonist	2023 ± 43 (86%), <i>n</i> = 5	501 ± 21 (21%), <i>n</i> = 5
3Aa	TrkC agonist	1289 ± 45 (55%), <i>n</i> = 4	246 ± 6 (10%), <i>n</i> = 4
C30–35	p75 ^{NTR} antagonist	1768 ± 42 (75%), <i>n</i> = 4	533 ± 16 (23%), <i>n</i> = 4
REX	p75 ^{NTR} function blocking antibody	1895 ± 38 (81%), <i>n</i> = 3	423 ± 13 (18%), <i>n</i> = 3
C28–35	p75 ^{NTR} and TrkA antagonist	1930 ± 56 (82%), <i>n</i> = 4	200 ± 27 (9%), <i>n</i> = 4
3Bj	Inactive peptide	1366 ± 73 (58%), <i>n</i> = 3	217 ± 9 (9%), <i>n</i> = 5
Axotomy only	–	1276 ± 70 (54%), <i>n</i> = 6	248 ± 10 (11%), <i>n</i> = 4
Combined treatments		1 week	2 weeks
D3 + C92–96 (TrkA antagonist)		1385 ± 20 (59%), <i>n</i> = 4	344 ± 8 (15%), <i>n</i> = 4
NGF + C30–35		2348 ± 58 (100%), <i>n</i> = 4	792 ± 57 (34%), <i>n</i> = 5
D3 + C30–35		2104 ± 106 (90%), <i>n</i> = 4	650 ± 12 (28%), <i>n</i> = 4

Contralateral intact retinas: 2347 ± 54 RGCs/mm² (100%); *n* = 5.

a Intravitreal injection performed at the time of axotomy.

FIGURE 2

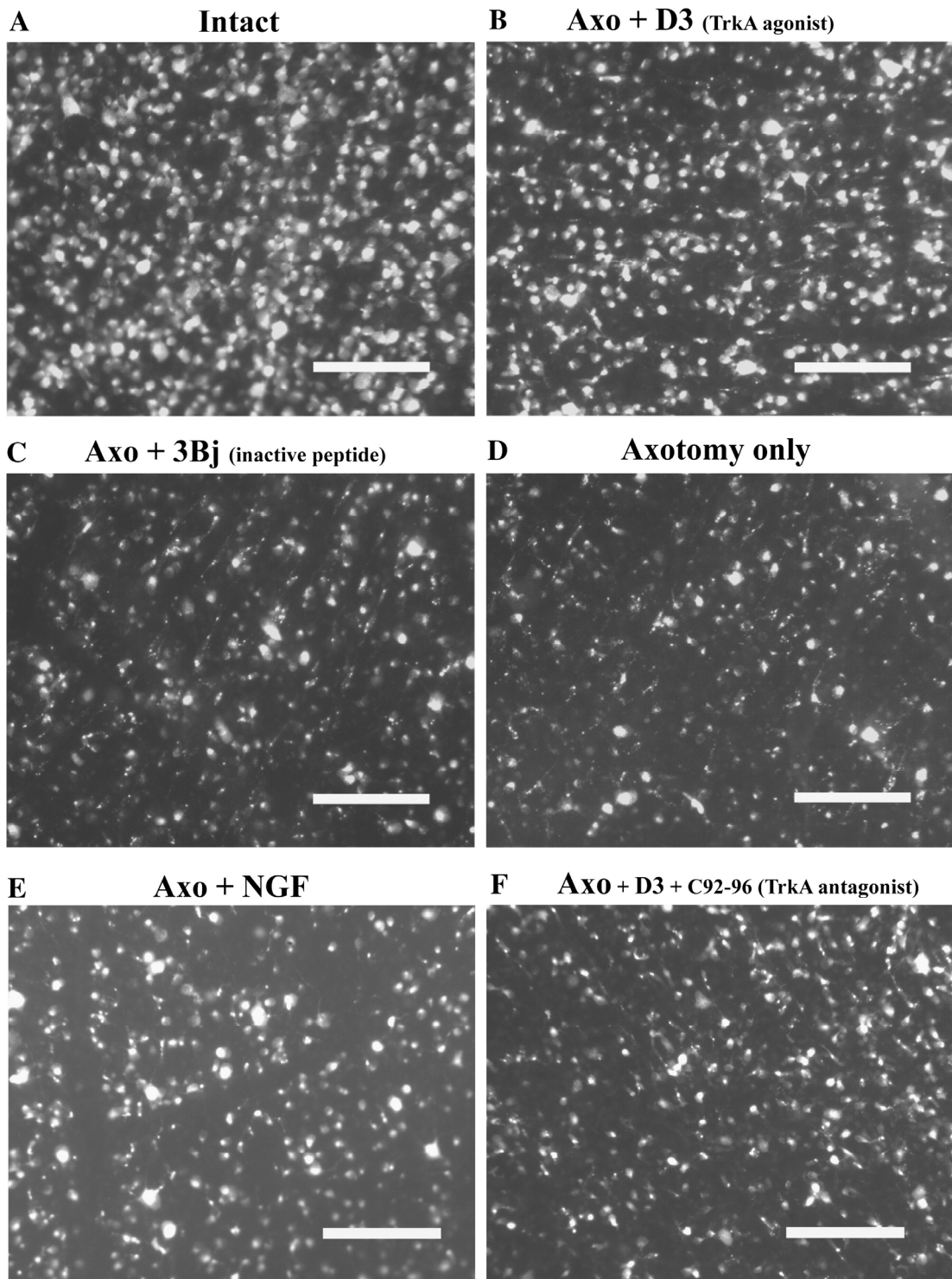


FIGURE 3

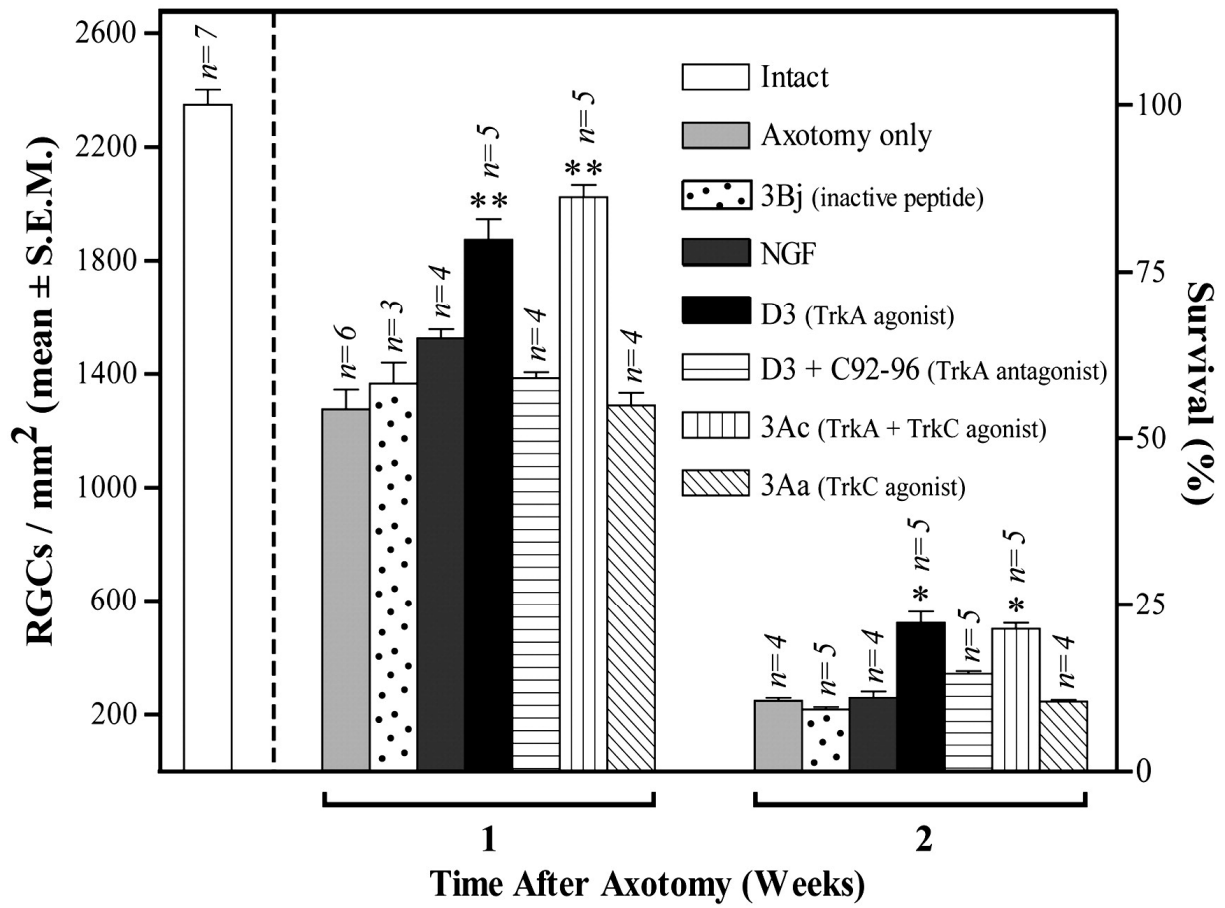


FIGURE 4

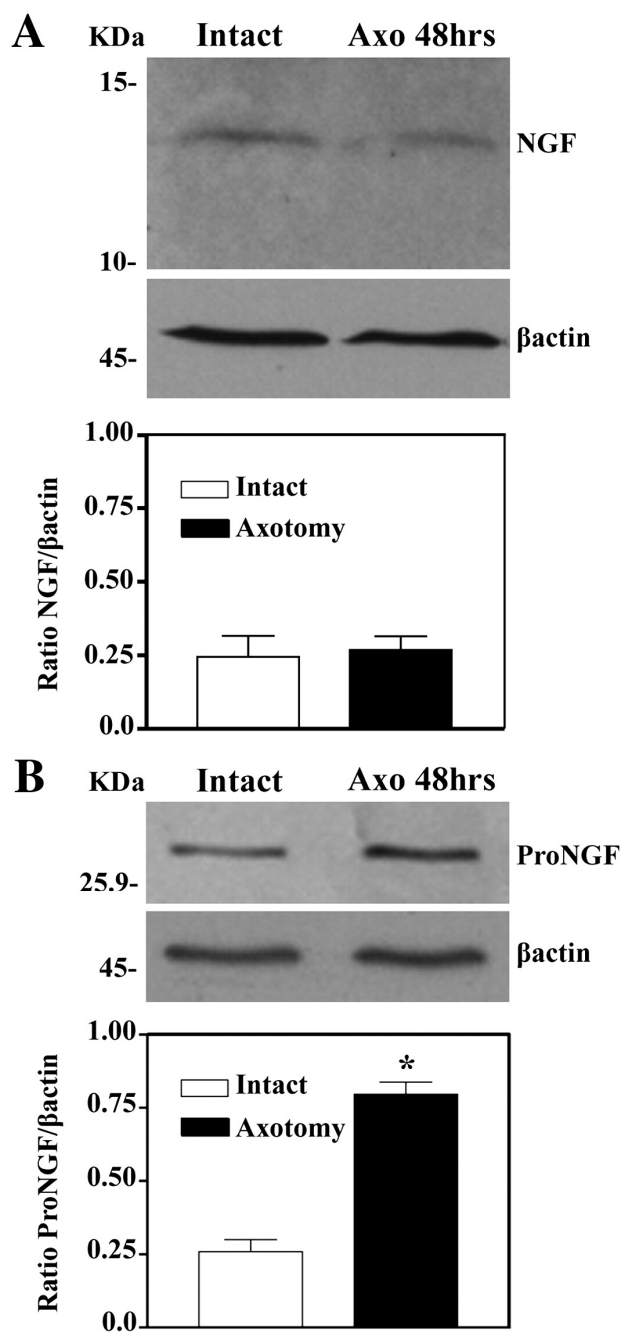


FIGURE 5

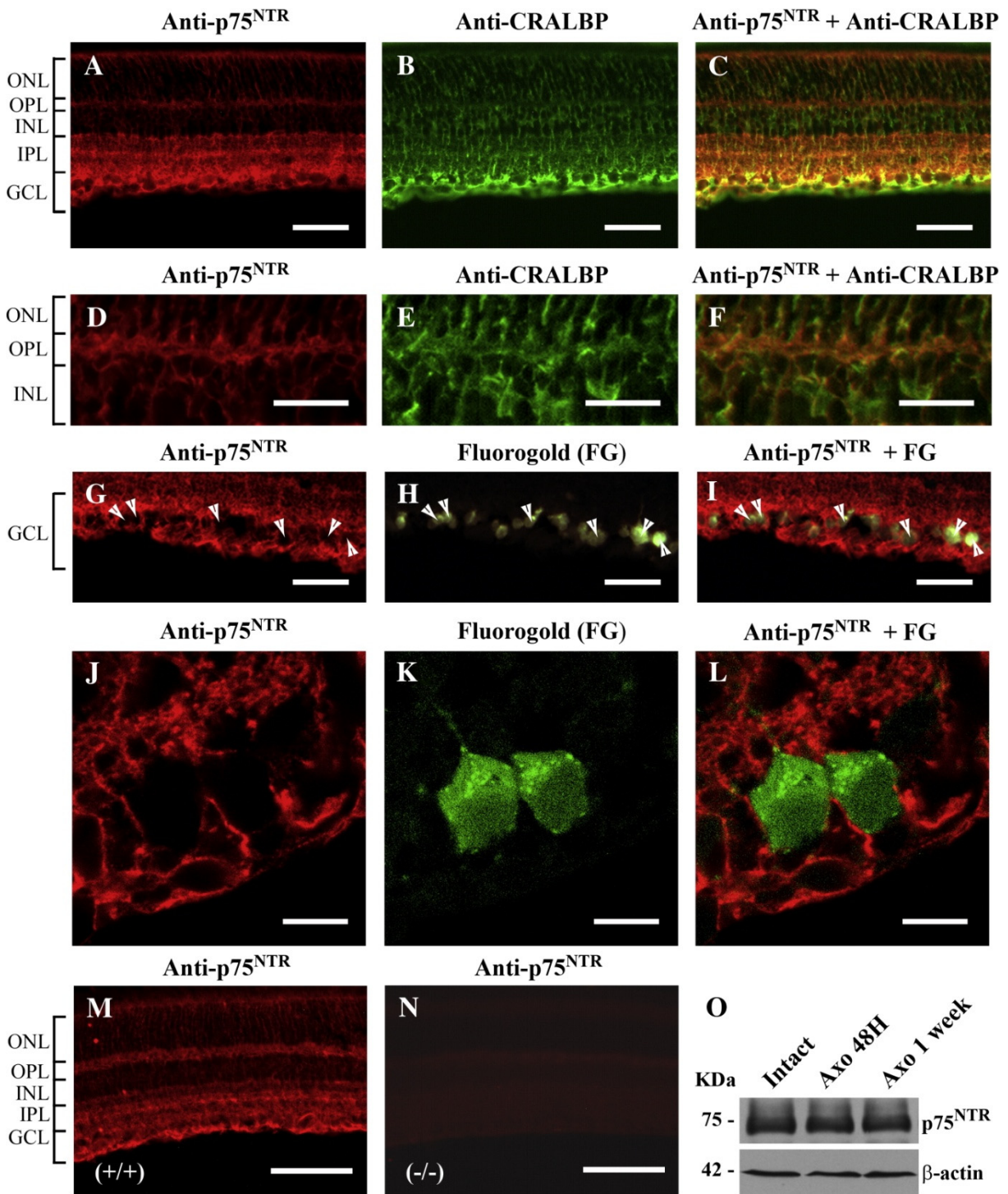
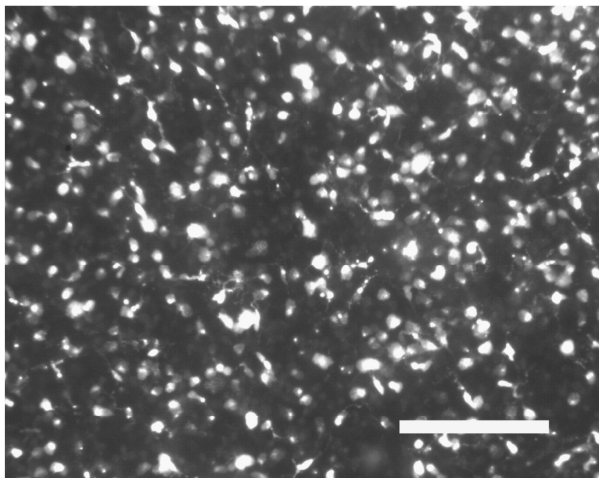
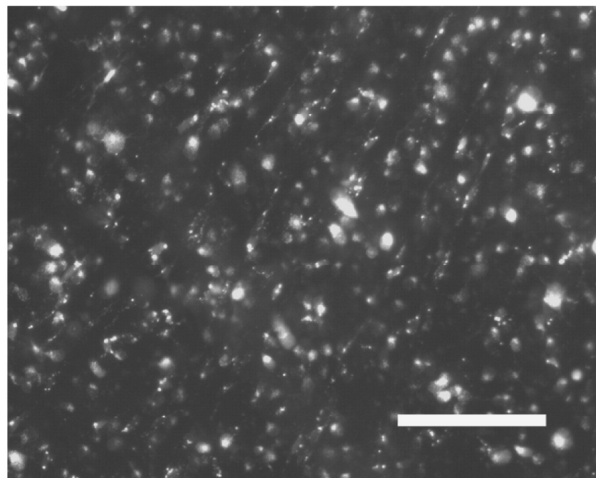


FIGURE 6

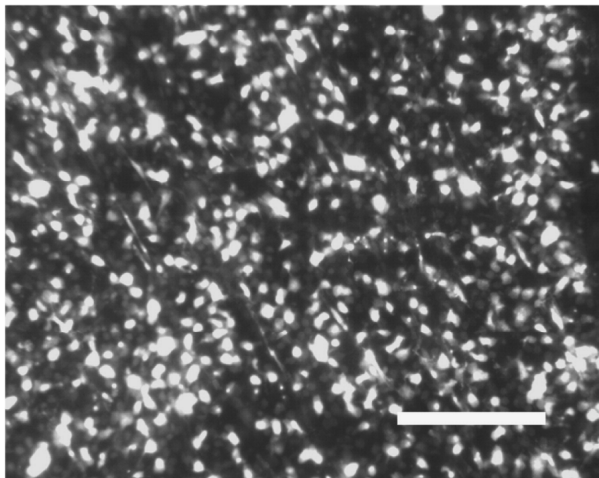
A Axo + C30-35 (p75^{NTR} antagonist)



B Axo + 3Bj (inactive peptide)



C Axo + NGF + C30-35



D Axo + D3 + C30-35

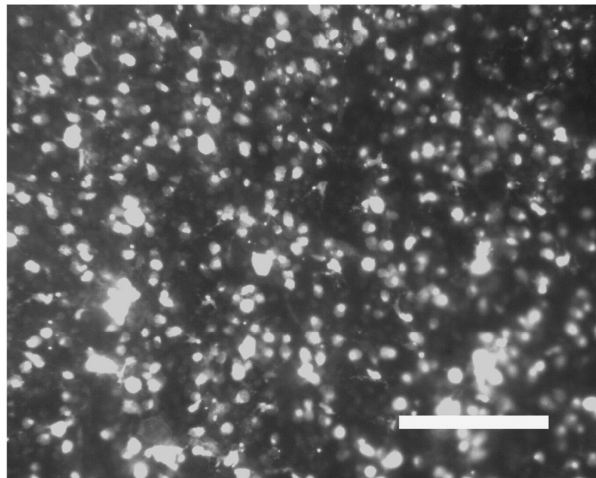


FIGURE 7

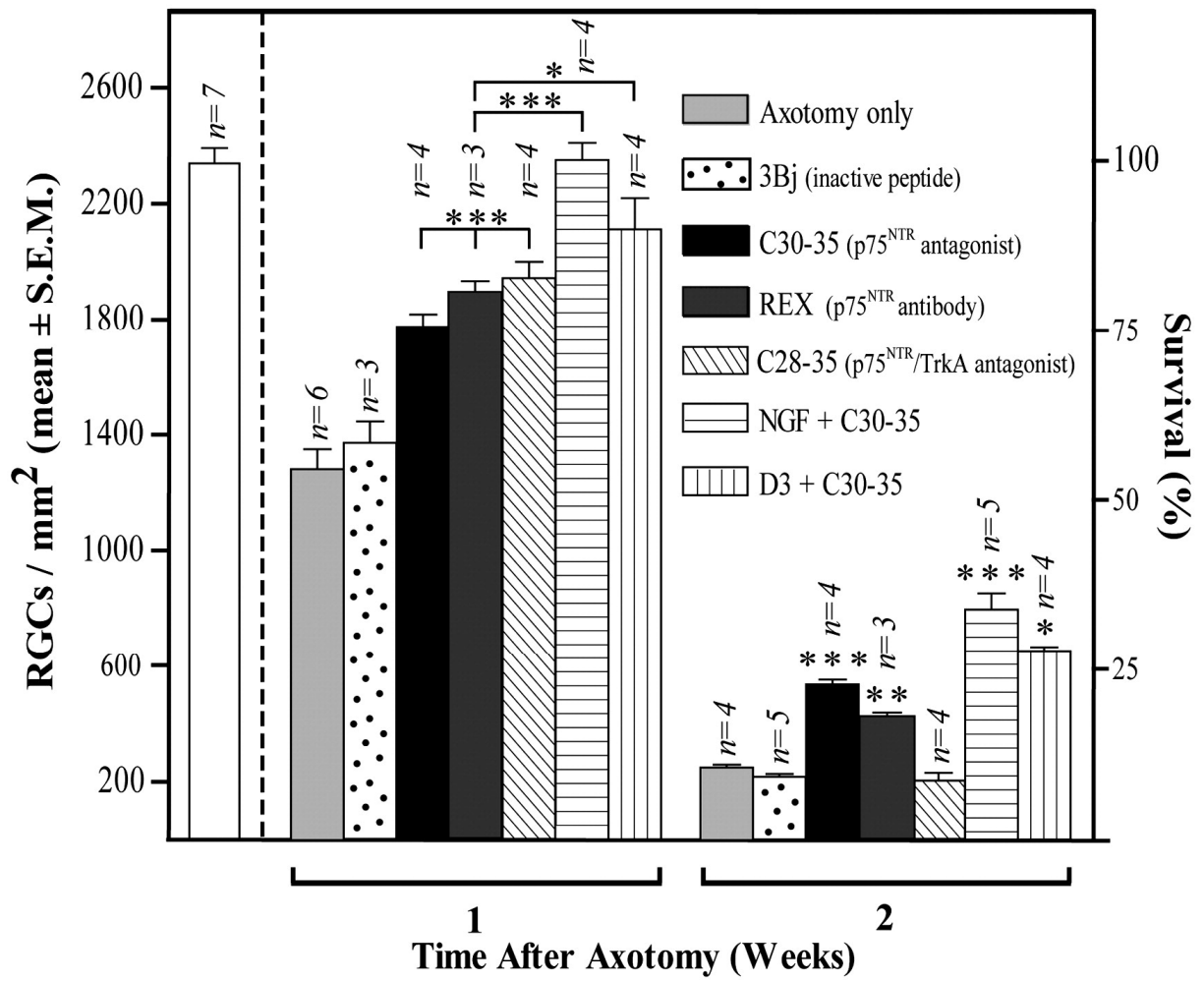
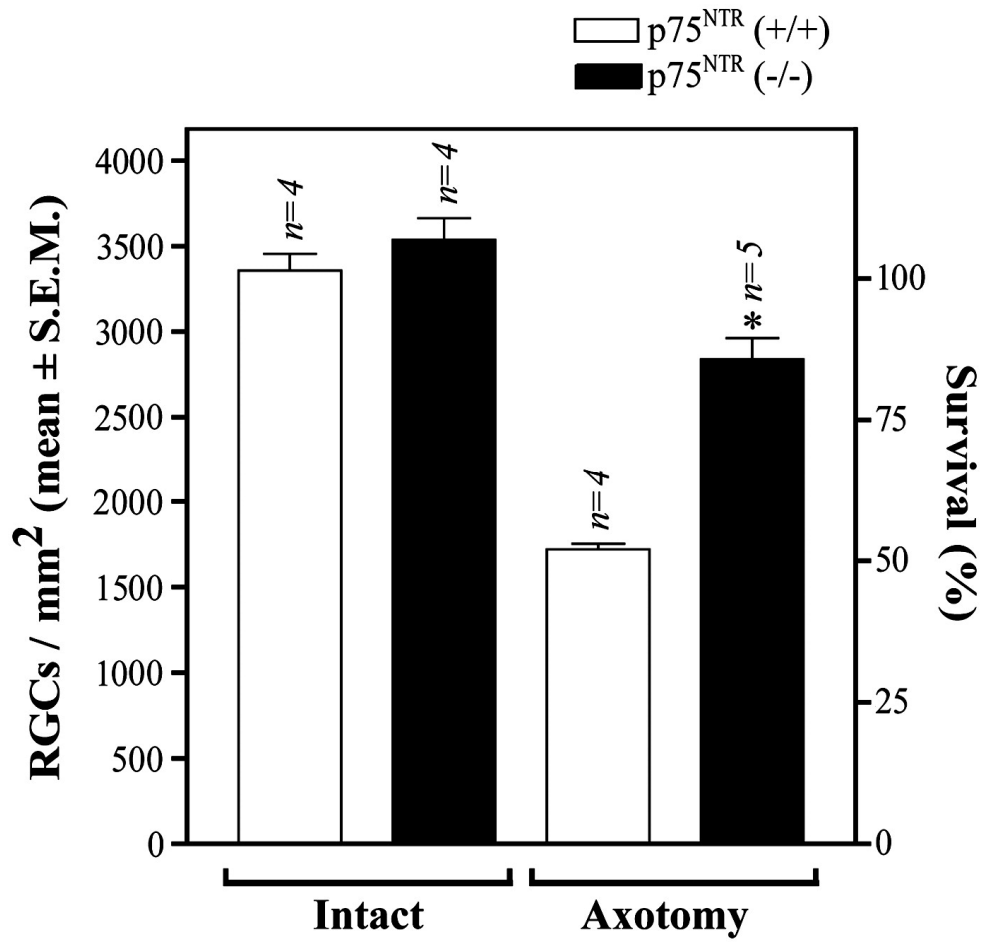


FIGURE 8



ANNEXE E : CONTRIBUTION AUX ARTICLES

Pour l'article "**REDD2-Mediated Inhibition of mTORC1 Promotes Dendritic Retraction Induced by Axonal Injury**" (Annexe A & Étude 1 du chapitre 3), j'ai réalisé la totalité des chirurgies (axotomie et injection intravitréale) sur des souris et ai fait les expériences de marquages sur les coupes transversales, ainsi que l'acquisition en microscopie confocale. J'ai aussi fait la reconstruction en 3D de l'arbre dendritique des CGRs (Imaris Biplane) avec l'aide de Dara O'Connor. Philippe Morquette a fait les enregistrements électrophysiologiques, les analyses et la rédaction de la partie électrophysiologie en étroite collaboration avec sa directrice Arlette Kolta (Fig 6). Ma collègue Jessica Agostinone a réalisé les immunobuvardages qui apparaissent dans les Fig.3 m-o et Fig. 4 e-g. J'ai fait les analyses statistiques, l'interprétation des données et la rédaction de l'article en étroite collaboration avec ma directrice de recherche, le Dre Adriana Di Polo.

Pour l'étude 2 qui apparait dans la partie III.2 du chapitre 3 (Résultats qui possiblement feront l'objet d'un autre article, j'ai réalisé la totalité des expériences (injection intravitréale, marquage immunohistochimie, imagerie confocale et reconstruction 3D) ainsi que l'analyse statistique.

Pour l'article "**ASPP1/2 regulate p53-dependent death of retinal ganglion cells through PUMA and Fas/CD95 activation *in vivo***" (Annexe C de la thèse), j'ai réalisé les axotomies sur les souris transgéniques p53 dont les résultats apparaissent dans la figure 1 de l'article.

Pour l'article "**Inhibition of p75NTR in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells**" (Annexe D de la thèse), j'ai réalisé les axotomies sur les souris transgéniques p75 dont les résultats apparaissent dans la figure 8 de l'article.